

# Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para *Vibrio cholerae* aplicables, como medidas adicionales de control en los puestos de control fronterizos, a langostinos y otros productos de la pesca congelados importados

Número de referencia: AESAN-2024-001

Informe aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 14 de marzo de 2024

## Grupo de trabajo

Antonio Valero Díaz (Coordinador), Rosa María Capita González, Baltasar Mayo Pérez, Azucena del Carmen Mora Gutiérrez y María Dolores Rodrigo Aliaga

## Comité Científico

<b>Concepción María Aguilera García</b> Universidad de Granada	<b>María Pilar Guallar Castellón</b> Universidad Autónoma de Madrid	<b>Azucena del Carmen Mora Gutiérrez</b> Universidad de Santiago de Compostela	<b>María Dolores Rodrigo Aliaga</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>Houda Berrada Ramdani</b> Universitat de València	<b>Ángel Gil Izquierdo</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<b>Gema Nieto Martínez</b> Universidad de Murcia	<b>María de Cortes Sánchez Mata</b> Universidad Complutense de Madrid
<b>Irene Bretón Lesmes</b> Hospital Gregorio Marañón de Madrid	<b>Ángel José Gutiérrez Fernández</b> Universidad de La Laguna	<b>Silvia Pichardo Sánchez</b> Universidad de Sevilla	<b>Gloria Sánchez Moragas</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas
<b>Rosa María Capita González</b> Universidad de León	<b>Isabel Hernando Hernando</b> Universitat Politècnica de València	<b>María del Carmen Recio Iglesias</b> Universitat de València	<b>Antonio Valero Díaz</b> Universidad de Córdoba
<b>Araceli Díaz Perales</b> Universidad Politécnica de Madrid	<b>Baltasar Mayo Pérez</b> Consejo Superior de Investigaciones Científicas	<b>Ana María Rivas Velasco</b> Universidad de Granada	<b>María Roser Vila Casanovas</b> Universitat de Barcelona

## Secretario técnico

Vicente Calderón Pascual

Gestión técnica del informe AESAN: Paula Arrabal Durán

## Resumen

En los últimos años se ha detectado un aumento de la presencia de especies de *Vibrio* en productos derivados de la pesca como consecuencia de fenómenos asociados al cambio climático, comercio internacional y desarrollo de nuevos métodos de detección y diagnóstico. Concretamente, son los serogrupos de *V. cholerae* O1 y O139, así como las cepas portadoras del gen que codifica para la toxina del cólera (cepas *ctx* positivas), las que suponen un riesgo para el consumidor a través de

la ingesta de alimentos de origen pesquero contaminados. La falta de un criterio armonizado sobre los controles en frontera, junto con la creciente presencia de cepas no toxigénicas no-01/no-0139, pone de manifiesto la necesidad de valorar de forma más precisa el riesgo para el consumidor de la presencia de *V. cholerae* en langostinos y otros productos de la pesca congelados, tanto crudos como cocidos listos para el consumo, y establecer unos criterios microbiológicos, en el marco del control de estos productos.

En base a la bibliografía analizada, la prevalencia de *V. cholerae* O1 y O139, así como de cepas *ctx* positivas en langostinos y otros productos de la pesca congelados importados es baja, de manera que el riesgo para el consumidor estaría, principalmente, asociado a prácticas de manipulación y almacenamiento deficientes. Por otro lado, la patogenicidad de los serogrupos de *V. cholerae* no toxigénicos no está aún bien definida, no existiendo evidencias sólidas acerca de la infección por transmisión alimentaria.

Por tanto, en base a las evidencias encontradas, se recomienda mantener el criterio microbiológico de ausencia en 25 g de producto, ya sean langostinos u otros productos de la pesca congelados crudos, o cocidos listos para el consumo, para el caso de *V. cholerae* O1 y O139, así como de otras cepas *ctx* positivas, dado el riesgo inherente asociado a la enfermedad. Para aquellas cepas de *V. cholerae* no toxigénicas, no existen suficientes evidencias acerca de la patogenicidad de las mismas, por lo que no se sugieren medidas de intervención más allá del seguimiento de unas Buenas Prácticas de Higiene (BPH), de aplicación a cualquier producto de la pesca.

En relación con el riesgo asociado a la presencia de *V. cholerae* en langostinos y otros productos de la pesca congelados crudos, se deduce que los tratamientos de cocción a 70 °C durante 2 minutos en el centro del producto garantizan la eliminación del patógeno. En el caso de los langostinos y otros productos de la pesca congelados cocidos listos para el consumo, el riesgo microbiológico se asocia con la contaminación posterior al tratamiento de cocción. Con objeto de mitigar el riesgo para el consumidor, es preciso la aplicación de unas BPH y de los principios del Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) a lo largo de la cadena de producción, distribución y consumo.

### Palabras clave

*Vibrio cholerae*, brote de origen alimentario, criterios microbiológicos, langostinos congelados, productos de la pesca.

### **Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the microbiological criteria for *Vibrio cholerae*, as additional control measures at border control posts, applicable to imported frozen prawns and other fishery products**

### Abstract

In recent years, an increase in the presence of *Vibrio* species in fishery products has been detected as a result of phenomena associated with climate change, international trade and the development

of new detection and diagnosis methods. Specifically, it is the serogroups of *V. cholerae* O1 and O139, as well as the strains carrying the gene that codes for cholera toxin (*ctx* positive strains), that pose a risk to the consumer through the intake of contaminated fishery products. The lack of a harmonised criterion on border controls, together with the increasing presence of non-toxigenic non-O1/non-O139 strains, highlights the need to more accurately assess the risk to the consumer of the presence of *V. cholerae* in frozen prawns and other fishery products, both raw and cooked ready-to-eat, and establish microbiological criteria, within the framework of controlling these products.

Based on the literature analysed, the prevalence of *V. cholerae* O1 and O139, as well as *ctx* positive strains in imported frozen prawns and other fishery products is low, so the risk to the consumer is mainly associated with poor handling and storage practices. On the other hand, the pathogenicity of non-toxigenic *V. cholerae* serogroups is not yet well defined, and there is no solid evidence of foodborne infection.

Therefore, based on the evidence found, it is recommended to maintain the microbiological criterion of absence in 25 g of product, whether frozen, raw or cooked ready-to-eat prawns or other fishery products, in the case of *V. cholerae* O1 and O139, as well as other *ctx* positive strains, given the inherent risk associated with disease. For those strains of non-toxigenic *V. cholerae*, there is not enough evidence about their pathogenicity, so no intervention measures are suggested beyond the monitoring of Good Hygiene Practices (GHP), applicable to any fishery product.

In relation to the risk associated with the presence of *V. cholerae* in raw, frozen prawn and other fishery products, it follows that cooking treatments at 70 °C for 2 minutes in the centre of the product guarantee the elimination of the pathogen. In the case of frozen, cooked ready-to-eat prawns and other fishery products, microbiological risk is associated with contamination after cooking treatment. In order to mitigate the risk to the consumer, it is necessary to apply GHP and the principles of Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) throughout the production, distribution and consumption chain.

## Key words

*Vibrio cholerae*, foodborne outbreak, microbiological criteria, frozen prawns, fishery products.

## Cita sugerida

Comité Científico AESAN. (Grupo de Trabajo) Valero, A., Capita, R.M., Mayo, B., Mora, A.C. y Rodrigo, M.D. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para *Vibrio cholerae* aplicables, como medidas adicionales de control en los puestos de control fronterizos, a langostinos y otros productos de la pesca congelados importados. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 2024, 39, pp: 11-45.

## 1. Introducción

El género *Vibrio* está ampliamente distribuido en la naturaleza en ambientes acuosos dulces o salinos, en zonas de litoral y estuarios de regiones tropicales. Lo conforman, al menos, 12 especies patógenas para el hombre; 10 de estas podrían causar enfermedades que se transmiten a través de los alimentos. La mayoría son causadas por *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Salvo situaciones particulares, la exposición del consumidor a estos patógenos es muy baja, debido a su baja prevalencia en productos de la pesca, a la inhibición del crecimiento a temperaturas de refrigeración, a la sensibilidad al tratamiento térmico y al consumo limitado de productos de la pesca (pescado, moluscos y crustáceos) crudos en España.

Por todo ello, el riesgo de padecer enfermedad por consumo de productos de la pesca procedentes de terceros países contaminados por *Vibrio* spp. en España se ha calificado hasta ahora, en términos generales, de bajo o muy bajo, en función de los datos disponibles de identificación, prevalencia y concentración, tanto de *V. cholerae* como de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Sin embargo, diversos estudios apuntan a que el cambio climático y el aumento de la temperatura del mar están contribuyendo a un incremento de la prevalencia y la concentración de *Vibrio* en aguas, asociada a un aumento de brotes notificados a nivel mundial y a su propagación geográfica a regiones en las que antes no existía la enfermedad. Adicionalmente, factores como el incremento de densidad de población en la costa y la mejora de los métodos diagnósticos podrían ser una explicación de estas observaciones.

Una temperatura de conservación inadecuada puede producir un aumento considerable en los recuentos de *Vibrio*, pudiendo alcanzar niveles de riesgo para la salud, aun partiendo de concentraciones del patógeno muy bajas en la captura del producto o a su llegada a los puestos de control fronterizos. La contaminación cruzada durante la manipulación, así como a través del contacto con alimentos contaminados, puede incrementar el riesgo asociado a la presencia de *Vibrio* spp.

El Reglamento (CE) Nº 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (UE, 2005), no establece criterios a nivel de la Unión Europea para ninguna especie de *Vibrio*, por lo que no hay un criterio armonizado sobre los controles en frontera, y cada país adopta una decisión propia sobre sus actuaciones en el control de estos patógenos.

Según el informe de la reunión del *Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment* (JEMRA, 2021), están ya disponibles diversos enfoques para el aislamiento, la detección, la enumeración y la caracterización de *Vibrio* spp. a partir de matrices como el agua y los mariscos. En particular, el método internacional para la detección de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus* (UNE-EN ISO 21872-1:2017 (UNE-EN ISO, 2017)) incluye opciones de detección molecular mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional y en tiempo real (qPCR).

*Vibrio* spp., principalmente las especies *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, han sido identificadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como peligros biológicos con alta probabilidad de convertirse en emergentes en un futuro próximo en Europa. La EFSA está preparando una opinión sobre *Vibrio* spp. asociado al consumo de alimentos de origen marino, cuya publicación está prevista para junio de 2024 (EFSA, 2022). Asimismo, el Comité del *Codex Alimentarius* sobre Higiene de los Alimentos (CCFH), está revisando el documento de 2010, Directrices sobre la

aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos para el control de las especies patógenas de *Vibrio* en los alimentos de origen marino (Codex Alimentarius, 2010), siguiendo la evidencia científica más actual recogida por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS).

Como consecuencia del resultado desfavorable de controles de *V. cholerae* en crustáceos congelados procedentes de terceros países en puestos de control fronterizos durante los años 2022 y 2023, se intensificaron los controles oficiales en toda la Unión Europea para langostinos congelados procedentes de algunos establecimientos proveedores. En estos controles, el criterio establecido era el de ausencia de *V. cholerae*, sin distinción de serogrupos.

Con estas premisas, se solicita al Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) que elabore un informe en el que se determine:

- i. Las diferencias que existen en cuanto al riesgo para el consumidor entre la presencia en langostinos congelados de las cepas de *V. cholerae* pertenecientes a los serogrupos O1 u O139; los serogrupos no-O1/no-O139 portadores del gen *ctx* que codifica la toxina del cólera (CTX); los serogrupos no-O1/no-O139 no portadores del gen *ctx* que codifica la CTX.
- ii. Las diferencias que existen en cuanto al riesgo para el consumidor de la presencia de *V. cholerae* en langostinos congelados, entre los productos crudos, y aquellos cocidos listos para el consumo.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Aspectos taxonómicos

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* y está constituido por bacterias halófilas Gram negativas con forma de bastón curvo y muy móviles, con un solo flagelo polar. El microorganismo mide entre 1 y 3  $\mu\text{m}$  de largo y entre 0,5 y 0,8  $\mu\text{m}$  de ancho, es anaerobio facultativo, oxidasa positivo, no forma esporas y es capaz de fermentar azúcares (glucosa, sucrosa y manitol) (Kraus et al., 2003) (Ryan y Ray, 2004). Las especies de *Vibrio* se encuentran típicamente en ambientes acuáticos y algunas representan un grave peligro para la salud humana como agentes causantes de infecciones transmitidas por alimentos (Haque et al., 2023). *Vibrio* spp. puede provocar cólera, vómitos, septicemia, diarrea con sangre, dolor abdominal, fiebre y náuseas, procesos que en muchas ocasiones están asociados con el consumo de alimentos de origen marino contaminados (Haque et al., 2023). 12 de las 30 especies del género se consideran patógenos humanos; entre estas, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son las notificadas con mayor frecuencia (Haque et al., 2023).

*V. cholerae* se divide en más de 200 serogrupos determinados por la estructura del antígeno O del lipopolisacárido (LPS). Entre ellos, un subconjunto de cepas pertenecientes a los serogrupos O1 y O139 pueden causar cólera debido a su capacidad para producir la CTX, responsable de diarrea acuosa profusa, y se han asociado principalmente con epidemias. La CTX presenta dos subunidades, A y B, esta última con cinco componentes. Las cepas de *V. cholerae* que causan el cólera albergan un bacteriófago filamentoso (CTX $\Phi$ ) que codifica la CTX, y un factor de virulencia, el *pilus* corregulado por la toxina (TCP, *Toxin-Coregulated Pilus*), un *pilus* de tipo IV que es esencial para la colonización (permite a las células bacterianas adyacentes unirse entre sí, facilitando la formación

de microcolonias dentro del intestino de los seres humanos y animales infectados, y facilita la adhesión a los enterocitos) y también sirve como receptor del bacteriófago CTX $\Phi$  (Waldor y Mekalanos, 1996). Además del TCP, muchas otras estructuras y actividades celulares, incluido el antígeno O-LPS, la curvatura celular, la motilidad y determinados procesos metabólicos, han sido implicados en la colonización intestinal por *V. cholerae* (Baker-Austin et al., 2018). La producción de estos factores de virulencia (CTX y TCP) está fuertemente influenciada por las condiciones ambientales (Bhandari et al., 2023). Otros factores de virulencia, como la toxina de la zonula occludens (Zot), la enterotoxina accesoria del cólera (Ace), la hemolisina (HlyA), la enterotoxina termoestable, los sistemas de secreción tipo III y VI (T3SS y T6SS) y la capacidad para formar biopelículas están involucrados en la patogenicidad de *V. cholerae*. Por lo tanto, incluso los aislamientos de *V. cholerae* negativos para los genes de la CTX podrían suponer un motivo de preocupación ante la potencial presencia de otros genes de virulencia (Jantapaso et al., 2024), si bien este es un aspecto que ha sido objeto de pocas investigaciones hasta el momento.

La gran mayoría de los casos de cólera son causados por cepas del serogrupo O1, que se dividen en tres serotipos, denominados Ogawa, Inaba y Hikojima, según el estado de metilación de la perosmina terminal del LPS. Las cepas de Ogawa están metiladas, las cepas de Inaba no están metiladas y las cepas de Hikojima expresan antígenos O metilados y no metilados. Si bien los serotipos Ogawa e Inaba pueden circular simultáneamente durante las epidemias y son capaces de interconvertirse (Stroehrer et al., 1992), el serotipo Hikojima es raro y la evidencia indica que es una forma de transición inestable que se produce cuando una cepa presenta un cambio de serotipo de Ogawa a Inaba (Karls-son et al., 2014). A su vez, el serogrupo *V. cholerae* O1 se clasifica en dos biotipos, clásico y El Tor, que se pueden distinguir en base a un conjunto de marcadores fenotípicos y genéticos (Barzelighi et al., 2016) (Clemens et al., 2017). Así, en principio, estos dos biotipos difieren en su capacidad hemolítica, reacción de aglutinación con eritrocitos y resistencia a la polimixina B, características presentes en las cepas El Tor (Sharma et al., 1997) (Sharifnia et al., 2012). Un gen que ayuda a codificar el desarrollo y la regulación del TCP, *tcpA*, también se utiliza para distinguir biotipos (El Tor o clásico), en base a deleciones de secuencia en el alelo clásico (Iredell y Manning, 1994). Curiosamente, existen algunas diferencias entre ambos biotipos por lo que respecta a los patrones de infección. Las cepas de El Tor son más eficientes en la transmisión de hospedador a hospedador, sobreviven mejor en el medio ambiente y en el intestino humano, y tienen una mayor incidencia de portadores asintomáticos que sintomáticos, en comparación con las cepas clásicas (Nair et al., 2006).

En general, las cepas que no pertenecen a estos serogrupos (comúnmente denominadas "*V. cholerae* no-O1/no-O139") carecen del gen *ctx* y no son patógenas, o causan enfermedades leves y esporádicas en personas sanas, como gastroenteritis, otitis o infecciones de heridas (Farina et al., 2010). En personas inmunocomprometidas o que tienen una enfermedad subyacente, las cepas de *V. cholerae* no-O1/no-O139 son capaces de provocar fascitis necrotizante y septicemias, con tasas de letalidad asociadas de hasta el 47 % (Trubiano et al., 2014), así como gastroenteritis potencialmente tan severa como el cólera (Calduch et al., 2003) (Dutta et al., 2013) (Octavia et al., 2013) (Fernández-Ruiz et al., 2017) (Zhang et al., 2020). Las infecciones producidas por cepas no-O1/no-O139 están a menudo relacionadas con una exposición ambiental, particularmente con el consumo de

alimentos de origen marino crudos o poco cocinados, y afectan, principalmente, a pacientes inmunodeprimidos (Morris, 1990) (Patel et al., 2009). Durante el verano de 2014, hubo un aumento notable del número de infecciones por *V. cholerae* no-01/no-0139 notificadas en la zona del Mar Báltico, lo que se correspondió tanto temporal como espacialmente con una importante ola de calor. La mayoría de los casos consistieron en infecciones autolimitadas de oído y tejidos blandos asociadas con la natación o la exposición al agua (Baker-Austin et al., 2018).

Aunque la importancia clínica y el impacto para la salud pública de los serogrupos no toxigénicos de *V. cholerae* han sido cuestionados durante mucho tiempo, su implicación en brotes de diarrea tras el consumo de mariscos contaminados se ha documentado en varios países europeos (Le Roux et al., 2015). Algunas cepas de *V. cholerae* no-01/no-0139 producen una enterotoxina termoestable (denominada NAG-ST), que se parece mucho a la enterotoxina termoestable de *Escherichia coli* enterotoxigénica. Estas cepas, denominadas "*V. cholerae* enterotoxigénica", pueden causar enfermedades diarreicas en humanos, según observaciones en voluntarios y estudios epidemiológicos de brotes y casos esporádicos (Bagchi et al., 1993). La patogenicidad de *V. cholerae* no toxigénico puede verse aumentada debido a la presencia de un amplio espectro de factores de virulencia, incluidas enzimas extracelulares, enterotoxinas y hemolisinas (Restrepo et al., 2006) (Ottaviani et al., 2009). Por ello, es posible que los serogrupos no toxigénicos de *V. cholerae* pasen a ser considerados en el futuro como una causa emergente de infección gastrointestinal en nuestro medio, especialmente en pacientes inmunodeprimidos, donde la infección podría estar asociada a una mortalidad significativa (Fernández-Ruiz et al., 2017).

En ocasiones, se han aislado cepas no-01/no-0139 que producen la CTX (O141 y O75 en los Estados Unidos; O5, O6, O10, O12, O14 y O37 en otras partes del mundo) (Crump et al., 2003) (Tobbin-D'Angelo et al., 2008) (Aidanian et al., 2015). Estos serogrupos pueden provocar casos esporádicos de enfermedad colérica o pequeños brotes, pero no parecen ser capaces de causar cólera epidémico. En este sentido, se ha indicado que algunos serogrupos no-01/no-0139 podrían servir también como reservorio del genoma del fago de la toxina del cólera (Udden et al., 2008). En los estudios filogenéticos estos serogrupos no-01/no-0139 no se agrupan con las cepas de *V. cholerae* responsables de enfermedades epidémicas (que tienden a colocarse muy próximas) y, en general, carecen de múltiples genes/complejos de genes que se han asociado con el cólera "típico" (Li et al., 2002). Este hecho coincide con el concepto de que existe un "genotipo epidémico" que incluye múltiples genes necesarios para la enfermedad epidémica (Aidanian et al., 2015). Concretamente en Europa se carece de sistemas de notificación obligatorios para enfermedades asociadas a *Vibrio* distintas de las causadas por *V. cholerae* O1/O139, lo que impide una estimación precisa del número de infecciones. No obstante, la prevalencia de brotes causados por *V. cholerae* no-01/no-0139 está aumentando, probablemente como consecuencia del incremento progresivo de la temperatura de la superficie marina (Castello et al., 2022).

## 2.2 Cólera

La infección por *V. cholerae* puede ser asintomática o cursar con formas clínicas severas (cólera *gravis*). El cólera puede presentarse como una enfermedad esporádica, epidémica o endémica,

conocida por causar diarrea grave y deshidratación que puede provocar la muerte en ausencia de tratamiento médico (Bhandari et al., 2021). En las zonas endémicas, el 75 % de los casos son asintomáticos, el 20 % son leves a moderados y entre el 2 % y el 5 % son formas graves. Los síntomas incluyen la aparición abrupta de diarrea acuosa en “grano de arroz”, vómitos ocasionales y calambres abdominales (Ryan y Ray, 2004). La deshidratación sobreviene con síntomas y signos como sed, mucosas secas, disminución de la turgencia de la piel, ojos hundidos, hipotensión, pulso radial débil o ausente, taquicardia, taquipnea, voz ronca, oliguria, calambres, insuficiencia renal, convulsiones, somnolencia, coma y, ocasionalmente, muerte (Kraus et al., 2003). La muerte por deshidratación puede ocurrir en unas horas o días, especialmente en niños sin tratamiento médico, siendo la enfermedad especialmente peligrosa para las mujeres embarazadas durante la última etapa del embarazo, ya que pueden ocurrir abortos, partos prematuros y muerte fetal. En los casos de cólera *gravis*, que implican una deshidratación severa, hasta el 60 % de los afectados pueden morir; sin embargo, menos del 1 % de las infecciones son mortales con tratamiento de rehidratación. El período de incubación del cólera puede oscilar entre 12 horas y 5 días, y la enfermedad suele durar entre 4 y 6 días (Azman et al., 2013). Varios estudios demuestran que la infección clínicamente aparente por *V. cholerae* induce inmunidad protectora contra infecciones posteriores en humanos. Los pacientes sintomáticos pueden eliminar vibrios antes de los signos clínicos de la enfermedad y hasta 2 semanas después. Además, puede existir un estado de portador (donde el paciente tiene el agente infeccioso sin ninguna manifestación clínica), eliminándose en este caso los vibrios en cantidades pequeñas e intermitentes durante varias semanas (Gangarosa et al., 1966).

*V. cholerae* se transmite de persona a persona por vía fecal-oral o indirectamente a través de alimentos o agua contaminados (Montero et al., 2023), habiéndose notificado epidemias causadas por el consumo de alimentos de origen marino (Krauss et al., 2003) (Ryan y Ray, 2004) (Baker-Austin et al., 2018). En los países desarrollados, los casos de gastroenteritis por *Vibrio* están casi siempre relacionados con el consumo de alimentos de origen marino, particularmente crudos o poco cocinados (Hlady y Klontz, 1996). Sin embargo, en entornos con recursos limitados, el patrón suele ser menos claro, debido en parte al mayor riesgo de contaminación fecal de los alimentos y el agua y/o a la contaminación cruzada de otros alimentos con productos de la pesca contaminados. La temperatura y la salinidad son los dos factores más importantes que afectan a la distribución de *Vibrio* en todo el mundo. Por ello, las infecciones generalmente surgen durante el verano y el otoño, cuando las aguas superficiales son comparativamente más cálidas (Deeb et al., 2018). El rápido calentamiento del medio marino, junto con el aumento de fenómenos meteorológicos extremos, como las olas de calor, están favoreciendo la propagación de *Vibrio* spp. en todo el mundo, y recientemente se han notificado brotes de infección por *Vibrio* spp. en regiones templadas como España (*V. parahaemolyticus* (Martínez-Urtaza et al., 2018)), Suecia y Finlandia (*V. cholerae* y otras especies (Baker-Austin et al., 2016)).

Después de la ingestión, el patógeno prolifera hasta alcanzar una alta concentración a lo largo de la superficie mucosa del intestino delgado, pero no altera la integridad de la barrera epitelial ni causa daños sustanciales a las células epiteliales (se trata de un patógeno extracelular). En cambio, las bacterias provocan una intensa respuesta secretora, lo que resulta en una diarrea acuosa



profusa. Estudios en diversos modelos animales y en voluntarios han demostrado que la diarrea colérica es, principalmente, una respuesta a la CTX secretada por el patógeno. Así, se ha observado que la eliminación de los genes *ctxA* y *ctxB* (que codifican las subunidades A y B de la CTX, respectivamente) de *V. cholerae* anula la capacidad de la bacteria para inducir diarrea en modelos animales, mientras que la administración de CTX purificada es suficiente para provocar diarrea en voluntarios humanos (Baker-Austin et al., 2018).

Gracias a los avances en materia de saneamiento a través de la educación y la mejora de la infraestructura (gestión adecuada de las aguas residuales), los países desarrollados han erradicado con éxito el cólera, excepto algunos brotes ocasionales o como resultado de unos pocos casos importados (OMS, 2018). Por el contrario, el cólera es endémico en casi 70 países en el ámbito mundial, siendo más frecuente la enfermedad en áreas tropicales y subtropicales. La mayoría de los casos se encuentran en el subcontinente indio y en África (en 2002, la OMS estimó que el 97 % de los casos de cólera ocurren en África) (Ali et al., 2015), donde cuestiones socioeconómicas como el crecimiento demográfico y el consecuente hacinamiento, la urbanización no planificada y la mala infraestructura sanitaria, la pobreza extrema, la migración forzada y los conflictos bélicos prolongados contribuyen a la transmisión de la enfermedad (OMS, 2018). En zonas endémicas, los casos de cólera tienden a ser más comunes en niños menores de 5 años, que puede ser explicado por un deficiente sistema inmunitario. Además de los patrones endémicos de transmisión, el cólera a menudo ocurre en el contexto de grandes y devastadoras epidemias. Las epidemias en zonas endémicas tienden a ocurrir durante la temporada de calor y parecen estar aumentando como consecuencia del cambio climático (Kraus et al., 2003). En el año 2022, se registraron cerca de medio millón de casos de cólera en el mundo, y 2549 defunciones por esta causa (OMS, 2023). Sin embargo, algunos investigadores estiman que se producen anualmente 3 millones de casos de enfermedad humana, asociados a más de 100 000 fallecimientos (Ali et al., 2012).

En los últimos 200 años ha habido siete pandemias principales de cólera. El biotipo clásico de *V. cholerae* O1 fue responsable de las seis primeras pandemias de cólera, que discurrieron entre los años 1817 y 1925. A partir de ese año, dejando a un lado algunos brotes locales, no se notificaron más pandemias de cólera hasta la década de 1960 (Wachsmuth et al., 1994) (Dziejman et al., 2002). La séptima pandemia de cólera, causada por el biotipo El Tor, comenzó en Sulawesi (Indonesia), llegó a África en 1970 y a América Latina en 1991 (Rivera et al., 2003). En agosto de 2000, Sudáfrica experimentó una de las peores epidemias de cólera en su historia, con más de 114 000 casos registrados.

Las cepas de la séptima pandemia O1 El Tor, que continúa en la actualidad, han sido las más persistentes probablemente como consecuencia de su continua adaptabilidad a los cambios ambientales y de otro tipo (presión de selección, eventos evolutivos, transferencia de genes, etc.). Estas cepas de El Tor reemplazaron a las cepas clásicas poco después de su aparición en 1961, excepto en Bangladesh, donde ambas cepas se notificaron simultáneamente durante una década (1982-1993) (Ansaruzzaman et al., 2007). Hasta principios de la década de 2000, todavía se produjeron en todo el mundo algunos casos esporádicos por el biotipo clásico. Desde 1990, *V. cholerae* O1 ha cambiado a cepas variantes de El Tor híbridas y alteradas. Estas cepas variantes de El Tor tienen

fenotipos únicos o mixtos en comparación con las cepas clásicas y El Tor, y al mismo tiempo producen la CTX de tipo clásico. Estas variantes emergentes de *V. cholerae* se han clasificado como cepas de “variante atípica de El Tor” (Safa et al., 2010) (Klinzing et al., 2015).

El Tor fue reemplazado temporalmente, en 1992, por una cepa de un serogrupo distinto del O1, que provocó un brote masivo de una enfermedad similar al cólera en aldeas costeras de la India y Bangladesh. Esta cepa es fenotípica y genéticamente muy cercana a El Tor, con algunas características de las cepas clásicas, y está clasificada como un nuevo serogrupo (O139 Bengala). En agosto de 1996, *V. cholerae* resurgió como agente causante del cólera en Calcuta, denominándose la cepa responsable O139 Calcuta. Estas cepas O139 Calcuta son genéticamente similares a O139 Bengala y tienen un elemento *ctx* adicional del tipo El Tor (Sharma et al., 1997). Se pensaba que la rápida propagación de esta cepa del serogrupo O139 Bengala en la mayor parte de Asia anunciaba el comienzo de la octava pandemia, pero esta cepa no se propagó fuera de Asia y, en consecuencia, no se clasificó como pandemia. El cólera asociado a la cepa O139 Bengala disminuyó en 1996, pero aumentó en 2002 y, nuevamente, en 2005. Desde entonces, O139 Bengala no está asociado con ningún brote importante y solo se aísla de forma esporádica. Actualmente, coexisten brotes de cólera por cepas de los biotipos O139, O1 El Tor y O1 El Tor híbrido/atípico (Bhandari et al., 2023). El biotipo El Tor continúa siendo el principal agente causante del cólera en todo el mundo (Baker-Austin et al., 2018).

Son destacables los cambios poblacionales (reemplazo casi completo de las cepas prevalentes por nuevas cepas) y la evolución continua de *V. cholerae* O1 desde el siglo XVIII al siglo XXI. La transferencia horizontal de genes y la adquisición de ADN exógeno, incluidos elementos genéticos móviles como plásmidos, bacteriófagos, transposones, elementos integrativos y conjugativos e islas genómicas, ayudan a las bacterias a aumentar su aptitud en diferentes condiciones ambientales. La aparición de nuevos clones patógenos como, por ejemplo, *V. cholerae* O1 El Tor, *V. cholerae* O139 y clones atípicos de *V. cholerae* O1 El Tor parece deberse a la extensa recombinación genética producida mediante transferencia horizontal de genes, principalmente islas genómicas (Bhandari et al., 2021). De hecho, el análisis del genoma de *V. cholerae* sugiere que los recientes brotes de cólera en varias partes del mundo se han producido por la rápida evolución de múltiples descendientes de un ancestro de *V. cholerae* O1 El Tor, debido, principalmente, a eventos de transferencia horizontal de genes mediante transducción, conjugación y transformación (Chun et al., 2009).

### 2.3 El cólera y los alimentos. Prevalencia de *V. cholerae* en productos de la pesca

Entre los diferentes alimentos, los productos de la pesca son la principal fuente de infección por *V. cholerae* en el mundo. Así, esta bacteria es uno de los patógenos más importantes asociados con su consumo en varios países (Yaashikaa et al., 2016) (Castello et al., 2022). La contaminación de estos alimentos con *Vibrio* spp. se puede producir en varios puntos de la cadena de producción, incluyendo el ciclo vital de los mariscos, así como su procesado, conservación y almacenamiento (por ejemplo, a partir del plancton, agua de estanque, agua utilizada para limpieza, hielo y por contaminación cruzada con diferentes superficies) (Jantapaso et al., 2024), especialmente cuando estas operaciones se realizan bajo condiciones higiénicas inadecuadas. En consecuencia, los productos

de la pesca pueden estar contaminados con diferentes especies de *Vibrio* que no solo contribuyen a su deterioro, sino también a la propagación del cólera y otras enfermedades transmitidas por los alimentos (Haque et al., 2023).

Las características fisicoquímicas de los alimentos que favorecen la supervivencia y el crecimiento de *V. cholerae* incluyen alto contenido en agua, pH neutro o alcalino y ausencia de bacterias competidoras. Además, *V. cholerae* tiene la capacidad de formar biopelículas, que pueden jugar un papel importante en la persistencia y transmisión del patógeno (Fernández-Delgado et al., 2016). Así, al igual que ocurre con muchos otros microorganismos, se ha documentado la resistencia de las biopelículas de *V. cholerae* al cloro y a otros desinfectantes (Carrascosa et al., 2021), lo que dificulta el control de esta bacteria en la industria alimentaria.

Los seres humanos son un reservorio de *V. cholerae*, al igual que los animales que se encuentran en entornos acuáticos (Krauss et al., 2003). El cambio climático, la creciente contaminación del agua y la antropización de las costas, son factores que favorecen la propagación global de *Vibrio* spp., así como la aparición de aislamientos resistentes a los antibióticos (Castello et al., 2022). Dado que *Vibrio* spp. requiere un ambiente acuático salino templado para un óptimo crecimiento (>15 °C), se ha sugerido que el aumento de las temperaturas medias del mar como resultado del calentamiento global podrían explicar el incremento de la incidencia de infección por *V. cholerae*, incluso en latitudes septentrionales (Ottaviani et al., 2009) (Le Roux et al., 2015).

La presencia de *Vibrio* spp. en alimentos de origen marino ha sido descrita en diferentes países de Asia, Europa y América Latina (Ripabelli et al., 1999) (Lhafi y Kuhne, 2007) (Raghunath et al., 2008) (Lopatek et al., 2015) (Sperling et al., 2015) (Tra et al., 2016) (Neetoo et al., 2022) si bien, en la mayoría de las investigaciones no se detectan cepas productoras de CTX (Zhang et al., 2014). En Tailandia, algunos autores han observado prevalencias muy elevadas de *Vibrio* spp., como es el caso de Woodring et al. (2012), que encontraron el microorganismo en el 92 % de las muestras de alimentos de origen marino crudos procedentes de mercados en Bangkok analizadas en 2008. Por su parte, Preeprem et al. (2014) encontraron que 55 de 125 muestras de alimentos de origen marino analizadas en Tailandia estaban contaminadas con *V. cholerae*, siendo 99 de los 100 aislamientos identificados como no-01/no-0139. Estos investigadores no detectaron cepas productoras de CTX. Preeprem et al. (2023) aislaron recientemente *Vibrio* spp. a partir de alimentos de origen marino procedentes de establecimientos de venta al público en la provincia de Yala (Tailandia), y encontraron que el 34 % de los aislamientos se correspondían con *V. cholerae*. También en ese país, Dalsgaard et al. (1995a) detectaron la presencia de *V. cholerae* O1 en langostinos de acuicultura, pero posteriores estudios moleculares (Dalsgaard et al., 1995b) mostraron que las cepas eran negativas para el gen *ctx*, por lo que estos autores sugieren la importancia de utilizar técnicas moleculares, como PCR, para caracterizar los aislamientos ambientales de *V. cholerae* y poder así detectar las cepas patógenas de este microorganismo. Chitov et al. (2009) han indicado que el nivel de *V. cholerae* en alimentos de origen marino crudos en Tailandia podría oscilar entre  $10^2$  y  $10^4$  UFC/g, y los serogrupos detectados generalmente son no-01/no-0139.

Haque et al. (2023) detectaron *V. cholerae* en el 24,7 % de las muestras de piscifactorías analizadas en Bangladesh, con mayor prevalencia en muestras de langostinos (38 %) que en muestras de

barro (20 %) y agua (16 %). Gopal et al. (2005) estudiaron la presencia de varias especies de *Vibrio* en muestras de agua, sedimentos y langostinos de múltiples ambientes de granjas de la costa este y oeste de la India. Estos investigadores detectaron *V. cholerae* en algunos casos, si bien todos los aislamientos fueron negativos para el gen de la CTX. Por su parte, Elhadi et al. (2004) examinaron 768 muestras de alimentos de origen marino de Malasia que incluían langostinos, calamares, cangrejos, berberechos y mejillones. Se realizaron 97 aislamientos de *V. cholerae*, de los cuales 1 pertenecía al serogrupo O1, y 14 al serogrupo O139. En este estudio, todos los aislamientos de *V. cholerae* resultaron negativos para el gen de la CTX (*ctx*), estudiado mediante PCR.

Por lo que respecta a Europa, Castello et al. (2022) estudiaron, en 603 muestras de alimentos de origen marino en Sicilia (Italia), la presencia de *Vibrio* spp., así como la patogenicidad y la resistencia a los antimicrobianos de las cepas. Se realizaron 165 aislamientos, de los que 12 (7,3 %) se correspondían con *V. cholerae*, todos ellos distintos de los serogrupos O1 y O139, no portando ninguno genes de virulencia. También se han observado prevalencias bajas de *V. cholerae* en alimentos de origen marino de otras regiones de Italia. En particular, un estudio realizado por Passalacqua et al. (2016) puso de manifiesto una prevalencia de *V. cholerae* en almejas (*Ruditapes philippinarum*) del 0 % y del 3 % en Emilia Romagna y en Cerdeña, respectivamente. Por su parte, Normanno et al. (2006) obtuvieron una prevalencia del 0,3 % para *V. cholerae* en los mejillones (*Mytilus galloprovincialis*) vendidos en Puglia. En otro trabajo de investigación se demostró una prevalencia más alta que la indicada por lo que respecta a la presencia de *V. cholerae* no toxigénico en langostinos (17 %) y mejillones (9 %) recolectados en la costa italiana (Ottaviani et al., 2009).

En un estudio reciente se determinó la prevalencia de *Vibrio* spp. en el comercio minorista de alimentos de origen marino en Berlín (Alemania) (Vu et al., 2018). Se investigó la presencia del microorganismo en un total de 160 muestras de alimentos de origen marino crudos procedentes de diferentes establecimientos de venta al público, consistentes en langostinos (n= 80) y moluscos bivalvos (n= 80). Utilizando el método ISO/TS 21872 y una PCR multiplex, la prevalencia general de *Vibrio* spp. en alimentos de origen marino al por menor fue del 55 %, y la prevalencia de *V. cholerae* del 6,3 %. Los aislamientos de *V. cholerae* (n= 27) carecían del gen *ctxA*. Esta prevalencia de *Vibrio* spp. es similar a la observada en otros estudios realizados en Francia (34,7 %) (Robert-Pillot et al., 2014) y México en 2012 y 2013 (44,3 %) (Franco-Monsreal et al., 2015). Según datos reportados en el último informe europeo sobre zoonosis *One Health* en 2022, los Países Bajos realizaron pruebas en 185 muestras individuales y 327 lotes de pescado crudo y crustáceos, como camarones, recogidos en puestos de control fronterizo para verificar la presencia de *Vibrio* spp. Se detectó *V. cholerae* no toxigénico en 11 lotes, y *V. parahaemolyticus* se detectó en 18 muestras individuales y en 1 lote, lo que suma un total de 30 (5,9 %) resultados positivos (EFSA/ECDC, 2023).

Además de en productos de la pesca, se ha detectado *V. cholerae* en otros alimentos. En estos casos, la contaminación ocurre, principalmente, cuando se procesan en ambientes antihigiénicos o por contacto con manipuladores infectados. A pesar de su baja prevalencia, algunos alimentos (arroz, gachas de mijo y verduras contaminadas) se han visto implicados también en brotes epidémicos (Budiman et al., 2022). La carne y los productos lácteos tienen también un cierto potencial de transmitir el cólera (Clemens et al., 2017).

### 3. Alertas y brotes de toxiinfecciones alimentarias asociadas a *V. cholerae* en productos de la pesca en la Unión Europea y a nivel mundial

En los últimos años se ha producido un aumento significativo del número de brotes y alertas alimentarias por especies patógenas de *Vibrio* debido al consumo de productos de la pesca, por lo que se hace necesaria la implementación de guías y estrategias de gestión efectivas para su control.

Estudios previos apuntaban a que era necesaria la ingesta de un número elevado de células viables para que el patógeno pudiese sobrevivir al pH del tracto gastrointestinal y causar infección en el hospedador. Con el aumento de los serogrupos y cepas patogénicas es posible que las dosis infectivas puedan ser más bajas dependiendo de la virulencia de las mismas y del sistema inmune del hospedador.

Los brotes causados por la enfermedad del cólera afectan, principalmente, a países en vías de desarrollo, y se deben a la ingesta de agua y alimentos contaminados con materia fecal. En diversos países de África, las epidemias causadas por la enfermedad del cólera son recurrentes (McAteer et al., 2018) (Sinyange et al., 2018). Previamente, en 2010, también se notificaron más de 23 casos de cólera en Estados Unidos causados por consumo de pescado importado (Newton et al., 2011). Todos estos brotes han estado asociados a *V. cholerae* perteneciente al serogrupo O1. Las variantes alélicas *ctxB* de *V. cholerae* O1 Ogawa han estado relacionadas con diversos brotes en India (Jain et al., 2011) (Bhusan Pal et al., 2021). En 2018, se notificó un brote de *V. cholerae* O1 (serotipo Ogawa) con 74 casos debido a la ingesta de agua contaminada (EFSA/ECDC, 2019). Finalmente, en los últimos años se han notificado brotes como en Haití, donde en 2023 se reportaron más de 20 000 casos con una tasa de hospitalización del 79 % y una ratio de mortalidad del 3 % (Ocasio et al., 2023).

Por otro lado, las cepas de *V. cholerae* que no pertenecen a los serogrupos O1 y O139 (conocidas como no-O1/no-O139) pueden causar infección produciendo casos esporádicos de diarrea, o bacteriemia, aunque la sintomatología es, generalmente, más leve que la causada por las cepas *ctx* positivas. Sin embargo, se han reportado brotes de gastroenteritis causados por cepas no-O1/no-O139 debido a la adquisición de factores de virulencia (T3SS/T6SS) y genes de resistencia a antibióticos (Arteaga et al., 2020). Otros brotes reportados por especies de *V. cholerae* no-O1/no-O139 ocurrieron en Estados Unidos, en 2011, (*V. cholerae* O75) con 10 casos confirmados relacionados con el consumo de ostras contaminadas (Onifade et al., 2011). Otros casos registrados asociados a especies no toxigénicas de *V. cholerae* ocurrieron entre 2014 y 2018 en Noruega, Finlandia, Polonia, Suecia, Dinamarca y Estonia, y fueron atribuidos a un aumento de temperaturas en ese período. En concreto, se notificaron 100 casos, aunque la mayor parte de los mismos (67 %) no fueron graves (Amato et al., 2022). Sin embargo, en otros países europeos como en Austria, a pesar de haberse notificado casos asociados a *V. cholerae* no toxigénico por contacto con aguas contaminadas, no parece haber una correlación clara entre ello y el calentamiento global (Rehm et al., 2023).

Según los datos presentes en el portal RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), se han notificado 43 alertas, entre los años 2020-2024, debidas a la presencia de cepas de *V. cholerae* en productos pequeros importados (RASFF, 2024), siendo estas notificadas, principalmente, en España y, en menor medida, en otros países como Dinamarca, Suecia, Noruega o Rumanía. La detección

en producto congelado demuestra que el patógeno puede sobrevivir a este tratamiento y producir toxina si las condiciones ambientales permiten su crecimiento posterior.

No obstante, los brotes asociados a *V. cholerae* en la Unión Europea son altamente esporádicos. De acuerdo con la información reportada en el último informe sobre zoonosis (EFSA/ECDC, 2023), en 2022 se ha notificado un brote en la Unión Europea asociado a una cepa no toxigénica de *V. cholerae*, con 4 casos en total y una persona hospitalizada. La fuente de contaminación se atribuyó a la ingesta de comidas preparadas.

Por último, los casos notificados en Europa, en el periodo 2018-2022 (EFSA/ECDC, 2023) muestran un aumento de los casos reportados en el año 2022 (26), en línea con los notificados en los años 2018 y 2019. Asimismo, en 2022, cerca de un 20 % de los mismos necesitaron hospitalización (5) mientras que un 82,6 % se asociaron a casos relacionados con viajes. En relación con la distribución de los casos por grupos etarios, la mayor parte de los mismos tuvieron lugar entre personas de entre 25 y 64 años de edad, con más de un 50 % del total de notificaciones.

#### 4. Criterios microbiológicos aplicados en la Unión Europea para *V. cholerae* en productos de la pesca

A fecha de elaboración del presente informe, la legislación europea carece de criterios microbiológicos armonizados para la monitorización de la contaminación por *Vibrio* spp. en productos de la pesca.

En algunos países, se considera una distinción entre aquellos alimentos cocidos listos para el consumo y los que no lo son, debido, fundamentalmente, al mayor riesgo asociado al consumo de langostinos cocidos en relación con los productos crudos, ya que estos últimos se someten a tratamiento térmico. En algunos casos, se tiene en cuenta la presencia de cepas *ctx* positivas de *V. cholerae* pero, en otros casos, no se tiene en cuenta este criterio. Otros criterios que se aplican están basados en considerar las especies de *Vibrio* más importantes relacionadas con los productos de la pesca crudos y transformados, y no tienen en cuenta los factores de patogenicidad a la hora de realizar las pruebas. Si no se consideran factores de patogenicidad y un lote resulta positivo, aplican el artículo 14 relativo a los requisitos de seguridad alimentaria del Reglamento (CE) N° 178/2002 (UE, 2002). Mediante este reglamento, se faculta a las autoridades competentes para que puedan tomar las medidas adecuadas para imponer restricciones a su comercialización o exigir su retirada del mercado cuando existan indicios de que el alimento no es seguro. Por último, cabe destacar que hay países que no consideran apropiado el rechazo de envíos solo en base al artículo 14 del Reglamento (CE) N° 178/2002 (UE, 2002).

En 2010, el *Codex Alimentarius* publicó unas directrices generales para el control de vibrios patógenos en los alimentos de origen marino (CAC/GL 73-2010) (Codex Alimentarius, 2010). Sin embargo, no proporcionaron unos criterios microbiológicos definitivos, aunque sí indicaba la necesidad de mejorar los enfoques microbiológicos en este apartado. Tal y como se indica en la introducción del presente informe, el Reglamento (CE) N° 2073/2005 (UE, 2005) establece los criterios microbiológicos para los productos alimenticios producidos y comercializados en Europa, pero no incluye criterios microbiológicos específicos para *Vibrio* spp.

En el caso de España, se aplica un criterio de tolerancia cero (ausencia en 25 g) en los puestos de control fronterizos para *V. cholerae* sin distinción entre serogrupos, siguiendo la recomendación de la AESAN en su Informe del Comité Científico sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección fronterizos, a productos pesqueros importados (AESAN, 2010). En el caso de serogrupos no-O1/no-O139, se recomienda identificar los productos que puedan presentar un mayor riesgo para el consumidor y adoptar medidas de vigilancia efectivas sobre los que pudieran ser aislados de muestras ambientales, clínicas o de origen alimentario. Además, en dicho informe se valora la importancia que pueden tener las especies de este género en la contaminación de productos de la pesca y como, a pesar del escaso riesgo que existe en nuestro país, es necesario mantener un control estricto por parte de las autoridades sanitarias.

Por su parte, las directrices italianas relacionadas con los Reglamentos (CE) N° 882/2004 (UE, 2004a) y 854/2004 (UE, 2004b) especifican *V. cholerae* (O1, O139, no-O1/no-O139) y *V. parahaemolyticus* como peligros a controlar en los productos de la pesca durante los controles oficiales. Además, sus directrices mencionan los métodos adecuados para la detección de especies de *Vibrio* potencialmente enteropatógenas (Rahman et al., 2023). Aunque el Reglamento (UE) 2017/625 (UE, 2017) deroga los reglamentos anteriores (Reglamentos (CE) N° 882/2004 (UE, 2004a) y 854/2004 (UE, 2004b)), las directrices siguen siendo válidas en Italia según la nota N° 0069887/2019 (Ministero della Salute, 2019).

De acuerdo con la Opinión N° 011/2022 del *Bundesinstitut für Risikobewertung* (BfR, 2022), y dado que, actualmente, no existe ninguna normativa de la Unión Europea que establezca valores límite microbiológicos para los vibrios en los productos de la pesca, se establece aplicar las siguientes recomendaciones a alimentos, tanto crudos como cocidos listos para el consumo:

- Ausencia de cepas pandémicas de *V. cholerae* O1, O139 con CTX (portadoras del gen *ctx*), y de cepas *ctx* positivas de otros serogrupos.
- Ausencia de *V. vulnificus*.
- Ausencia de cepas de *V. parahaemolyticus* formadoras de toxinas (*tdh+*, *trh+*).

La Instrucción Técnica DGAL/SDSSA/2024-73 del *Ministère de L'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire* francés (MASA, 2024) tiene por objeto definir los criterios para juzgar la conformidad de un lote de productos de la pesca o moluscos bivalvos vivos que se encuentren contaminados con *Vibrio* spp. en los controles oficiales. Esta actualización de la información contenida en la Instrucción Técnica previa DGAL/SDSSA/2023-117 (MASA, 2023), regula, en particular, la posibilidad de realizar tratamientos térmicos para determinados lotes de productos de la pesca contaminados. Entre otros, la Instrucción se aplica en las importaciones, en el caso particular de los controles reforzados (*IOC, contrôles renforcés a l'import*) relativos a la búsqueda de *V. cholerae* en langostinos congelados. Estos controles reforzados están validados por la Comisión Europea y los lotes deben enviarse a la aduana a la espera del resultado del análisis. La Tabla 1 indica las especies de *Vibrio* spp. consideradas patógenas que pueden dar lugar a un resultado no conforme, en el marco de un control oficial, es decir, realizado en el marco de un plan de vigilancia, de control reforzado o tras un brote alimentario.

**Tabla 1.** Especies de *Vibrio* consideradas patógenas que pueden dar lugar a un resultado no conforme, en el marco de un control oficial

Especies de <i>Vibrio</i> patógenas	Matriz alimentaria	Plan de muestreo	Límite	Método
<i>Vibrio cholerae</i> O1 u O139 <i>Vibrio cholerae</i> no-O1/no-O139 pero portador del gen <i>ctx</i> codificante para la toxina del cólera	Productos de pesca y moluscos bivalvos vivos	n= 5 (*) c= 0	Ausencia en 25 g de carne y líquido intravalvar para moluscos bivalvos <sup>a*</sup> o Ausencia en 25 g de carne para los productos de la pesca <sup>b*</sup>	Norma NF EN ISO 21872-1 en vigor
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> portador de, al menos, de uno de los genes de hemolisina ( <i>tdh+</i> o <i>trh+</i> o <i>tdh+/trh+</i> )				
<i>Vibrio vulnificus</i>				

\*En caso de toxiinfección alimentaria colectiva, el análisis se adaptará al número y tamaño de las muestras restantes.

<sup>a</sup>Un mínimo de 12 ostras; 30-40 mejillones y conchas; 20-30 almejas.

<sup>b</sup>Productos de la pesca para descascarar como crustáceos enteros y pescados enteros.

**Fuente:** (MASA, 2024).

Para que la muestra cumpla con los requisitos, ninguna de las cinco unidades de muestreo, cada una analizada por separado, debe mostrar la presencia de especies de *Vibrio* patógenas (n= 5 y c= 0).

En el caso particular del refuerzo de los controles de importación, la investigación solo se refiere a *V. cholerae*, donde cualquier detección conduce a declarar “no conforme”, independientemente del serogrupo y de si el gen *ctx* está presente o no.

Hay otras especies de *Vibrio* que se consideran no patógenas. En consecuencia, podrán comercializarse lotes contaminados por *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. carchariae*, *V. metschnikovii*, *V. furnissii*, *V. cincinnatiensis* o por otros vibrios cuyas especies no están identificadas.

La Tabla 2 resume los criterios para juzgar la conformidad de un lote de productos de la pesca o moluscos bivalvos vivos contaminados por *Vibrio* spp. siguiendo controles oficiales, de acuerdo con la Instrucción Técnica DGAL/SDSSA/2024-73 (MASA, 2024).



**Tabla 2.** Criterios para juzgar la conformidad de un lote de productos de la pesca o moluscos bivalvos vivos contaminados por *Vibrio* spp. en los controles oficiales

Especie de <i>Vibrio</i>		Medidas de gestión
<i>Vibrio cholerae</i> (PSCP o intoxicación posterior)	Pertenece a los serogrupos O1 u O139	Lote no conforme, retirada del mercado Tratamiento térmico posible, con condiciones
	No-O1/no-O139 pero portador del gen <i>ctx</i> que codifica para la toxina del cólera	
	No-O1/no-O139 y no posee el gen <i>ctx</i> que codifica la toxina del cólera	Sin medidas de intervención
<i>Vibrio cholerae</i> (caso particular de control reforzado)	Todos	Lote no conforme, retirada del mercado Tratamiento térmico posible, con condiciones
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Poseer al menos uno de los genes de hemolisina ( <i>tdh+</i> o <i>trh+</i> o <i>tdh+/trh+</i> )	Lote no conforme, retirada del mercado Tratamiento térmico posible, con condiciones
	No tener los genes de hemolisina ( <i>tdh</i> o <i>trh</i> )	Sin medidas de intervención
<i>Vibrio vulnificus</i>		Lote no conforme, retirada del mercado Tratamiento térmico posible, con condiciones
Otras especies de <i>Vibrio</i>		Sin medidas de intervención

PSCP: Planes de Seguimiento y Planes de Control.

Fuente: (MASA, 2024).

Los lotes no conformes deberán retirarse del mercado, identificarse como subproductos animales no destinados a consumo humano de la categoría 2 lo antes posible y tratarse como tales de conformidad con el artículo 13 del Reglamento (CE) N° 1069/2009 (UE, 2009).

Sin embargo, de conformidad con el Reglamento (CE) N° 2073/2005 (artículo 7, apartado 2) (UE, 2005), se podrá aceptar un tratamiento térmico para destinar los productos a consumo humano, y que tiene como objetivo la destrucción de la bacteria. Para ello, la Instrucción Técnica establece una serie de condiciones:

1. Los productos sean inicialmente crudos, destinados al consumidor final, y no hayan llegado al comercio minorista.
2. El operador justifique un valor mínimo de pasteurización (VP) de 3 en su proceso de cocción/tratamiento térmico.
3. Se actualizará el expediente de intervención de estos lotes que se sabe que están contaminados (detección dentro del marco del control reforzado).

Como parte del control reforzado, la DDPP (*Direction Départementale de la Protection des Populations*) del departamento de destino debe aceptar el procesamiento con antelación, antes de que el puesto de inspección fronterizo entregue el lote al establecimiento de cocina. Luego, la DDPP debe completar el software TRACES.

En buena parte, la falta de normas para *Vibrio* spp. en los alimentos procedentes de la pesca se ha debido, durante mucho tiempo, a la ausencia de métodos discriminatorios adecuados y validados. La base de los procedimientos microbiológicos para la detección de vibrios en alimentos es la norma UNE-EN ISO 21872-1:2017 Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la determinación de *Vibrio* spp. Parte 1: Detección de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio vulnificus* potencialmente enteropatógenos (UNE-EN ISO, 2017). La Comisión Europea encomendó al Comité Europeo de Normalización (CEN) la tarea de proporcionar datos de validación para 15 métodos microbiológicos que pudiesen apoyar el desarrollo de la legislación comunitaria. Los resultados de esta validación han permitido la integración de las dos especificaciones técnicas existentes destinadas a la detección de las principales *Vibrio* spp. transmitidas por los alimentos, la simplificación del conjunto de pruebas de identificación bioquímica recomendadas y la introducción de procedimientos moleculares que proporcionan tanto la identificación a nivel de especie como la discriminación de cepas patógenas de *V. parahaemolyticus*. Los resultados de estas validaciones se plasmaron en la norma revisada UNE-EN ISO 21872-1:2017, publicada en julio de 2017 (UNE-EN ISO, 2017).

## 5. Valoración del riesgo asociada a los serogrupos de *V. cholerae* en langostinos congelados crudos y cocidos listos para el consumo

Para poder entender la magnitud del riesgo potencial asociado a la presencia de *V. cholerae* en langostinos congelados crudos y cocidos listos para el consumo, es necesario considerar las tendencias de consumo de estos productos en España. Según los datos aportados en el Informe del Consumo Alimentario en España de 2022 (MAPA, 2023), el consumo per cápita anual de gambas y langostinos ha sido de 1,95 kg, un 12,5 % menos que hace 1 año. Sin embargo, si se tiene en cuenta la distribución por tipo de especie de mariscos a cierre de año 2022, se puede observar que los langostinos/gambas representan más de una cuarta parte del mercado con un 28,3 % del volumen, ganando relevancia con respecto al año anterior, cuando su peso era del 27,9 %. Dentro del consumo de langostinos, en proporción, el consumo de producto congelado asciende a un 58 %, mientras que los langostinos frescos y cocidos suponen una cuota de consumo del 26 % cada uno (Mercasa, 2022).

De acuerdo con las principales fuentes de transmisión, los serogrupos de *V. cholerae* asociados a la enfermedad del cólera proceden de la ingesta de agua o alimentos de origen marino contaminados, principalmente debido a su amplia diseminación en ambientes marinos.

Estudios previos han demostrado que existe una asociación entre los niveles de zooplancton en el agua y la adhesión de *V. cholerae* al exoesqueleto de los crustáceos (Magny et al., 2011). Sin embargo, la prevalencia de especies de *V. cholerae* causantes de enfermedad resulta muy variable, dependiendo de factores ambientales y condiciones de manipulación durante la captura. En países con mayor incidencia de enfermedad del cólera, existen personas asintomáticas portadoras que pueden transmitir el patógeno a los alimentos durante la manipulación.

Con objeto de poder valorar el impacto de la contaminación por *V. cholerae*, así como por otras especies de *Vibrio*, desde hace años se han hecho estudios de Evaluaciones del Riesgo Microbio-

lógico (ERM) asociados a productos derivados de la pesca y aguas. En el caso de la contaminación por especies patógenas de *Vibrio* en agua marina, el riesgo microbiológico asociado es bajo ( $<5 \times 10^{-4}$ ), tal y como se demuestra en algunas ERM realizadas a tal efecto (Dickinson et al., 2013). La infección suele producirse por la entrada del patógeno a través de heridas y contacto con las mucosas.

En relación con la contaminación a través de los alimentos, desde 2001, organizaciones como FAO/OMS han desarrollado ERM destinadas a estimar el riesgo asociado a especies de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* en productos de la pesca (FAO/OMS, 2005a, b, 2011, 2016, 2020). Con respecto a *V. cholerae* O1 y O139, destaca la ERM en gambas importadas procedentes de aguas templadas (FAO/OMS, 2005b). En el desarrollo de la ERM se procedió a recopilar información acerca de las condiciones de captura, procesado, preparación y consumo, desarrollándose ERM de tipo cualitativo y cuantitativo. Según los resultados aportados, en líneas generales, el riesgo atribuido a la enfermedad por la ingesta de gambas contaminadas se consideró bajo, con valores entre 0,009 y 0,9 casos/país/año. El riesgo medio se situó entre 2 y 9 casos de enfermedad/10<sup>9</sup> raciones de producto. Sin embargo, la falta de información impidió distinguir entre productos congelados crudos y cocidos listos para el consumo y, además, no se consideró en aquel entonces el riesgo emergente que supone el incremento de otros serogrupos no-O1/no-O139.

A pesar de que el riesgo atribuible a la presencia de *V. cholerae* O1 y O139 en alimentos contaminados se cataloga como bajo, en los últimos años ha habido un incremento en la detección de especies de *V. cholerae* no-O1/no-O139 en partidas de productos de la pesca contaminadas que han sido objeto de estudio en diversas ERM. López-Hernández et al. (2022) desarrollaron una ERM asociada al consumo de ostión crudo contaminado con *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en México. Los resultados obtenidos mostraron que el riesgo promedio por consumir ostión crudo sin refrigerar durante 10 horas y contaminado con *V. cholerae* no-O1/no-O139 *ctxA+* se estimó de 99 casos/100 000 porciones en verano, 1,5-6,6 veces mayor al calculado para las otras estaciones. Sin embargo, el riesgo promedio es clasificado como bajo. En contraste, el riesgo en ostiones con 24 horas sin refrigeración durante el verano fue 42,4 veces mayor al calculado con 10 horas sin refrigeración. Oh et al. (2021) desarrollaron una ERM de *V. cholerae* no-O1/no-O139 asociada al consumo de pulpo sin cocinar en Corea de Sur. Según los datos aportados, al igual que el estudio anterior, la probabilidad de contraer enfermedad fue muy baja, con un valor promedio de  $7,08 \times 10^{-13}$ . Por tanto, a pesar del incremento en la incidencia de serogrupos no-O1/no-O139, en función de la información disponible, el riesgo asociado a la infección por parte de *V. cholerae* debida al consumo de marisco contaminado se cataloga como bajo o muy bajo.

Recientemente, se publicó una revisión de los avances y herramientas de ERM de especies de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en productos de la pesca (FAO/OMS, 2021). En este documento, se pone de manifiesto que existe una creciente preocupación por los efectos causados por el cambio climático sobre la diseminación de patógenos alimentarios presentes en ambientes marinos, como las especies de *Vibrio*. A nivel mundial, el calentamiento oceánico ha aumentado significativamente en las áreas adecuadas para la proliferación de especies de *Vibrio* patógenas y causar enfermedades en los seres humanos (Watts et al., 2019). De hecho, existen estudios que apuntan a una corre-

lación entre el incremento de temperatura de las aguas y el riesgo asociado a especies emergentes de *Vibrio* (Baker-Austin, 2013). Además, *Vibrio* spp. presenta un tiempo de duplicación relativamente bajo en comparación con otras especies bacterianas, lo que los hace altamente sensibles a estímulos ambientales favorables, como temperaturas superiores a 15 °C (Baker-Austin et al., 2016) (FAO/OMS, 2021). Por ello, las infecciones causadas por estos patógenos se están reportando ahora en áreas con poca o ninguna incidencia previa, con claras implicaciones para el riesgo futuro.

En relación con las dosis infectivas, existe una gran variabilidad de los datos utilizados las distintas ERM. En cualquier caso, el número de datos asociados a las relaciones dosis-respuesta de *V. cholerae* es limitado. En el caso de que la ingesta suceda a través de agua contaminada, se estima que se necesita una dosis superior para causar enfermedad ( $10^3$ - $10^6$  UFC), mientras que cuando se asocia a alimentos contaminados, normalmente las dosis infectivas son inferiores ( $10^2$ - $10^4$  UFC) debido al efecto neutralizante del alimento del ácido estomacal (Seas y Gotuzzo, 2010). Otros estudios apuntan a que se requiere la ingesta de una dosis alta ( $10^8$  UFC) para causar cólera grave en voluntarios sanos, mientras que una dosis más baja ( $10^5$  UFC) es suficiente cuando se administra junto con antiácidos para neutralizar el pH del estómago (Sack et al., 2004). Estos valores concuerdan con otros modelos dosis-respuesta desarrollados para *V. cholerae*, en los que se muestra un incremento de la enfermedad a partir de dosis superiores a  $10^2$  UFC (QMRA Wiki, 2024) con estimaciones de dosis equivalentes ( $N_{50}$ ) a  $6,82 \times 10^3$  UFC, bajo las cuales un 50 % de los individuos contraerían enfermedad, las cuales son similares a las reportadas por Watson et al. (2018). Otros estudios muestran que las dosis pueden ser muy variables en función de la capacidad de producción de ácido en el estómago, situándose entre  $10^3$  y  $10^8$  UFC.

En la última década, se han desarrollado una variedad de enfoques de EMR utilizando herramientas de teledetección basadas en satélites para estudiar sistemas marinos, las cuales han sido útiles para la estimación del riesgo para la salud humana asociado a *Vibrio* spp. (Grimes et al., 2014). Estos métodos de aplicación global se han utilizado, principalmente, para analizar cepas de *Vibrio* no-O1/no-O139, procedentes de aguas recreativas y de brotes asociados con el consumo de alimentos de origen marino (Semenza et al., 2017). Estos enfoques se han utilizado con éxito para analizar condiciones ambientales como temperatura y salinidad, que son variables bien establecidas que pueden modular el riesgo de vibriosis. Numerosos estudios, como los que se centran en aguas de baño y las infecciones asociadas con alimentos de origen marino, han demostrado la utilidad de estos métodos para atribuir un mayor riesgo antes y durante los episodios de brotes (Baker-Austin et al., 2016). Asimismo, destaca el desarrollo de la herramienta de gestión *Vibrio Suitability Tool* que predice el riesgo asociado a la presencia de *Vibrio* spp. en aguas procedentes del Mar Báltico de acuerdo con las variables de temperatura y salinidad (ECDC, 2024). El modelo está basado en datos procedentes de cepas de *V. cholerae* no-O1/no-O139 y es capaz de estimar el área geográfica donde se pueden desarrollar condiciones ambientales favorables para la presencia de especies patógenas de *Vibrio*.

Un factor de riesgo clave para las gambas y langostinos cocidos listos para el consumo es la contaminación microbiológica posterior al proceso de cocción. Prácticas deficientes de manejo posterior a la cocción, como el uso de agua de mar o agua potable contaminada para enfriar los camarones y langostinos cocidos, pueden provocar la contaminación por *V. cholerae*. Asimismo,

la contaminación cruzada con productos crudos contaminados, seguida de un abuso de temperatura de almacenamiento puede aumentar el riesgo para el consumidor debido a la presencia de *V. cholerae* (FSANZ, 2005) (ICMSF, 2005). En cuanto a la posibilidad de transmisión del patógeno a través del agua de descongelación, no existen hasta la fecha evidencias constatables al respecto. No obstante, hay que tener en cuenta que debido al efecto de la congelación sobre la reducción de la viabilidad de *V. cholerae* y a los bajos niveles de contaminación presentes en productos de la pesca, la probabilidad de su diseminación a través del agua de descongelación a otros productos se considera muy baja. Debe evitarse la contaminación cruzada entre alimentos. En particular, en la presentación de productos de la pesca sobre hielo en los mostradores de venta en el comercio minorista debe organizarse de tal manera que el hielo y el agua helada no se mezclen ni se reutilicen entre productos separados. En consecuencia, el almacenamiento y presentación de los productos del mar deben organizarse mediante el uso de contenedores separados o disponerse con la suficiente separación física para que no haya contaminación. El uso de agua potable, así como el seguimiento de unas Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Críticos de Control (APPCC) se antoja fundamental para minimizar el riesgo de contaminación del producto.

## 6. Mitigación del riesgo asociado a *V. cholerae* en alimentos

Para controlar el cólera, disminuir su incidencia y reducir el número de muertes que causa esta enfermedad es necesario adoptar criterios multidisciplinarios que involucran diversos aspectos como (i) la vigilancia y el conocimiento del patógeno, (ii) el tratamiento y saneamiento de las aguas de bebida y residuales, (iii) el correcto procesamiento, transporte y conservación de los alimentos, (iv) la higiene personal, (v) el adecuado tratamiento de la enfermedad, y (vi) la prevención de la misma mediante vacunas. Algunas de estas medidas se pueden abordar de forma conjunta mediante la aplicación de BPH y de un sistema de APPCC, lo que permitiría identificar, a lo largo de toda la cadena de valor, las prácticas y procesos que presentan mayores riesgos.

En el caso de productos de la pesca, los alimentos con mayor capacidad de transmitir *V. cholerae*, los puntos decisivos para el control incluyen el tratamiento de las aguas de cría, tratamientos de depuración, una adecuada conservación y transporte a baja temperatura (en refrigeración o congelación) de productos crudos y elaborados, y una cuidadosa higiene de los utensilios de trabajo y de los manipuladores (FAO/OMS, 2005b). A este último respecto, algunas estadísticas oficiales muestran que el lavado de las manos con jabón de los operarios reduce el riesgo de enfermedades diarreicas a la mitad (Osei-Asare et al., 2020).

A continuación, se detallan los factores que influyen en la supervivencia, así como las medidas de prevención y control de *V. cholerae* en alimentos.

### 6.1 Factores que influyen en la supervivencia de *V. cholerae* en alimentos

La temperatura óptima de crecimiento de *V. cholerae* es de 37 °C. Sin embargo, este patógeno puede crecer en el intervalo de 10 y 43 °C. El pH óptimo para el crecimiento es de 7,6, pero puede desarrollarse en el intervalo de 5,0 a 9,6. La actividad de agua ( $a_w$ ) óptima de *V. cholerae* es de 0,984, aunque puede desarrollarse entre 0,998 y 0,970. Adicionalmente, *V. cholerae* puede crecer con un

rango de cloruro sódico entre 0,1 y 4,0 %, siendo su valor óptimo 0,5 % de cloruro sódico (Singleton et al., 1982) (Huq et al., 1984) (ICMSF, 1996).

## 6.2 Medidas de prevención y control de *V. cholerae*

### 6.2.1 Desinfección de agua

La cloración es una medida higiénica fundamental para la eliminación de patógenos del agua. En general, el cloro resulta muy eficaz en la eliminación de *V. cholerae*. Sin embargo, hay pocos datos sobre su acción en diferentes tipos de agua (dulce *versus* salada) o bajo distintos regímenes de dosificación. Por este motivo, se recomienda realizar más investigaciones para establecer dosis de cloro adecuadas y determinar concentraciones que no afecten a propiedades sensoriales como sabor y olor (String et al., 2022). En acuicultura, la cloración se suele realizar en los tanques de cría o engorde de productos de la pesca, pero la medida no se puede implementar en aguas abiertas.

Adicionalmente a la cloración, el desarrollo de nuevas tecnologías que sean tan o más eficaces y al mismo tiempo más respetuosas con la salud y el medio ambiente sigue siendo un desafío científico y técnico. En este sentido, debido a que requiere un tiempo de contacto corto, la radiación ultravioleta (UV) se utiliza cada vez más para la desinfección de aguas. El tratamiento con radiación UV es suficiente para inactivar los vibrios que se liberan al agua durante la depuración (Chen et al., 2018).

### 6.2.2 Depuración de moluscos

La depuración es un proceso de eliminación de patógenos habitual que se realiza en moluscos antes de su salida al mercado. Consiste en mantenerlos en agua libre de gérmenes para que “purguen” las bacterias patógenas. Los parámetros clave del proceso incluyen el tiempo, la temperatura, la salinidad y la intensidad de la corriente (Campbell et al., 2022). La depuración de *V. cholerae* tiene un efecto limitado cuando se realiza a temperatura ambiente (Eyles and Davey, 1984). A unos 20 °C, la depuración de ostras contaminadas con *V. vulnificus* (especie próxima a *V. cholerae*) requiere de, al menos, 16 días (Kelly and Dinuzzo, 1985). La disminución de la temperatura del agua a 15 °C aumenta la eficacia de la depuración, pero temperaturas inferiores (entre 5 y 10 °C) parecen reducirla (Chae et al., 2009).

### 6.2.3 Temperatura de almacenamiento

La multiplicación de *V. cholerae* en alimentos está influenciada por la temperatura, y tanto la refrigeración como la congelación retardan su desarrollo y reducen su concentración. La bacteria, sin embargo, puede permanecer viable con ambos tratamientos por un tiempo que depende de la carga microbiana y de las condiciones de almacenamiento, como se ha demostrado en diversos experimentos. En homogenizado de gambas inoculado con una concentración de 7,8 log UFC/g, conservado a 7 °C, se ha observado una supervivencia de *V. cholerae* O1 de hasta 21 días (Reilly y Hackney, 1985). En gambas crudas con un recuento inicial de 5 log UFC/g, se observó una supervivencia de entre 4 y 9 días a 5 y 10 °C, respectivamente (Pesigan et al., 1967). En congelación, se ha comprobado una supervivencia de *V. cholerae* superior a los 3 meses en función de la temperatura (ICMSF, 1996) (Waturangi et al., 2015). En alimentos frescos, incluido pescado de agua dulce, *V.*

*cholerae* O1 permanece viable hasta 90 días a -5 °C y hasta 30 días a -25 °C. La conservación a temperaturas entre los -12 y -20 °C durante 15 y 60 días redujo la concentración del patógeno en langostino congelado cocido entre 2 y 6 log UFC/g (Nascimento et al., 1998). Las etapas previas de lavado y puesta en hielo del producto pueden reducir de forma adicional la carga de *V. cholerae* en 3 log UFC/g (Sumner, 2011).

#### 6.2.4 Tratamiento térmico

*V. cholerae* es un microorganismo termolábil, por lo que el tratamiento térmico es una medida eficaz para su inactivación en alimentos. Presenta un valor D (tiempo en minutos para destruir el 90 % de la población) de 2,65 a 60 °C (ICMSF, 1996). Un tratamiento de 1-2 minutos a 80 °C, redujo los recuentos en algo más de 7 ciclos logarítmicos en gambas peladas (Nascimento et al., 1998). Torres-Vitela et al. (2000) concluyeron que un tratamiento de ebullición durante 3 minutos era capaz de reducir en 8 log UFC/g la carga de *V. cholerae* O1 sin modificar de manera significativa el color, olor y aroma de ceviche preparado con pescado tratado. La reducción del patógeno es importante incluso con tratamientos a menor temperatura. Así, el calentamiento de arroz, pescado y carne durante 20 minutos a temperaturas entre 50 y 60 °C (pasteurización fría) parece ser suficiente para eliminar *V. cholerae* O1 (Nascimento et al., 1998). Las agencias de seguridad alimentaria consideran que alcanzar una temperatura de 70 °C durante 2 minutos en el interior de productos del mar es suficiente para la inactivación de *Vibrio* spp. (Wright and Schneider, 2010) (BfR, 2022).

#### 6.2.5 Aditivos

El metabisulfito de sodio (E 223) está autorizado como aditivo alimentario en moluscos y crustáceos de acuerdo al Reglamento (CE) N.º 1333/2008 (UE, 2008). Según Januário y Dicks (2008), la adición de metabisulfito (al 1 %) podría reducir el crecimiento de *V. cholerae* en condiciones comerciales de refrigeración.

#### 6.2.6 Altas presiones hidrostáticas

Las Altas Presiones Hidrostáticas (APH) son una tecnología no térmica de procesamiento de alimentos capaz de inactivar patógenos y reducir la carga microbiana. El tratamiento de productos de la pesca con APH reduce los riesgos microbiológicos, aumenta la vida útil y tiene pocos efectos nocivos sobre la calidad sensorial. *Vibrio* spp. es sensible al tratamiento con APH. La efectividad de dicho tratamiento aumenta combinado con temperaturas moderadas, tanto de calentamiento (Ye et al., 2012) como de enfriamiento. El tratamiento de cepas de varias especies y serogrupos de *Vibrio* a 250-300 MPa durante 10 minutos a 25 °C redujo la concentración de las cepas ensayadas por debajo del límite de detección (Berlin et al., 1999). Por su parte, un tratamiento de 150 MPa durante 4 minutos combinado con temperaturas de congelación (-2 °C), fue capaz de reducir en 4,7 log UFC/g la carga microbiana de *Vibrio* en ostras frescas (Kural y Chen, 2008). La combinación de tratamientos suaves de APH (250-300 MPa durante 2 minutos a 21 °C) seguida de un almacenamiento en refrigeración (en hielo, durante 5-10 días) o congelado (-18 °C, durante 7 días), resultó ser suficiente para la inactivación completa (reducción >7 log UFC/g) de *V. parahaemolyticus* (Ye et al., 2013).

### 6.3 Vacunas

Las vacunas son herramientas útiles y eficaces para prevenir las infecciones microbianas. En los países en los que *V. cholerae* es endémico y hay grandes posibilidades de contraer la enfermedad, la vacunación masiva supone una buena forma para controlar el cólera. La infección por *V. cholerae*, además, confiere una fuerte inmunidad, lo que subraya la viabilidad de la vacunación preventiva (Mathebula et al., 2023). Autorizadas por la OMS, en la actualidad se dispone de tres marcas comerciales diferentes de vacuna anticolérica oral (OMS, 2017). Las tres requieren de dos dosis para lograr una protección plena.

### 6.4 Métodos no autorizados

En una fase inicial de desarrollo y sin autorización para su empleo en alimentos, podemos mencionar tratamientos experimentales como la utilización de bacteriófagos contra *V. cholerae* o de bacterias depredadoras del género *Bdellovibrio*. Los virus bacterianos son las entidades biológicas más abundantes en el planeta y los enemigos naturales de las bacterias. La administración de cócteles de fagos activos contra *V. cholerae* podría utilizarse en los tanques o estanques de cría de productos de la pesca (Mittal et al., 2023). Las especies de *Bdellovibrio*, por su parte, pudieran utilizarse para la eliminación de *V. cholerae* del agua (Cao et al., 2015).

En la desinfección del agua, se investiga también en la fotocatalisis. Esta tecnología se basa en la interacción de nanopartículas semiconductoras ligeras y sólidas con luz UV, lo que genera especies de oxígeno reactivas (Wennberg et al., 2013). Los catalizadores de  $\text{TiO}_2$  y  $\text{ZnO}$  son económicos, estructuralmente estables y no son tóxicos (Das et al., 2015). Por su simplicidad y rentabilidad, está centrando también la atención la fotocatalisis asistida por luz solar (Chatterjee et al., 2021).

La FDA (*Food and Drug Administration*) aprobó, en el año 2005, la utilización de los rayos gamma y X para reducir la contaminación en mariscos (FDA, 2005). La aplicación de dosis bajas de radiaciones ionizantes (de hasta 10 kGy) está autorizada en España para eliminar bacterias patógenas no esporuladas de algunos alimentos, pero no en productos de la pesca (BOE, 2001).

## Conclusiones del Comité Científico

En el presente informe se describen los principales factores asociados al riesgo de la presencia de *V. cholerae* en productos de la pesca, incluidos los langostinos congelados. Los datos más recientes acerca de la prevalencia y brotes de infección alimentaria causados por especies patógenas indican un riesgo bajo, principalmente asociado a casos esporádicos de ingesta de alimentos con alto grado de contaminación o prácticas de elaboración y almacenamiento deficientes. No obstante, esta valoración puede cambiar en el futuro en función de la evolución de las condiciones climáticas en los próximos años, así como de las mejoras en la recogida de datos.

En el caso de las cepas pertenecientes a los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae*, así como las cepas no-O1/no-O139 que portan el gen *ctx* que codifica para la toxina del cólera, su prevalencia en langostinos y otros productos de la pesca congelados importados es baja en base a la evidencia disponible al respecto. Asimismo, se considera que la transmisión del patógeno a través de los alimentos contaminados o del agua de procesado supone un riesgo bajo para el consumidor,



según las estimaciones publicadas en las distintas Evaluaciones del Riesgo Microbiológico. No obstante, debido a la sintomatología de la enfermedad (especialmente en población vulnerable) y a su rápida transmisión, se recomienda seguir aplicando un criterio de ausencia en 25 g en estos productos.

Por otro lado, a la luz de la información disponible, se ha observado un incremento de la presencia de cepas de *V. cholerae* no-01/no-0139 no toxigénicas, posiblemente debido a diferentes factores ambientales asociados con el cambio climático. La patogenicidad de estos serogrupos emergentes a través de la ingesta de alimentos contaminados no está aún bien definida. Sin embargo, en las Evaluaciones del Riesgo Microbiológico publicadas se ha visto que la probabilidad de contraer enfermedad es muy baja. Por tanto, dado el bajo nivel de riesgo de estos serogrupos para la población general, no parece necesaria, por el momento, la implementación de medidas relacionadas con la aplicación de criterios microbiológicos más allá del cumplimiento de unas Buenas Prácticas de Higiene a lo largo de cadena producción-consumo.

Con respecto al riesgo para el consumidor derivado de la presencia de *V. cholerae* en langostinos y otros productos de la pesca congelados crudos, las fases previas de lavado y puesta en hielo, junto con la aplicación de un proceso de congelación, pueden reducir la concentración del patógeno. Los tratamientos de cocción a 70 °C durante 2 minutos en el centro del producto garantizan la eliminación de *V. cholerae*. El riesgo asociado a la ingesta de langostinos congelados cocidos listos para el consumo y otros productos de la pesca está relacionado con una contaminación posterior a la cocción. Dado que el producto no se somete a ningún tratamiento de inactivación tras la cocción y con carácter previo al consumo, se hace necesario el seguimiento de unas Buenas Prácticas de Higiene y los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Críticos de Control para reducir el riesgo de contaminación del producto.

## Referencias

- AESAN (2010). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicables, como medidas adicionales de control en los puntos de inspección fronterizos, a productos pesqueros importados. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, 12, pp: 9-36.
- Ali, M., Lopez, A.L., You, B., Kim, Y.A., Sah, Y.E., Maskery, B. y Clemens, J. (2012). The global burden of cholera. *Bulletin of the World Health Organization*, 90 (3), pp: 209-218A.
- Ali, M., Nelson, A.R., Lopez, A.L. y Sack, D.A. (2015). Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9 (6): e0003832, pp: 1-13.
- Amato, E., Riess, M., Thomas-Lopez, D., Linkevicius, M., Pitkänen, T., Wolkowicz, T., Rjabinina, J., Jernberg, C., Hjertqvist, M., MacDonald, E., Antony-Samy, J., Dalsgaard Bjerre, K., Salmenlinna, S., Fuursted, K., Hansen, A. y Naseer, U. (2022). Epidemiological and microbiological investigation of a large increase in vibriosis, northern Europe. *Euro Surveillance*, 27 (28): 2101088, pp: 1-12.
- Ansaruzzaman, M., Bhuiyan, A., Safa, A., Sultana, M., Mcuamule, A., Mondlane, C., Wang, X.Y., Deen, J.L., von Seidlein, L., Clemens, J.D., Lucas, M., Sack, D.A. y Nair, G.B. (2007). Genetic diversity of El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 with hybrid traits isolated from Bangladesh and Mozambique. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, pp: 443-449.

- Arteaga, M., Velasco, J., Rodríguez, S., Vidal, M., Arellano, C., Silva, F., Carreño, L.J., Vidal, R. y Montero, D.A. (2020). Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile, 2018. *Microbial Genomics*, 6 (3): e000340, pp: 1-8.
- Ayadian, A., Tang, L., Chen, Y., Morris, J.G., Olsen, P., Johnson, J.A., Nair, G.B. y Stine, O.C. (2015). Genetic relatedness of selected clinical and environmental non-O1/O139 *Vibrio cholerae*. *International Journal of Infectious Diseases*, 37, pp: 152-158.
- Azman, A.S., Rudolph, K.E., Cummings, D.A.T. y Lessler, J. (2013). The incubation period of cholera: a systematic review. *The Journal of Infection*, 66, pp: 432-438.
- Bagchi, K., Echeverria, P., Arthur, J.D., Sethabutr, O., Serichantalergs, O. y Hoge, C.W. (1993). Epidemic of diarrhea caused by *Vibrio cholerae* non-O1 that produced heat-stable toxin among Khmers in a camp in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*, 31 (5), pp: 1315-1317.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J., Hartnell, R., Taylor, N., Siitonen, A. y Martinez-Urtaza, J. (2013). Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3, pp: 73-77.
- Baker-Austin, C., Trinanes, J.A., Salmenlinna, S., Löfdahl, M., Siitonen, A., Taylor, N.G.H. y Martinez-Urtaza, J. (2016). Heat wave-associated vibriosis, Sweden and Finland, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 22 (7), pp: 1216-1220.
- Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F. y Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews*, 4, pp: 1-19.
- Barzelighi, M.H., Bakhshi, B. y Boustanshenas, M. (2016). Genetic determinants differences between *Vibrio cholerae* biotypes. *Infection, Epidemiology and Medicine*, 2, pp: 26-30.
- Berlin, D.L., Herson, D.S., Hicks, D.T. y Hoover, D.G. (1999). Response of pathogenic *Vibrio* species to high hydrostatic pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6), pp: 2776-2780.
- BfR (2022). Bundesinstitut für Risikobewertung. Bacterial foodborne *Vibrio* infections: health risk assessment of the occurrence of *Vibrio* spp. (non-cholera vibrios) in food. Disponible en: <https://www.bfr.bund.de/cm/349/bacterial-foodborne-vibrio-infections-health-risk-assessment-of-the-occurrence-of-vibrio-spp-in-food.pdf> [acceso: 7-03-24].
- Bhandari, M., Jennison, A.V., Rathnayake, I.U. y Huygens, F. (2021). Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* - A review. *Infection, Genetics and Evolution*, 89: 104726, pp: 1-11.
- Bhandari, M., Rathnayake, I.U., Huygens, F., Nguyen, S., Heron, B. y Jennison, A.V. (2023). Genomic and Evolutionary Insights into Australian Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains. *Microbiology Spectrum*, 11 (1): e03617-22, pp: 1-15.
- Bhusan Pal, B., Mohanty, A., Biswal, B., Nayak, S.R., Das, B.K. y Lenka, P.P. (2021). Haitian variant *Vibrio cholerae* O1 Ogawa caused cholera outbreaks in Odisha. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 39, pp: 513-517.
- BOE (2001). Real Decreto 348/2001, de 4 de abril, por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes. BOE N° 82 de 5 de abril de 2001, pp: 12825-12830.
- Budiman, A., Kurnia, K. y Waturangi, D.E. (2022). Prevalence and molecular characterization of *Vibrio cholerae* from fruits and salad vegetables sold in Jakarta, Indonesia, using most probable number and PCR. *BMC Research Notes*, 15 (1): 63, pp: 1-9.
- Calduch, J.V., Segarra, M.M., Colomina, J., Llorca, C. y Pascual, R. (2003). Sepsis por *Vibrio cholerae* no01 en paciente inmunodeprimida. *Anales de Medicina Interna*, 20, pp: 630-632.
- Campbell, V.M., Chouljenko, A. y Hall, S.G. (2022). Depuration of live oysters to reduce *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*: A review of ecology and processing parameters. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21 (4), pp: 3480-3506.
- Cao, H., An, J., Zheng, W. y He, S. (2015). *Vibrio cholerae* pathogen from the freshwater-cultured whiteleg shrimp *Penaeus vannamei* and control with *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 130, pp: 13-20.

- Carrascosa, C., Raheem, D., Ramos, F., Saraiva, A. y Raposo, A. (2021). Microbial biofilms in the food industry—a comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18 (4): 2014, pp: 1-31.
- Castello, A., Alio, V., Sciortino, S., Oliveri, G., Cardamone, C., Butera, G. y Costa, A. (2022). Occurrence and molecular characterization of potentially pathogenic *Vibrio* spp. in seafood collected in Sicily. *Microorganisms*, 11 (1): 53, pp: 1-11.
- Chae, M.J., Cheney, D. y 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 (2), pp: M62-M66.
- Chatterjee, T., Saha, T., Sarkar, P., Hoque, K.M., Chatterjee, B.K. y Chakrabarti, P. (2021). The gold nanoparticle reduces *Vibrio cholerae* pathogenesis by inhibition of biofilm formation and disruption of the production and structure of cholera toxin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 204: 111811.
- Chen, P.Y., Chu, X.N., Liu, L. y Hu, J.Y. (2018). Effect of salinity on medium- and low-pressure UV disinfection of *Vibrio cholerae*. *Water Science & Technology*, 77 (3-4), pp: 655-661.
- Chitov, T., Wongdao, S., Thatum, W., Puprae, T. y Sisuwan, P. (2009). Occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* species in raw, processed, and ready-to-eat seafood and seafood products. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 3 (1), pp: 88-98.
- Chun, J., Grim, C.J., Hasan, N.A., Lee, J.H., Choi, S.Y., Haley, B.J., Tavianid, E., Jeonc, Y.S., Kimc, D.W., Leea, J.H., Brettinf, T.S., Brucef, D.C., Challacombe, J.F., Detterf, J.C., Hanf, C.S., Munkf, A.C., Chertkovf, O., Meinckef, L., Saundersf, E., Waltersg, R.A., Huq, A., Nairh, G.B. y Colwel, R.R. (2009). Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (36), pp: 15442-15447.
- Clemens, J.D., Nair, G.B., Ahmed, T., Qadri, F. y Holmgren, J. (2017). Cholera. *Lancet*, 390, pp: 1539-1549.
- Codex Alimentarius (2010). Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH). Directrices sobre la aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos para el control de las especies patógenas de *Vibrio* en los alimentos de origen marino. CAC/GL 73-2010. Disponible en: [https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B73-2010%252FCXG\\_73s.pdf](https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/es/?Ink=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXG%2B73-2010%252FCXG_73s.pdf) [acceso: 7-03-24].
- Crump, J.A., Bopp, C.A., Greene, K.D., Kubota, K.A., Middendorf, R.L., Wells, J.G. y Mintz, E.D. (2003). Toxigenic *Vibrio cholerae* serogroup O141-associated cholera-like diarrhea and bloodstream infection in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*, 187 (5), pp: 866-868.
- Dalsgaard, A., Huss, H.H., H-Kittikun, H. y Larsen, J.L. (1995a). Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 28, pp: 101-113.
- Dalsgaard, A., Serichantalergs, O., Shimada, T., Sethabutu, O. y Echeverria, P. (1995b). Prevalence of *Vibrio cholerae* with heat stable enterotoxin (NAG-ST) and cholera toxin genes: restriction fragment length polymorphism of NAG-ST genes among *V. cholerae* O1 serogroups from major shrimp production area in Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, 43, pp: 216-220.
- Das, S., Sinha, S., Suar, M., Yun, S.I., Mishra, A. y Tripathy, S.K. (2015). Solar-photocatalytic disinfection of *Vibrio cholerae* by using Ag@ZnO core-shell structure nanocomposites. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 142, pp: 68-76.
- Deeb, R., Tuffor, D., Scott, G.I., Moore, J.G. y Dow, K. (2018). Impact of climate change on *Vibrio vulnificus* abundance and exposure risk. *Estuaries and Coasts*, 41 (8), pp: 2289-2303.
- Dickinson, G., Lim, K.Y. y Jiang, S.C. (2013). Quantitative Microbial Risk Assessment of Pathogenic Vibrios in Marine Recreational Waters of Southern California. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, pp: 294-302.
- Dutta, D., Chowdhury, G., Pazhani, G.P., Guin, S., Dutta, S., Ghosh, S., Rajendran, K., Nandy, R.K., Mukhopadhyay, A.K., Bhattacharya, M.K., Mitra, U., Takeda, Y., Nair, G.B. y Ramamurthy, T. (2013). *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 serogroups and cholera-like diarrhea, Kolkata, India. *Emerging Infectious Diseases*, 19, pp: 464-467.

- Dziejman, M., Balon, E., Boyd, D., Fraser, C.M., Heidelberg, J.F. y Mekalanos, J.J. (2002). Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (3), pp: 1556-1561.
- ECDC (2024). Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. *Vibrio* Map viewer. Disponible en: <https://geoportalecdc.europa.eu/vibriomapviewer/> [acceso: 7-03-24].
- EFSA (2022). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Self-task mandate of the BIOHAZ panel on the public health aspects of *Vibrio* spp, related to the consumption of seafood in the EU. Disponible en: <https://open.efsa.europa.eu/questions/EFSA-Q-2022-00826> [acceso: 7-03-24].
- EFSA/ECDC (2019). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria/ Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 17 (12): 5926, pp: 1-276.
- EFSA/ECDC (2023). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria/ Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21 (12): e8442, pp: 1-222.
- Elhadi, N., Radu, S., Chen, C.H. y Nishibuchi, M. (2004). Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in seafood marketed in Malaysia. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 1469-1475.
- Eyles, M.J. y Davey, G.R. (1984). Microbiology of Commercial Depuration of the Sydney Rock Oyster, *Crassostrea commercialis*. *Journal of Food Protection*, 47 (9), pp: 703-706.
- FAO/OMS (2005a). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Risk Assessment of *Vibrio vulnificus* in Raw Oysters. Microbiological Risk Assessment Series No. 8. Disponible en: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra8.pdf> [acceso: 7-03-24].
- FAO/OMS (2005b). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Risk assessment of choleraogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 in warm-water shrimp in international trade. Microbiological Risk Assessment Series No. 9. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a0253e/a0253e.pdf> [acceso: 7-03-24].
- FAO/OMS (2011). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Microbiological Risk Assessment Series No. 16. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/44566> [acceso: 7-03-24].
- FAO/OMS (2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Selection and application of methods for the detection and enumeration of human-pathogenic halophilic *Vibrio* spp. in seafood. Microbiological Risk Assessment Series No. 22. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/249530/9789241565288-eng.pdf?sequence=1> [acceso: 7-03-24].
- FAO/OMS (2020). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* associated with seafood. Microbiological Risk Assessment Series No. 20. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/330867/9789240000186-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y> [acceso: 7-03-24].
- FAO/OMS (2021). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud. Advances in science and risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* associated with seafood. Microbiological Risk Assessment Series No. 35. Disponible en: <https://www.fao.org/3/cb5834en/cb5834en.pdf> [acceso: 7-03-24].
- Farina, C., Marini, F., Schiaffino, E., Luzzi, I., Dionisi, A.M., Leoni, F., Ottaviani, D. y Bordoni, S. (2010). A fatal *Vibrio cholerae* O37 enteritis. *Journal of Medical Microbiology*, 59 (12), pp: 1538-1540.
- FDA (2005). Food and Drug Administration. Irradiation in the production, processing, and handling of food. Final rule. *Federal Register*, 70 (157), pp: 48057-48073.
- Fernández-Delgado, M., Rojas, H., Duque, Z., Suárez, P., Contreras, M., García-Amado, M.A. y Alciaturi, C. (2016). Biofilm formation of *Vibrio cholerae* on stainless steel used in food processing. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58: 47, pp: 1-4.

- Fernández-Ruiz, M., Carretero, O. y Orellana, M.Á. (2017). Bacteriemia por *Vibrio cholerae* no toxigénico: los riesgos del consumo de marisco en un paciente cirrótico. *Gastroenterología y Hepatología*, 40, pp: 358-360.
- Franco, J., Serralta-Peralta, L.E., Hernandez, J.R., Sosa-Castilla, F. y Castillo-Cocom, J.A. (2015). Prevalence of clinically important species of the genus *Vibrio* in catered seafood of city and port of Progreso de Castro, Yucatan, Mexico. *Medwave*, 15, pp: e6147.
- FSANZ (2005). Food Standards Australia New Zealand. Imported food risk statement RTE cooked prawns and shrimp and *Vibrio cholerae*. Disponible en: <https://www.foodstandards.gov.au/sites/default/files/2023-11/RTE%20cooked%20prawns%20and%20shrimp%20and%20V.%20cholerae.pdf> [acceso: 7-03-24].
- Gangarosa, E.J., Saghari, H., Emile, J. y Siadat, H. (1966). Detection of *Vibrio cholerae* biotype El Tor by purging. *Bulletin of the World Health Organization*, 34 (3), pp: 363-369.
- Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. y Karunasagar, I. (2005). The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 102, pp: 151-159.
- Grimes, D.L., Ford, T.E., Colwell, R.R., Baker-Austin, C., Martinez-Urtaza, J. y Capone, D.G. (2014). Viewing marine bacteria, their activity and response to environmental drivers from orbit. *Microbial Ecology*, 67 (3), pp: 1489-1500.
- Haque, Z.F., Islam, S., Sabuj, A.A.M., Pondit, A., Sarkar, A.K., Hossain, G. y Sukumar, S. (2023). Molecular detection and antibiotic resistance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from Shrimp (*Penaeus monodon*) and shrimp environments in Bangladesh. *Aquaculture Research*, 2023: 5436552, pp: 1-11.
- Hlady, W.G. y Klontz, K.C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *The Journal of Infectious Diseases*, 173 (5), pp: 1176-1183.
- Huq, A., West, P.A., Small, E.B., Huq, M.I. y Colwell, R.R. (1984). Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar 01 associated with live copepods in laboratory microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 48 (2), pp: 420-424.
- ICMSF (1996). International Commission for Microbiological Specifications for Foods. *Vibrio cholerae*. Microorganisms in foods 5: *Microbiological Specifications of Food Pathogens*. Londres. Blackie Academic and Professional, pp: 414-425.
- ICMSF (2005). International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Fish and fish products. Microorganisms in food 6. *Microbial Ecology of Food Commodities*. Nueva York. Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp: 174-249.
- Iredell, J. y Manning, P. (1994). Biotypic-specific *tcpA* genes in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiology Letter*, 121 (1), pp: 47-54.
- Jain, M., Goel, A.K., Bhattacharya, P., Ghatole, M. y Kamboj, D.V. (2011). Multidrug resistant *Vibrio cholerae* 01 El Tor carrying classical *ctxB* allele involved in a cholera outbreak in South-Western India. *Acta Tropica*, 117, pp: 152-156.
- Jantapaso, H., Aksonkird, T. y Mittraparp-Arthorn, P. (2024). Characteristics of *Vibrio cholerae* isolates obtained from shrimp supply chains and inhibitory activities of rambutan (*Nephelium lappaceum* L. cv. Rong Rian) peel aqueous extract. *Food Control*, 158: 110231.
- Januário, F.E.S. y Dykes, G.A. (2005). Effect of Sodium Metabisulphite and Storage Temperature on the Survival of *Vibrio cholerae* on Prawns (*Penaeus monodon*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, pp: 1017-1020.
- JEMRA (2021). Joint FAO/WHO Expert Meetings on Microbiological Risk Assessment. Advances in science and risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* associated with seafood: meeting report. Microbiological Risk Assessment series 35. Disponible en: <https://www.who.int/publications/item/9789240024878> [acceso: 7-03-24].

- Karlsson, S.L., Ax, E., Nygren, E., Källgård, S., Blomquist, M., Ekman, A., Benktander, J., Holmgren, J. y Lebens, M. (2014). Development of stable *Vibrio cholerae* O1 Hikojima type vaccine strains co-expressing the Inaba and Ogawa lipopolysaccharide antigens. *PLoS One*, 9 (11): e108521, pp: 1-13.
- Kelly, M.T. y Dinuzzo, A. (1985). Uptake and clearance of *Vibrio vulnificus* from Gulf coast oysters (*Crassostrea virginica*). *Applied and Environmental Microbiology*, 50 (6), pp: 1548-1549.
- Klinzing, D.C., Choi, S.Y., Hasan, N.A., Matias, R.R., Tayag, E., Geronimo, J., Skowronski, E., Rashed, S.M., Kawashima, K., Rosenzweig, C.N., Gibbons, H.S., Torres, B.C., Liles, V., Alfon, A.C., Juan, M.L., Natividad, F.F., Cebula, T.A. y Colwell, R.R. (2015). Hybrid *Vibrio cholerae* El Tor lacking SXT identified as the cause of a cholera outbreak in the Philippines. *mBio*, 6 (2): e00047-15, pp: 1-7.
- Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, H.D., Schiefer, H.G., Slenczka, W., von Graevenitz, A. y Zahner, H. (2003). En libro: *Zoonoses: infectious diseases transmissible from animals to humans*. 3ª edición. Washington. ASM press.
- Kural, A.G. y Chen, H. (2008). Conditions for a 5-log reduction of *Vibrio vulnificus* in oysters through high hydrostatic pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 122 (1-2), pp: 180-187.
- Le Roux, F., Wegner, K.M., Baker-Austin, C., Vezzulli, L., Osorio, C.R., Amaro, C., Ritchie, J.M., Defoirdt, T., Destoumieux-Garzón, D., Blokesch, M., Mazel, D., Jacq, A., Cava, F., Gram, L., Wendling, C.C., Strauch, E., Kirschner, A. y Huehn, S. (2015). The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe Ecology evolution and pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 6: 830, pp: 1-8.
- Lhafi, S.K. y Kuhne, M. (2007). Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *The International Journal of Food Microbiology*, 116, pp: 297-300.
- Li, M., Shimada, T., Morris, J.G., Sulakvelidze, A. y Sozhamanna, S. (2002). Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infection and Immunity*, 70 (5), pp: 2441-2443.
- Lopatek, M., Wiczorek, K. y Osek, J. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from raw shellfish in Poland. *Journal of Food Protection*, 78, pp: 1029-1033.
- López-Hernández, K.M., Pardío-Sedas, V.T., Flores-Primo, A., Itzcoatl-Martínez, D. y Uscanga-Serrano, R. (2022). Estimación del riesgo microbiológico asociado al consumo de ostión crudo contaminado con *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 25 (1), pp: 14-24.
- Magny, G.C., Mozumder, P.K., Grim, C.J., Hasan, N.A., Naser, M.N., Alam, M., Sack, R.B., Huq, A. y Colwell, R.R. (2011). Role of Zooplankton Diversity in *Vibrio cholerae* Population Dynamics and in the Incidence of Cholera in the Bangladesh Sundarbans. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (17), pp: 6125-6132.
- MAPA (2023). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Informe del consumo alimentario en España 2022. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-2022-baja-res\\_tcm30-655390.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-2022-baja-res_tcm30-655390.pdf) [acceso: 7-03-24].
- Martínez-Urtaza, J., Trinanes, J., Abanto, M., Lozano-Leon, A., Llovo-Taboada, J., García-Campello, M., Pousa, A., Powell, A., Baker-Austin, C. y González-Escalona, N. (2018). Epidemic dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* illness in a hotspot of disease emergence, Galicia, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 24, pp: 852-859.
- MASA (2023). Ministère de L'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire. Instruction technique DGAL/SDS-SA/2023-117. Disponible en: <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2023-117> [acceso: 7-03-24].
- MASA (2024). Ministère de L'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire. Instruction technique DGAL/SDS-SA/2024-73. Disponible en: <https://info.agriculture.gouv.fr/gedei/site/bo-agri/instruction-2024-73> [acceso: 7-03-24].
- Mathebula, L., Malinga, T., Mokgoro, M., Ndwandwe, D., Wiysonge, C.S. y Gray, G. (2023). Cholera vaccine clinical trials: A cross-sectional analysis of clinical trials registries. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 19 (2): 2261168, pp: 1-7.

- McAteer, J.B., Danda, S., Nhende, T., Manamike, P., Parayiwa, T., Tarupihwa, A., Tapfumanei, O., Manangazira, P., Mhlanga, G., Garone, D.B., Martinsen, A., Aubert, R.D., Davis, W., Narra, R., Balachandra, S., Tippet, B.A. y Mintz, E. (2018). Notes from the Field: Outbreak of *Vibrio cholerae* Associated with Attending a Funeral - Chegutu District, Zimbabwe, 2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67, pp: 560-561.
- Mercasa (2022). Alimentación en España 2022. 25ª edición. Disponible en: [https://www.mercasa.es/wp-content/uploads/2022/12/AEE\\_2022\\_WEB.pdf](https://www.mercasa.es/wp-content/uploads/2022/12/AEE_2022_WEB.pdf) [acceso: 7-03-24].
- Ministero della Salute (2019). Nota N° 0069887-P-18/12/2019. Disponible en: [https://www.fnovi.it/sites/default/files/Documento\\_Principale\\_0069887-18\\_12\\_2019-DGISAN-MDS-P.pdf](https://www.fnovi.it/sites/default/files/Documento_Principale_0069887-18_12_2019-DGISAN-MDS-P.pdf) [acceso: 7-03-24].
- Mittal, M., Tripathi, S., Saini, A. y Mani, I. (2023). Phage for treatment of *Vibrio cholerae* infection. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 201, pp: 21-39.
- Montero, D.A., Vidal, R.M., Velasco, J., George, S., Lucero, Y., Gómez, L.A., Carreño, L.J., García-Betancourt, R. y O’Ryan, M. (2023). *Vibrio cholerae*, classification, pathogenesis, immune response, and trends in vaccine development. *Frontiers in Medicine*, 10: 1155751, pp: 1-24.
- Morris, G. (1990). Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiologic Reviews*, 12, pp: 179-191.
- Nair, G.B., Qadri, F., Holmgren, J., Svennerholm, A.M., Safa, A., Bhuiyan, N.A., Ahmad, Q.S., Faruque, S.M., Faruque, A.S.G., Takeda, Y. y Sack, D.A. (2006). Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp: 4211-4213.
- Nascimento, D.R., Vieira, R.H., Almeida, H.B., Patel, T.R. e Iaria, S.T. (1998). Survival of *Vibrio cholerae* O1 strains in shrimp subjected to freezing and boiling. *Journal of Food Protection*, 61 (10), pp: 1317-1320.
- Neetoo, H., Reega, K., Manoga, Z.S., Nazurally, N., Bhoyroo, V., Allam, M., Jaufeerally-Fakim, Y., Ghoorah, A.W., Jaumdally, W., Hossen, A.M., Mayghun, F., Ismail, A. y Hosenally, M. (2022). Prevalence, genomic characterization, and risk assessment of human pathogenic *Vibrio* species in seafood. *Journal of Food Protection*, 85 (11), pp: 1553-1565.
- Newton, A.E., Heiman, K.E., Schmitz, A., Török, T., Apostolou, A., Hanson, H., Gounder, P., Bohm, S., Kurkjian, K., Parsons, M.B., Talkington, D., Stroika, S., Madoff, L.C., Elson, F., Sweat, D., Cantu, V., Akwari, O., Mahon, B.E. y Mintz, E.D. (2011). Cholera in United States Associated with Epidemic in Hispaniola. *Emerging Infectious Diseases*, 17, pp: 2166-2168.
- Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N.C., Dambrosio, A., Montagna, C. y Chiocco, D. (2006). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia Region (Italy). *The International Journal of Food Microbiology*, 106, pp: 219-222.
- Ocasio, D.V., Juin, S., Berendes, D., Heitzinger, K., Prentice-Mott, G., Desormeaux, A.M., Charles, P.D.J., Rigodon, J., Pelletier, V., Jean Louis, R., Vertefeuille, J., Boncy, J., Joseph, G., Compère, V., Lafontant, D., Andrecy, L.L., Michel, E., Pierre, K., Thermidor, E., Fitter, D., Grant-Greene, Y., Lozier, M., Marseille, S. y CDC Haiti Cholera Response Group (2023). Cholera Outbreak - Haiti, September 2022-January 2023. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72 (2), pp: 21-25.
- Octavia, S., Salim, A., Kurniawan, J., Lam, C., Leung, Q., Ahsan, S., Reeves, P.R., Nair, G.B. y Lan, R. (2013). Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. *PLoS One*, 8: e65342, pp: 1-13.
- Oh, H., Yoon, Y., Ha, J., Lee, J., Shin, I.S., Kim, Y.M., Park, K.S. y Kim, S. (2021). Risk assessment of vibriosis by *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in whip-arm octopus consumption in South Korea. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 24 (6), pp: 207-218.
- OMS (2017). Organización Mundial de la Salud. Cholera vaccines: WHO position paper - August 2017. *Weekly epidemiological record*, 34 (92), pp: 477-500. Disponible en: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258764/1/WER9234-477-498.pdf> [acceso: 7-03-24].

- OMS (2018). Organización Mundial de la Salud. Cholera, 2017. *Weekly epidemiological record*, 38 (93), pp: 489-500. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/274654/WER9338.pdf> [acceso: 7-03-24].
- OMS (2023). Organización Mundial de la Salud. Cholera, 2022. *Weekly epidemiological record*, 38 (98). pp: 431-452. Disponible en: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/372986/WER9838-eng-fre.pdf?sequence=1&i-sAllowed=y> [acceso: 7-03-24].
- Onifade, T.J.M., Hutchinson, R., Van Zile, K., Bodager, D., Baker, R. y Blackmore, C. (2011). Toxin producing *Vibrio cholerae* O75 outbreak, United States, March to April 2011. *Euro Surveillance*, 16 (20): 19870, pp: 1-3.
- Osei-Asare, C., Eshun, E., Apenteng, J.A., Adi-Dako, O., Kumadoh, D., Akosua, A.A. y Ohemeng, K.A. (2020). Managing *Vibrio cholerae* with a local beverage: preparation of an affordable ethanol based hand sanitizer. *Heliyon*, 6 (1): e03105, pp: 1-7.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., di Trani, V., Canonico, C., Pianetti, A., Tega, L. y Carraturo, A. (2009). Prevalence and virulence properties of nonO1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *The International Journal of Food Microbiology*, 132, pp: 47-53.
- Passalacqua, P.L., Zavatta, E., Bignami, G., Serraino, A. y Serratore, P. (2016). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* in the clam *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) from Emilia Romagna and Sardinia, Italy. *Italian Journal of Food Safety*, 5 (1): 5709, pp: 41-46.
- Patel, N.M., Wong, M., Little, E., Ramos, A.X., Kolli, G., Fox, K.M., Melvin, J., Moore, A. y Manch, R. (2009). *Vibrio cholerae* non-O1 infection in cirrhotics: case report and literature review. *Transplant Infectious Disease*, 11, pp: 54-56.
- Pesigan, T.P., Plantilla, J. y Rolda, M. (1967). Applied studies on the viability of El Tor vibrios. *Bulletin of the World Health Organization*, 37 (5), pp: 779-786.
- Preeprem, S., Mittraparp-arthorn, P., Bhoopong, P. y Vuddhakul, V. (2014). Isolation and characterization of *Vibrio cholerae* isolates from seafood in Hat Yai city, Songkhla, Thailand. *Foodborne pathogens and disease*, 11 (11), pp: 881-886.
- Preeprem, S., Aksonkird, T., Nuidate, T., Hajimasalaeh, W., Hajiwangoh, Z. y Mittraparp-arthorn, P. (2023). Characterization and genetic relationships of *Vibrio* spp. isolated from seafood in retail markets, Yala, Thailand. *Trends in Sciences*, 20 (10), pp: 5962-5962.
- QMRA Wiki (2024). Quantitative Microbial Risk Assessment. *Vibrio cholerae*. Dose Response Experiments. Disponible en: <https://qmrwiki.org/experiments/vibrio-cholerae> [acceso: 7-03-24].
- Raghunath, P., Acharya, S., Bhanumathi, A. y Karunasagar, I. (2008). Detection and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from seafood harvested along the southwest coast of India. *Food Microbiology*, 25, pp: 824-830.
- Rahman, M.S., Currò, S., Carraro, L., Cardazzo, B., Balzan, S., Novelli, E., Fontana, F., Caburlotto, G., Manfrin, A. y Fasolato, L. (2023). Retrospective analysis of *Vibrio* spp. isolated from marketed crustaceans using multilocus sequence analysis. *Italian Journal of Food Safety*, 12 (1): 11045, pp: 1-7.
- RASFF (2024). Rapid Alert System for Food and Feed. Disponible en: [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&orderby=product\\_category&orderDir=desc/](https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchByKeyword&orderby=product_category&orderDir=desc/) [acceso: 7-03-24].
- Rehm, C., Kolm, C., Pleininger, S., Heger, F., Indra, A., Reischer, G.H., Farnleitner, A.A.H. y Kirschner, A.K.T. (2023). *Vibrio cholerae*-An emerging pathogen in Austrian bathing waters? *Wiener Klinische Wochenschrift*, 135, pp: 597-608.
- Reilly, L.A. y Hackney, C.R. (1985). Survival of *Vibrio cholerae* during storage in artificially contaminated seafoods. *Journal of Food Science*, 50, pp: 838-839.
- Restrepo, D., Huprikar, S.S., Vanhorn, K. y Bottone, E.J. (2006). O1 and nonO1 *Vibrio cholerae* bacteremia produced by hemolytic strains. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 54, pp: 145-148.
- Ripabelli, G., Sammarco, M.L., Grasso, G.M., Fanelli, I., Caprioli, A. y Luzzi, I. (1999). Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *The International Journal of Food Microbiology*, 49, pp: 43-48.



- Rivera, I.N.G., Lipp, E.K., Gil, A., Choopun, N., Huq, A. y Colwell, R.R. (2003). Method of DNA extraction and application of multiplex polymerase chain reaction to detect toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 from aquatic ecosystems. *Environmental Microbiology*, 5, pp: 599-606.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M. y Quilici, M.L. (2014). Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. *The International Journal of Food Microbiology*, 189, pp: 75-81.
- Ryan, K.J. y Ray, C.G. (2004). En libro: *Sherri's medical microbiology: an introduction to infectious disease*. 4ª edición. Nueva York. McGraw-Hill.
- Sack, D.A., Sack, R.B., Nair, G.B. y Siddique, A.K. (2004). Cholera. *Lancet*, 363, pp: 223-233.
- Safa, A., Nair, G.B. y Kong, R.Y.C. (2010). Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends in Microbiology*, 18, pp: 46-54.
- Seas, C. y Gotuzzo, E. (2010). *Vibrio cholerae*. En libro: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7ª edición. Filadelfia. Churchill Livingstone Elsevier, pp: 2777-2785.
- Semenza, J.C., Trinanes, J., Lohr, W., Sudre, B., Löfdahl, M., Martínez-Urtaza, J., Nichols, G.L. y Rocklöv, J. (2017). Environmental Suitability of *Vibrio* Infections in a Warming Climate: An Early Warning System. *Environmental Health Perspectives*, 125 (10): 107004, pp: 1-12.
- Sharifnia, A., Bakhshi, B. y Pourshafie, M. (2012). wbeT sequence typing and IS1004 profiling of *Vibrio cholerae* isolates. *Letters in Applied Microbiology*, 54 (4), pp: 267-271.
- Sharma, C., Maiti, S., Mukhopadhyay, A.K., Basu, A., Basu, I., Nair, G.B., Mukhopadhyaya, R., Das, B., Kar, S., Ghosh, R.K. y Ghosh, A. (1997). Unique organization of the CTX genetic element in *Vibrio cholerae* O139 strains which reemerged in Calcutta, India, in September 1996. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (12), pp: 3348-3350.
- Singleton, F.L., Attwell, R.W., Jangi, M.S. y Colwell, R.R. (1982). Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*, 43 (5), pp: 1080-1085.
- Sinyange, N., Brunkard, J.M., Kapata, N., Mazaba, M.L., Musonda, K.G., Hamoonga, R., Kapina, M., Kapaya, F., Mutale, L., Kateule, E., Nanzaluka, F., Zulu, J., Musyani, C.L., Winstead, A.V., Davis, W.W., N'cho, H.S., Mulambya, N.L., Sakubita, P., Chewe, O., Nyimbili, S., Onwuekwe, E.V.C., Adrien, N., Blackstock, A.J., Brown, T.W., Derado, G., Garrett, N., Kim, S., Hubbard, S., Kahler, A.M., Malambo, W., Mintz, E., Murphy, J., Narra, R., Rao, G.G., Riggs, M.A., Weber, N., Yard, E., Zyambo, K.D., Bakyaite, N., Monze, N., Malama, K., Mulwanda, J. y Mukonka, V.M. (2018). Cholera Epidemic - Lusaka, Zambia, October 2017–May 2018. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 67, pp: 556-559.
- Sperling, L., Alter, T. y Huehn, S. (2015). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail and farm shrimps in Ecuador. *Journal of Food Protection*, 78, pp: 2089-2092.
- String, G.M., Huang, A. y Lantagne, D. (2022). Laboratory evaluation of the efficacy of bucket chlorination guidelines at inactivating *Vibrio cholerae* for waters of varying quality. *Journal of Water and Health*, 20 (7), pp: 1071-1083.
- Stroeher, U.H., Karageorgos, L.E., Morona, R. y Manning, P.A. (1992). Serotype conversion in *Vibrio cholerae* O1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, pp: 2566-2570.
- Sumner, J. (2011). Food Safety Risks Associated with Prawns Consumed in Australia. Disponible en: <http://australianwildprawns.com.au/wp-content/uploads/2017/02/2009-787-Food-safety-risks-for-prawns.pdf> [acceso: 7-03-24].
- Tobin-D'Angelo, M., Smith, A.R., Bulens, S.N., Thomas, S., Hodel, M., Izumiya, H., Arakawa, E., Morita, M., Watanabe, H., Marin, C., Parsons, M.B., Greene, K., Cooper, K., Haydel, D., Bopp, C., Yu, P. y Mintz, E. (2008). Severe diarrhea caused by cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* serogroup O75 infections acquired in the southeastern United States. *Clinical Infectious Diseases*, 47 (8), pp: 1035-1040.

- Torres-Vitela, M.R., Castillo, A., Ibarra-Velázquez, L.M., Navarro-Hidalgo, V., Rodríguez-García, M.O., Martínez-González, N.E. y Pérez-Montaño, J.A. (2000). Survival of *Vibrio cholerae* O1 in ceviche and its reduction by heat pretreatment of raw ingredients. *Journal of Food Protection*, 63 (4), pp: 445-450.
- Tra, V.T., Meng, L., Pichpol, D., Pham, N.H., Baumann, M., Alter, T. y Huehn, S. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Vibrio* spp. in retail shrimps in Vietnam. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 129, pp: 48-51.
- Trubiano, J.A., Lee, J.Y., Valcanis, M., Gregory, J., Sutton, B.A. y Holmes, N.E. (2014). Non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in an Australian population. *Internal Medicine Journal*, 44, pp: 508-511.
- Udden, S.M., Zahid, M.S., Biswas, K., Ahmad, Q.S., Cravioto, A., Nair, G.B., Mekalanos, J.J. y Faruque, S.M. (2008). Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (33), pp: 11951-11956.
- UE (2002). Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. DO L 31 de 1 de febrero de 2002, pp: 1-24.
- UE (2004a). Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. DO L 165 de 30 de abril de 2004, pp: 1-141.
- UE (2004b). 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. DO L 139 de 30 de abril de 2004, pp: 206-320.
- UE (2005). Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DO L 338 de 22 de diciembre de 2005, pp: 1-26.
- UE (2008). Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. DO L 354 de 31 de diciembre de 2008, pp: 16-33.
- UE (2009). Reglamento (CE) N° 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales y los productos derivados no destinados al consumo humano y por el que se deroga el Reglamento (CE) N° 1774/2002. DO L 300 de 14 de noviembre de 2009, pp: 1-33.
- UE (2017). Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de marzo de 2017, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y de las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios, y por el que se modifican los Reglamentos (CE) N° 999/2001, (CE) N° 396/2005, (CE) N° 1069/2009, (CE) N° 1107/2009, (UE) N° 1151/2012, (UE) N° 652/2014, (UE) 2016/429 y (UE) 2016/2031 del Parlamento Europeo y del Consejo, los Reglamentos (CE) N° 1/2005 y (CE) N° 1099/2009 del Consejo, y las Directivas 98/58/CE, 1999/74/CE, 2007/43/CE, 2008/119/CE y 2008/120/CE del Consejo, y por el que se derogan los Reglamentos (CE) N° 854/2004 y (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 89/608/CEE, 89/662/CEE, 90/425/CEE, 91/496/CEE, 96/23/CE, 96/93/CE y 97/78/CE del Consejo y la Decisión 92/438/CEE del Consejo. DO L 95 de 7 de abril de 2017, pp: 1-142.
- UNE-EN ISO (2017). UNE-EN ISO 21872-1:2017. Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la determinación de *Vibrio* spp. Parte 1: Detección de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* y *Vibrio vulnificus* potencialmente enteropatógenos.
- Vu, T.T.T., Alter, T. y Huehn, S. (2018). Prevalence of *Vibrio* spp. in retail seafood in Berlin, Germany. *Journal of Food Protection*, 81 (4), pp: 593-597.

- Wachsmuth, I.K., Blake, P.A. y Olsvik, O. (1994). En libro: *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*. Washington, DC. American Society for Microbiology.
- Waldor, M.K. y Mekalanos, J.J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272, pp: 1910-1914.
- Watson, A.P., Armstrong, A.Q., White, G.H. y Thrane, B.H. (2018). Health-based ingestion exposure guidelines for *Vibrio cholerae*: Technical basis for water reuse applications. *Science of the Total Environment*, 1, pp: 613-614.
- Watts, N., Amann, M., Arnell, N., Ayeb-Karlsson, S., Belesova, K., Boykoff, M., Byass, P., Cai, W., Campbell-Lendrum, D., Capstick, S., Chambers, J., Dalin, C., Daly, M., Dasandi, N., Davies, M., Drummond, P., Dubrow, R., L Ebi, K., Eckelman, M., Ekins, P., Escobar, L.E., Fernandez, L., Georgeson, L., Graham, H., Haggart, P., Hamilton, I., Hartinger, S., Hess, J., Kelman, I., Kieseewetter, G., Kjellstrom, T., Kniveton, D., Lemke, B., Liu, Y., Lott, M., Lowe, R., Sewe, M.O., Martinez-Urtaza, J., Maslin, M., McAllister, L., McGushin, A., Mikhaylov, S.J., Milner, J., Moradi-Lakeh, M., Morrissey, K., Murray, K., Munzert, S., Nilsson, M., Neville, T., Oreszczyn, T., Owfi, F., Pearson, O., Pencheon, D., Pye, S., Quinn, R., Rabbaniha, M., Robinson, E., Rocklöv, J., Semenza, J.C., Sherman, J., Shumake-Guillemot, J., Tabatabaei, M., Taylor, J., Trinanes, J., Wilkinson, P., Costell, A., Gong, P. y Montgomery, H. (2019). The 2019 report of The Lancet Countdown on health and climate change: ensuring that the health of a child born today is not defined by a changing climate. *Lancet*, 394, pp: 1836-1878.
- Waturangi, D.E., Amadeus, S. y Kelvianto, Y.E. (2015). Survival of enteroaggregative *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in frozen and chilled foods. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9 (8), pp: 837-843.
- Wennberg, A.C., Tryland, I., Østensvik, Ø., Secic, I., Monshaugen, M. y Liltved, H. (2013). Effect of water treatment on the growth potential of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in seawater. *Marine Environmental Research*, 83, pp: 10-15.
- Woodring, J., Srijan, A., Puripunyakom, P., Oransathid, W., Wongstitwilairoong, B. y Mason, C. (2012). Prevalence and antimicrobial susceptibilities of *Vibrio*, *Salmonella*, and *Aeromonas* isolates from various uncooked seafoods in Thailand. *Journal of Food Protection*, 75, pp: 41-47.
- Wright, A.C. y Schneider, K.R. (2010). Pathogenic vibrios in seafood. En libro: *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington, DC. ASM Press, pp: 146-163.
- Yaashikaa, P., Saravanan, A. y Kumar, P.S. (2016). Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies. *Microbial Pathogenesis*, 99, pp: 5-13.
- Ye, M., Huang, Y. y Chen, H. (2012). Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters by high-hydrostatic pressure and mild heat. *Food Microbiology*, 32, pp: 179-184.
- Ye, M., Huang, Y., Gurtler, J.B., Niemira, B.A., Sites, J.E. y Chen, H. (2013). Effects of pre- or post-processing storage conditions on high-hydrostatic pressure inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in oysters. *The International Journal of Food Microbiology*, 163, (2-3), pp: 146-152.
- Zhang, P., Zhou, H., Diao, B., Li, F., Du, P., Li, J., Kan, B., Morris, J.G.Jr. y Wang, D. (2014). A molecular surveillance reveals the prevalence of *Vibrio cholerae* O139 isolates in China from 1993 to 2012. *Journal of Clinical Microbiology*, 52 (4), pp: 1146-1152.
- Zhang, X., Lu, Y., Qian, H., Liu, G., Mei, Y., Jin, F., Xia, W. y Ni, F. (2020). Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* (NOVC) bacteremia: case report and literature review, 2015–2019. *Infection and Drug Resistance*, 13, pp: 1009-1016.