

# 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

## Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferrí, M<sup>a</sup> Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

## Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-001

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 17 de febrero de 2010

## Grupo de Trabajo

Elias F. Rodríguez Ferrí (Coordinador)

Albert Bosch Navarro, Alberto Cepeda Sáez

Lucas Domínguez Rodríguez, Andrés Otero Carballeira

Gonzalo Zurera Cosano

Elena Carrasco Jiménez (C. Externa)

Fernando Pérez Rodríguez (C. Externo)

Antonio Valero Díaz (C. Externo)

## Resumen

El presente informe pretende determinar la vigencia del actual sistema de control sanitario de productos de la pesca congelados en puestos de inspección fronterizos, en relación a las especies patógenas del género *Vibrio* y muy especialmente, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* y *V. vulnificus*.

En vista de los conocimientos científicos actuales y de la evaluación del riesgo, parece justificada la aplicación de criterios microbiológicos en los puntos de inspección fronterizos como medida adicional y complementaria de control. En lo que se refiere específicamente a *V. cholerae* se recomienda aplicar un criterio de tolerancia cero sin distinción entre serotipos. En el caso de serotipos distintos de O:1 y O:139 se recomienda identificar los productos de mayor riesgo para el consumidor y adoptar medidas de vigilancia efectivas.

Respecto de *V. parahemolyticus*, se considera adecuada la aplicación de un límite máximo de  $10^2$  ufc/g y que el criterio microbiológico y plan de muestreo establecido en los puntos de inspección fronterizos para esta especie es adecuado y suficiente. En capturas procedentes de zonas de riesgo, debería establecerse un plan de vigilancia especial como paso previo para la adopción de otro tipo de criterios.

Se recomienda extender, igualmente, la vigilancia de pescado y mariscos procedentes de zonas de riesgo a *V. vulnificus*. Igualmente se recomienda mantener cierta cautela respecto de las mismas zonas (de riesgo) en lo que se refiere a cualquiera otra especie de *Vibrio*, en particular las consideradas.

Además cabe destacar, que la temperatura de mantenimiento del pescado y productos de la pesca tiene una importancia crítica en el control de potenciales brotes por estos microorganismos.

En España, en función de los datos disponibles, el riesgo de padecer enfermedad por el consumo de productos pesqueros contaminados, puede calificarse con carácter general de muy bajo.

## Palabras clave

Puntos de Inspección Fronterizos, productos de la pesca, *Vibrio*, criterios microbiológicos.

## **Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the applicable microbiological criteria for pathogenic species of the genus *Vibrio* in imported fishery products, as additional control measures at border inspection posts.**

### **Abstract**

The present report aims to determine the currency of the present system for health-related control of frozen fishery products at border inspection posts, with regard to the pathogenic species of the genus *Vibrio* and more specifically, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*.

In view of the current scientific knowledge and risk assessment, the application of microbiological criteria at border inspection posts is justified as an additional and complementary control measure. With regard to *V. cholerae* specifically, it is recommended to apply a zero-tolerance criterion without distinguishing between serotypes. In case of serotypes other than O:1 and O:139, it is recommended to identify the products with the greatest risk for consumers and to adopt effective surveillance measures.

With respect to *V. parahaemolyticus*, the application of a maximum limit of  $10^2$  cfu/g is considered adequate and the microbiological criterion and sampling plan established at border inspection posts for this species are adequate and sufficient. In catches from areas at risk, a special surveillance plan should be established as a preliminary step for the adoption of another kind of criterion.

Similarly, it is recommended to extend the surveillance over fish and shellfish from areas at risk to *V. vulnificus*. In addition, it is recommended to keep certain caution with respect to the same areas (at risk) for any other species of *Vibrio*, particularly those considered here.

Furthermore, it should be highlighted that the temperature at which fish and fish products are maintained is of critical importance in the control of potential outbreaks due to these micro-organisms.

In Spain, in light of available data, the risk of suffering illness due to the ingestion of contaminated fishery products can be generally classified as very low.

### **Key words**

Border Inspection Posts, fishery products, *Vibrio*, microbiological criteria.

## Introducción

La Dirección Ejecutiva de la AESAN ha trasladado al Comité Científico una consulta sobre “la vigencia del actual sistema de control sanitario de productos de la pesca congelados en puestos de inspección fronterizos” en lo que se refiere a las siguientes cuestiones:

1. Respecto de la detección de *Vibrio parahaemolyticus*, actualmente basada en la aceptación de su presencia hasta concentraciones de 100 ufc/g. En caso contrario, posibles criterios microbiológicos a seguir en relación con la presencia del citado microorganismo en productos de la pesca procedentes de países terceros.
2. Respecto de *Vibrio cholerae*, del que actualmente solo se adoptan medidas adicionales de control en frontera ante la detección de los serotipos O1 y O139, se consulta sobre la conveniencia de la medida o, en caso contrario, sobre posibles criterios microbiológicos en relación con su presencia en productos de la pesca procedentes de países terceros.
3. Respecto de criterios microbiológicos aplicables a productos importados, referidos a especies patógenas del género *Vibrio*.
4. Respecto de si los criterios microbiológicos aplicables actualmente son consistentes con las evaluaciones de riesgo e información científica actual y, en su caso, los criterios que debieran aplicarse si sus instrucciones son incorrectas o insuficientes.

En el desarrollo de este informe se sigue la metodología clásica de Evaluación del Riesgo Microbiológico (Comisión del *Codex Alimentarius*, 1999).

## Identificación del peligro

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* de la clase Vibrionales. Recientemente se han separado de la familia los géneros *Aeromonas* y *Plesiomonas*, que en la actualidad se integran en otras familias. Incluye bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, fermentadores de carbohidratos, oxidasa y catalasa positivos, móviles por flagelos polares, por lo general, sensibles al agente vibriostático O/129 y que para su crecimiento requieren NaCl (son halófilos). Son ubicuos, ampliamente difundidos en la naturaleza en ambientes acuosos dulces o salinos, en zonas de litoral y estuarios, cuya especie tipo, *V. cholerae*, es un importante patógeno humano.

En la actualidad se reconocen en el género *Vibrio* un total de 48 especies diferentes<sup>1</sup> de las que 11 se consideran patógenos humanos de mayor o menor importancia. Destacan por su interés y gravedad *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Austin y Austin, 2007) que o bien se han implicado en brotes de enfermedad humana o poseen potencial para ello (Austin, 2009). *V. anguillarum* y *V. tapetis* se asocian con enfermedades de peces. En el grupo de microorganismos de bajo riesgo (Austin, 2009) se incluyen *V. hollisae*, que ocasionalmente se ha asociado con gastroenteritis relacionada con el consumo de marisco crudo; *V. alginoliticus*, que produce infecciones de heridas y oídos; *V. fluvialis*, relacionado en la India con casos de gastroenteritis e infecciones de heridas, al igual que *V. harveyi*. Y otros (*Photobacterium damsela*, *V. furnisii*, *V. metschnikovii* y *V. mimicus*), aunque de forma menos precisa en lo que se refiere a la relación con enfermedad.

<sup>1</sup>ICSP Subcommittee on the Taxonomy of *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae* and related organisms - April 2003.  
<http://www.the-icsp.org/taxa/vibriolist.htm#vibrio>

Los brotes y episodios de enfermedad en humanos, aunque poco frecuentes, implican típicamente infecciones por heridas y enfermedad gastrointestinal, a menudo con diarrea acuosa. Su origen no puede asociarse de forma definitiva con animales, pudiendo ser las aguas en las que se encuentran los peces. La transmisión al hombre se produce a través de heridas o del consumo de alimentos/agua. Hasta la fecha no se ha descrito correlación entre los niveles de *Vibrio* y la de patógenos o indicadores de contaminación fecal humanos.

**V. cholerae** es el agente del cólera humano. Originalmente fue aislado por R. Koch en 1884 a partir de enfermos de cólera, en Egipto, y ha sido responsable de epidemias y pandemias en todas las épocas, especialmente en Grecia, China y la India. En 1817 se produjo la primera pandemia de cólera fuera de Asia y desde entonces se han producido siete pandemias nuevas. La última se inició en Indonesia en 1961 y desde allí se propagó a África (1970) y América Latina (1991), extendiéndose después a los Estados Unidos. Está producida por *V. cholerae* El Tor, que después de más de 40 años se mantiene, aunque presenta patrones epidemiológicos diferentes dependiendo de la región a la que afecta (endemicidad en regiones en desarrollo y brotes esporádicos en otros lugares). Actualmente es endémico en varias regiones del sudeste asiático. En España solo se describen casos importados aunque en los años 70 se produjeron tres epidemias con una incidencia entre 200 y 300 casos.

En la actualidad, se reconocen alrededor de 200 serogrupos de *V. cholerae* sobre la base de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS) y sólo dos, los serogrupos O:1 y O:139 se consideran responsables de epidemias de cólera, siendo los únicos capaces de producir toxina colérica (TC). Dentro del serogrupo O:1, se incluyen dos biotipos: clásico y El Tor y, en cada uno de ellos, se integran tres serotipos diferentes: Inawa, Ogawa e Hikokima. El resto de serogrupos se reconocen como no O:1/no O:139, pudiendo aislarse de fuentes ambientales produciendo esporádicamente casos de gastroenteritis e infecciones extraintestinales. Se ha descrito que ocasionalmente algunas cepas no O:1/no O:139 pueden producir toxina colérica, pero no producen episodios o brotes epidémicos (Kaper et al., 1995).

Las cepas del serogrupo O:139, surgido en la India y Bangladesh en 1992 están muy relacionadas con las del serogrupo O:1 El Tor, responsable de la última pandemia, aunque difieren en la presencia de cápsula, la composición del LPS (contiene colitosa) y carecen de varios genes *rfb* responsables de la síntesis y ensamblaje del antígeno O, lo que parece indicar que su origen es el propio serogrupo O:1 por adquisición de DNA procedente del exterior (Popovic et al., 1995).

*V. cholerae* presenta un ciclo de vida libre formando parte de ecosistemas acuáticos en los que frecuentemente se asocia como comensal a peces, moluscos o crustáceos. Puede asociarse a la quitina de los caparazones de algunos crustáceos y adherirse a la superficie de algas, fitoplancton, copépodos y raíces de plantas acuáticas (Faruque et al., 1998), aunque de estos ambientes se aíslan principalmente cepas no O:1/no O:139. En cualquier caso, la adquisición de factores de virulencia les capacita para colonizar la mucosa intestinal y si adquieren la capacidad de producir toxina, producen enfermedad (Kaper et al., 1995).

Son factores de virulencia los flagelos y pili, que permiten a la bacteria desplazarse en la mucosa intestinal y adherirse al epitelio. La toxina colérica es una toxina tipo A-B, formada por una unidad A y cinco B que le sirven de soporte. Un vez que estas últimas se unen a los receptores GM1 de la superficie celular se produce un cambio conformacional en la molécula que permite la separación y entrada de la subunidad A al interior celular. En el interior, la subunidad A se disocia en dos fragmentos A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> y

el primero produce la hidrólisis del NAD liberando ADP-ribosa que se fija covalentemente e inactiva la proteína G y, como consecuencia, activa la adenilato ciclasa. El resultado es el incremento del AMP cíclico intracelular, que da lugar a la liberación de electrolitos y comienzo de la diarrea típica, acuosa, 'en agua de arroz'.

El hombre es el único hospedador de *V. cholerae* aunque se ha señalado la existencia de reservorios ambientales, no identificados, en los que el microorganismo permanecería en estado latente, no cultivable. Fenómenos naturales relacionados con el calentamiento oceánico, como El Niño, pueden asociarse a la aparición de brotes de cólera que se relacionan con el aumento de la temperatura del agua, de la concentración de nutrientes y de la población de fitoplancton (Colwel, 1996). Aunque no se considere un patógeno zoonótico, en los últimos años se han descrito brotes epizooticos de enfermedad en poblaciones de peces de los que se han aislado cepas de *V. cholerae*. Se incluyen especies de ayu (o pez dulce, *Plecoglossus altivelis*) en Japón, en carpa dorada en Australia e incluso a partir de tiburones (Austin y Austin, 2007). También existen descripciones de que cepas no O:1/no O:139 pueden asociarse con enfermedad en camarones (Haldari et al., 2007) y en peces ornamentales (Swaminathan et al., 2007) en la India.

Recientemente se han secuenciado los dos cromosomas circulares de *V. cholerae*, siendo éste uno de los primeros microorganismos en los que se ha completado la secuenciación de su genoma. En las cepas patógenas, además de los genes que codifican para la TC están también presentes genes que codifican para un factor de colonización denominado TCP (*toxin co-regulated pilus*) y la proteína reguladora ToxR que co-regula la expresión de ambos (Herrington et al., 1988). Ambos genes se transfieren horizontalmente mediante infección fágica (el operón *ctxAB*, de la TC, forma parte del genoma del fago CTXÆ que esta lisogenizado en *V. cholerae*) y se ubican en elementos genéticos repartidos en el cromosoma I (el mayor) de la bacteria. Las cepas toxigénicas ordinariamente llevan una o varias copias del operón *ctxAB*. TCP actúa como receptor del fago y promueve la colonización del epitelio intestinal por la bacteria; sus genes se localizan dentro de una isla de patogenicidad de 40 kb que también es transferida por otro fago filamentoso (VPIÆ). Resulta muy interesante el hecho de que ambos fagos (CTXÆ y VPIÆ) podrían participar en la emergencia de nuevos clones epidémicos de *V. cholerae* a partir de acontecimientos que tendrían lugar en el medio acuático (síntesis de partículas del fago VPIÆ a partir de cepas toxigénicas) y en el intestino humano (transformación de cepas apatógenas en patógenas) cuya distribución a partir de las heces de enfermos y portadores incluiría la contaminación de ambientes acuáticos (Faruque et al., 1998). A este respecto, estudios recientes han descrito la presencia de genes de virulencia (*ctxAB* y *zot*) en cepas de *V. cholerae* de origen ambiental en la India y Brasil. La misma observación se ha descrito también en aguas de la Bahía de Newport, en California (Jiang et al., 2003) aunque por el momento no se han señalado evidencias de toxicidad asociada.

Además de la TC, también se ha descrito la producción de otras toxinas entre las que destaca una toxina RTX (del inglés, *repeat in toxin*), capaz de romper los filamentos de actina, aunque se desconoce su papel en la patogénesis de la enfermedad. Un importante número de enzimas producidas por *V. cholerae* actúan a nivel intestinal facilitando el proceso de adherencia y colonización, incluyendo neuraminidasas, mucinasas y proteasas. También se ha descrito una proteasa con propiedades de

hemaglutinina sensible a la manosa que participa en la formación de biofilms en ambientes acuáticos, que facilitan la supervivencia (Watnick et al., 1999).

*V. cholerae* está presente en el agua marina contaminada a partir de desembocaduras de ríos a su vez contaminados con aguas fecales, pudiendo sobrevivir en el agua durante largos periodos de tiempo, como se hizo patente en las costas del Golfo de México y en Australia, donde se ha venido aislando el mismo serotipo de *V. cholerae* O1 a lo largo de más de 20 años (Blake et al., 1983). En un estudio realizado entre 1997 y 1998, en el que se analizaron 420 muestras de agua, en 44 (8,09% del total) se describió la presencia de *V. cholerae* no-O1, y se consideró que sus enterotoxinas podrían constituir un riesgo potencial de gastroenteritis en humanos (Manfrin et al., 2001). Sin embargo, el cólera se ha caracterizado por ser una enfermedad de carácter estacional, debido a que la transmisión de *V. cholerae* está influenciada por una serie de factores ambientales como la temperatura, condiciones de salinidad del agua, nutrientes, o por los diferentes métodos de captura y formas de consumo de los productos pesqueros.

La prevalencia de *V. cholerae* en productos derivados de la pesca se considera baja en general; de hecho, no se han encontrado O1 ni O139 en gambas (Gopal et al., 2005), ni en muestras de agua y sedimentos. Dalsgaard et al. (1995) citaron una prevalencia de un 2% de muestras con O1 en productos del sudeste asiático, pero después se demostró que el serotipo aislado carecía del gen de la TC. En otros estudios los niveles de prevalencia de otros serotipos no-O1/no-O139 se encuentran alrededor del 5% (Ottaviani et al., 2009), siendo predominantes los serogrupos O26 y O51. Sin embargo, no se ha demostrado con claridad si estos serotipos son capaces de producir enfermedad en humanos. Algunos brotes epidémicos por *V. cholerae* se han asociado al consumo de marisco contaminado, incluyendo ostras crudas (Morris, 2003) y cangrejos (CDC, 1991) e implicando cepas no-O1 y no-O139 (Farama et al., 2008).

A nivel mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los casos de cólera en 2008 aumentaron respecto a 2007, con un total de 190.130 casos y 5.143 muertes, que representa un incremento del 7,6% y del 27% en el número de casos y muertes, respectivamente.

***V. parahaemolyticus*** está ampliamente distribuido en ambientes marinos. Se puede aislar de una gran variedad de productos de la pesca crudos, particularmente de marisco (especialmente ostras), cuyo consumo produce el contagio humano (De Paola et al., 2003) (Drake et al., 2007).

*V. parahaemolyticus* produce distintos factores de virulencia entre los que se incluyen dos hemolisinas, una termoestable (TDH –*thermostable direct haemolysin*–) con carácter de b-hemolisina (fenómeno de Kanagawa en agar sangre de Wagatsuma) y otra relacionada (TRH) codificada por el gen *trh*, cuya presencia conjunta o independiente se asocia con aislados de origen clínico y producción de ureasa y no se asocia con los de origen ambiental. La TDH se asocia efectos enterotóxicos, cardiotóxicos y citotóxicos, aunque el mecanismo de producción no se conoce. También se ha descrito una hemolisina termolábil (TLH), codificada por el gen *tlh*, que se ha descrito en más del 90% de las cepas de origen clínico y, lo contrario, en menos del 1% de las cepas de origen ambiental. También se ha descrito enteroinvasividad en el modelo conejo en el que la bacteria invade, coloniza y produce inflamación en el intestino delgado (Chatterjee et al., 1984).

La incidencia de la enfermedad en Asia, Europa y Estados Unidos diverge significativamente; a modo de ejemplo, en Osaka (Japón), *V. parahaemolyticus* fue reconocido como la causa de un brote con

272 casos de enfermedad y 20 muertes, asociado al consumo de sardinas (Daniels et al., 2000a). Posteriormente se ha implicado en el 20-30% de los casos de origen alimentario en dicho país (Alam et al., 2009) e identificado como una causa común de enfermedad en otros muchos países asiáticos (Wong et al., 2000) (Deepanjali et al., 2005), como sucede en Taiwán, que entre 1981-1999, los casos de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* representaron el 69% del total de brotes de origen alimentario (Anónimo, 2005) y en China el 31,1% (Liu et al., 2004). Por el contrario, en Europa raramente se han producido infecciones por esta causa, aunque se han documentado brotes esporádicos en España y Francia. En la Tabla 1 se representan los brotes más importantes acontecidos en Europa por *V. parahaemolyticus*. Con independencia de los brotes referenciados en la misma, el BEP (Boletín Epidemiológico Semanal, del Centro Nacional de Epidemiología-Instituto de Salud Carlos III) recoge un histórico de 35 brotes entre 1994 y 2003, con un máximo de seis brotes en los años 1996 y 1997 y un mínimo de uno en 1994. En el citado informe se señala que los cuatro brotes correspondientes a 2003, sumaron un total de 98 casos, todos ellos producidos por el consumo de pescado y mariscos contaminados. El último informe de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, actualizado al 1 de noviembre de 2009 y correspondiente a la semanas 1 a 13 de ese año, incluye un caso de enfermedad de transmisión alimentaria en la que se implicó *V. parahaemolyticus*, en Cataluña.

<b>Tabla 1.</b> Brotes por consumo de pescado y marisco contaminados por <i>V. parahaemolyticus</i> en Europa				
<b>País</b>	<b>Año</b>	<b>Nº casos</b>	<b>Alimento implicado</b>	<b>Referencia</b>
España	1989	8	Pescado y marisco	Molero et al., 1989
España	1999	64	Ostras crudas	Lozano-León et al., 2003
Francia	1997	44	Langostinos importados de Asia	Robert-Pillot et al., 2004
España	2004	80	Cangrejo cocido en condiciones de higiene deficientes	Martínez-Urtaza et al., 2005

Al igual que en el caso de Europa, en Estados Unidos los brotes producidos por *V. parahaemolyticus* son esporádicos. En 1971 cuando se identificó *V. parahaemolyticus* por primera vez como un agente etiológico, tras la aparición de tres brotes con 425 casos de gastroenteritis asociados con el consumo de cangrejo inadecuadamente cocinado en Maryland (Molenda et al., 1972). Entre 1973-1998 los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han descrito un total de 40 brotes (Daniels et al., 2000a). De entre ellos, cuatro brotes entre 1997 y 1998, que incluyeron mayor número de casos (por encima de 700) se asociaron al consumo de ostras crudas (CDC, 1998) (DePaola et al., 2000). Más recientemente, tuvo lugar un brote por consumo de ostras contaminadas procedentes de Washington y la Columbia Británica, que se saldó con un total de 177 casos (CDC, 2006).

Desde el punto de vista epidemiológico resulta de interés la creciente atención del serotipo O3:K6 que desde 1996 ha incrementado su presencia en Asia. Primero se describió en la India (Calcuta) y en corto espacio de tiempo hizo su aparición en Taiwán, Laos, Japón, Tailandia y Corea, desde donde se extendió a otros países (Chile, Rusia y los Estados Unidos) y más recientemente hizo su aparición en África y la costa francesa. En definitiva, el serotipo O3:K6 está difundido en la actualidad por cuatro

continentes (Okuda et al., 1997) (DC, 1999) (Daniels et al., 2000b) (Chiou et al., 2000) (Vuddhakul et al., 2000) (González-Escalona et al., 2005) (Martínez-Urtaza et al., 2005) y los estudios moleculares han puesto de manifiesto que las cepas de este serotipo asociadas con brotes epidémicos conforman un grupo genético definido, distinto de otras cepas no epidémicas y, también, de las cepas O3:K6 aisladas antes de 1996. Otros serotipos, como el O4:K68 y O1:KUT (no tipificable) parece que se han originado a partir del clon pandémico y se han señalado como derivados clonales. La variación ha continuado y desde 1998 se han descrito un total de 20 serovariantes con la misma consideración. O4:K68, O1:K125 y O1:KUT poseen secuencias *toxRS*, perfiles AP-PCR, ribotipos y perfiles PFGE idénticos a los del O3:K6. El O6:K18 comparte identidad molecular con el O3:K6. El resto, descritos por una gran variedad de técnicas de caracterización molecular, aislados en el curso de brotes diarreicos en diversas partes del mundo se consideran, como hemos señalado, derivados clonales, originados por alteración o modificación de los antígenos O:K. La lista, además de los descritos antes, incluye también: O4:K12, O1:K41, O1:K56, O3:K75, O4:K8, 5:KUT, O4:KUT, O5:KUT, O5:K17, O5:K25, O1:K33, O2:K3, OUT:KUT, O3:KUT, O3:K5, O4:K4, O4:K10 y O6:K18.

En el brote más importante de la enfermedad descrita en España, en Galicia en 1999, al que ya hemos hecho referencia, se aislaron varios serotipos, incluyendo O4:K11, O4:KUT y mediante PFGE pudo comprobarse que se trataba de un cluster claramente diferenciado de otros aislados originarios de Asia o América (Martínez-Urtaza et al., 2004).

Respecto de la relación de posibles factores de virulencia con el potencial pandémico, por el momento es una situación no resuelta y la mayor parte de los factores y su génesis se desconocen; se ha especulado con la posibilidad de que el fago f237 (ORF8), a semejanza de lo que ocurre con *V. cholerae*, fuera responsable de mayores niveles de adherencia y citotoxicidad, pero no ha podido recuperarse de aislados de casos clínicos de O3:K6. Ha llegado a afirmarse que el 28% de las combinaciones O:K reconocidas de *V. parahaemolyticus*, ha adquirido potencial pandémico (Balakrish Nair y Hormázabal, 2005). Debe precisarse, en cualquier caso, que la utilización del término pandémico aplicado al O3:K6 y el resto de serovariantes alude más a la descripción hecha por los investigadores que a una situación real de pandemia. Recientemente se ha descrito, en un estudio llevado a cabo a partir de cepas aisladas en Galicia (Martínez-Urtaza et al., 2008) la existencia de una relación entre la presencia del agente y su número y variables ambientales, incluyendo salinidad (mayor presencia en otoño, coincidiendo con una baja salinidad) con densidades medias de 1.234 NMP/100 g.

Se ha demostrado que muchas de las cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas del medio ambiente y productos pesqueros no son patógenas (Nichibuchi y Kaper, 1995) (FDA, 2005) y, a pesar de la relación descrita entre cepas productoras de TDH y aislamiento clínico (ver antes), también se han aislado de pacientes cepas KP negativas, por tanto no productoras de TDH, pero productoras de TRH (Honda et al., 1987) (Honda et al., 1988) (Shirai et al., 1990).

En estas condiciones, en el medio ambiente, la detección de *V. parahaemolyticus* virulento representa un problema a la hora de diferenciarlo de las cepas avirulentas. El recuento total, indiferenciado, se utiliza habitualmente como control de contaminación de alimentos. En relación con las consideraciones anteriores, claramente debería considerarse un indicador inadecuado (Balakrish Nair y Hormázabal, 2005) y la prueba está en brotes epidémicos que tuvieron lugar en los Estados Unidos pese a que los



recuentos del NMP fueron inferiores a  $10^4$  ufc/g (Pat et al., cit por Balakrish Nair y Hormázabal, 2005).

***Vibrio vulnificus*** es considerado un oportunista virulento y letal para determinados grupos de riesgo humanos, con una tasa de mortalidad que puede superar el 50% (Jones y Oliver, 2009) llegando incluso al 90% en casos de hipotensión grave. Desde un punto de vista general puede definirse como un microorganismo complejo con caracteres fisiológicos que contribuyen a su supervivencia en los ambientes marinos y en el hospedador humano.

Sobre la base de sus características bioquímicas, *V. vulnificus* es un Gram negativo halofílico, fermentador de la lactosa, que se clasifica en biotipos 1-3 (producción de indol y fermentación de la celobiosa). Las cepas pertenecientes al biotipo 1 son responsables de la mayoría de las infecciones humanas, mientras que las del biotipo 2 generalmente se asocian a procesos clínicos en las anguilas aunque se han descrito varios casos de infecciones de heridas en el hombre. El biotipo 3 (Bisharat et al., 1999) es en la práctica un híbrido de los dos biotipos anteriores (1 y 2) y es causa de infecciones de heridas en el hombre.

El biotipo 2 es heterogéneo y puede subdividirse en diferentes serovares. La primera descrita fue la serovar E (equivalente al serovar O4 del sistema de clasificación de Martin y Siebelin, 1991) que parece ser genéticamente homogénea, independientemente de su origen (peces o humano), porque constituye una excepción en el sentido de que se han descrito casos humanos producidos por él. El serovar A apareció en el año 2000 en anguilas, en España. Los serovares O3 y O3/4 solamente se han aislado en una ocasión a partir de anguilas, en Dinamarca (Fouz et al., 2007).

El microorganismo tiene su hábitat natural en los ambientes marinos costeros de todo el mundo y hasta la fecha ha sido aislado de agua, sedimentos y una amplia variedad de pescados y mariscos incluyendo peces, camarones, ostras, almejas, etc. (Baffone et al., 2006) (Mahmud et al., 2008).

*V. vulnificus* posee un variado arsenal de factores de virulencia incluyendo la capacidad de neutralización ácida, cápsula polisacárida, sistemas de captación de hierro, citotoxicidad, movilidad y adhesinas de carácter protéico, todos los cuales requieren un sistema de regulación en el proceso patogénico. Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de linajes genéticos. En el biotipo 1, que es el causante principal de las infecciones humanas, se ha descrito una isla de patogenicidad de 33 kb que incluye varios genes que parece se relacionan con la patogenicidad en otros patógenos, por lo que se ha sugerido que las cepas que la poseen son potencialmente virulentas.

La descripción de casos de infección por *V. vulnificus* ha aumentado sustancialmente en los últimos años, desconociéndose las causas responsables de este hecho. En Israel se han descrito varios brotes que se han relacionado con el aumento de las temperaturas, lo que hace pensar que el cambio climático podría relacionarse con un incremento de este tipo de enfermedades y su distribución en todo el mundo, pese a que la tasa de infección sigue relativamente baja, circunstancia que contrasta con el carácter ubicuo del microorganismo en los ambientes marinos. La explicación, al menos en parte, tiene que ver con que *V. vulnificus* raramente causa enfermedad grave en individuos sanos, mientras que en pacientes con problemas de salud, como enfermedades crónicas del hígado, diabetes, hemacromatosis, SIDA, tumores malignos y situaciones de inmunosupresión, el riesgo es elevado; de hecho, los individuos con el sistema inmune alterado o con enfermedades hepáticas, están 80 veces más predispuestos a padecer situaciones de septicemia que los individuos sanos (Klontz et al., 1988).

## Caracterización del peligro

### 1. *V. cholerae*

Es el causante de las pandemias humanas de cólera, un tipo de gastroenteritis causada por cepas productoras de la toxina del cólera que cursa con diarrea acuosa muy abundante (en "agua de arroz") que puede conducir a la muerte (Morris, 2003).

Después de un periodo de incubación que oscila desde unas pocas horas hasta cinco días, comienza de forma brusca una intensa diarrea acuosa, indolora y, ocasionalmente, con vómitos. La diarrea se describe típicamente "en agua de arroz" como consecuencia de la presencia de mucosidad, pero sin sangre. En algunos casos la deshidratación es extrema y, sin tratamiento, puede ser fatal.

*V. cholerae* se transmite a través de la ingestión de alimentos y agua contaminados con restos fecales o material del vómito de enfermos o portadores. La barrera gástrica es muy eficiente en controlar la infección hasta el punto de que dosis de  $10^{11}$  ufc a voluntarios humanos rara vez producen síntomas, mientras que la neutralización del pH, simplemente con  $\text{NaHCO}_3$ , produce la enfermedad con tan solo  $10^4$  ufc.

Una vez superado el estómago, los microorganismos colonizan el epitelio mucoso del intestino delgado y secretan la TC (los serogrupos coleregénicos) que en último extremo es la principal responsable del cuadro clínico.

La tasa de mortalidad puede alcanzar el 30-50% en individuos susceptibles, si la enfermedad no se diagnostica a tiempo (Bennish, 1994). Sin embargo, el tratamiento de la enfermedad está bastante desarrollado y, en la mayoría de los casos, esta tasa se reduce hasta el 1%. De hecho, la OMS indica que aproximadamente un 90% de los casos de cólera presentan una sintomatología leve o moderada, siendo difíciles de diferenciar clínicamente de otros casos de diarrea profusa.

Históricamente, el cólera se ha asociado a cepas toxigénicas del serogrupo O1, aunque como se ha señalado antes, algunas descripciones señalan la capacidad de producir toxina por parte de cepas no O:1/no O:139 si bien en ningún caso se han relacionado con situaciones de interés epidemiológico. Por tanto, la cuestión fundamental es si las cepas de *V. cholerae* en animales acuáticos portan o no el gen de la toxina y en relación con ello, efectivamente, algunos aislados ambientales se han asociado a la toxigenicidad, como ha sucedido por ejemplo, a partir de aguas marinas de la costa oeste de Estados Unidos, de donde se han recuperado cepas que portan el gen de la toxina (*ctxA* y *zot*) (Jiang et al., 2003). También recientemente se ha descrito la presencia de genes de virulencia relacionados con la producción de TC en cepas de origen ambiental en diversos estudios llevados a cabo en la India, Brasil y Estados Unidos (California), aunque hasta la fecha no se haya descrito toxicidad en las mismas.

En cualquier caso, se ha demostrado que la capacidad de producir toxina, igual que la de producir otros factores de virulencia, puede adquirirse de forma horizontal por parte de cepas ambientales de *V. cholerae* no O:1, no O:139, por mediación de fagos, lo que puede dar lugar a la emergencia de clones epidémicos. Además, en los últimos años se han descrito brotes epizooticos de los que se ha aislado *V. cholerae*, de diversas especies de peces y de algún tipo de marisco, lo que podría incluir la posible consideración de zoonosis por parte de algunas variantes del agente, generalmente de procedencia ambiental.

Según se ha señalado anteriormente, *V. cholerae* es muy sensible al pH ácido, por lo que en caso de ingestión normalmente se inactiva rápidamente en el estómago (Levine et al., 1984), circunstancia

que hace que la frecuencia de enfermedad, en la práctica, sea baja. Glass y Black (1992) estimaron una dosis infectiva del orden de  $10^2$ - $10^3$  ufc aunque en diversos estudios realizados en humanos dicha dosis resultó mucho más alta. En este sentido, se han llevado a cabo estudios en los que dosis de hasta  $10^{11}$  ufc en individuos no susceptibles no causaron enfermedad, mientras que dosis entre  $10^4$  y  $10^8$  ufc suministradas con 2 g de bicarbonato sódico (que neutraliza el pH gástrico) si provocaron enfermedad en los mismos individuos. En otros estudios con dosis más bajas ( $10^3$ - $10^5$  ufc) la probabilidad de contraer enfermedad osciló en torno al 60%, aunque con dosis inferiores a  $10^4$  ufc los síntomas fueron más leves y los periodos de incubación más prolongados (Levine et al., 1981).

## 2. *V. parahaemolyticus*

La infección en humanos por *V. parahaemolyticus* desencadena gastroenteritis aguda con diarrea, acompañada generalmente con dolor de cabeza, vómitos, náuseas y calambres abdominales (Cho et al., 2008).

El periodo de incubación oscila entre 4 y 96 horas, con una media de 15 horas. El cuadro clínico se considera autolimitante, de gravedad moderada, y un promedio de duración de tres días en pacientes sanos. Incluye diarrea, dolor abdominal, náuseas, vómitos, dolor de cabeza y fiebre baja; en ocasiones la diarrea es sanguinolenta, "como carne lavada", denominación con la que se describe un tipo de heces de color rojizo acuoso, pero diferente del que se puede ver en otros cuadros diarreicos parecidos, como en los producidos por *Shigella* o amebas. Además del cuadro gastroentérico, *V. parahaemolyticus* puede ser causa de infección de heridas y septicemia.

En Dinamarca, en el periodo 1987-1992, se aisló el microorganismo de 13 pacientes, de los cuales tres y diez presentaron heridas e infecciones de oído, respectivamente y todos ellos se asociaron con el ambiente marino (Hornstrup y Gahrhansen, 1993). En los últimos años *V. parahaemolyticus* se ha transformado en la causa principal de gastroenteritis asociada al consumo de productos pesqueros en Estados Unidos y, a nivel internacional, es un importante patógeno de origen marino (Kaysner y DePaola, 2001). Aunque normalmente la gastroenteritis producida por este agente es autolimitante, en pacientes inmunodeprimidos o con enfermedades crónicas puede causar septicemia de pronóstico grave o muy grave.

*V. parahaemolyticus* se considera un patógeno de interés creciente cuya vigilancia sanitaria previa al consumo se limita a que su número no exceda 100 ufc/g de pescado procedente de zonas de riesgo. Según se ha descrito en la parte expositiva de este informe, además de considerar su incremento general en todo el mundo, en algunas regiones se considera la toxiinfección alimentaria más frecuente asociada al consumo de pescado y, de forma particular, en Asia, donde es causa de la mitad de los brotes de este tipo y todos los serotipos tienen la consideración de capacidad pandémica (epidémica) potencial. Incluso en España, en Galicia y otras zonas costeras, se ha sufrido la experiencia de varios brotes importantes de la enfermedad, con hospitalizaciones incluidas.

Merece especial atención cuanto se refiere al serotipo epidemiológico O3:K6 que desde 1996 es la causa principal de enfermedad humana por consumo de pescado o marisco contaminado. Hasta la fecha se ha puesto de manifiesto una gran evolución de este serotipo del que se han descrito más de 20 serovariantes que se consideran derivados clonales surgidos por modificación o alteración

de la estructura antigénica, pero manteniendo su potencial patógeno intacto. Algunos autores han llegado a afirmar que casi un tercio de las combinaciones O:K de *V. parahaemolyticus* ha adquirido potencial pandémico (epidémico). Igualmente se ha señalado que el recuento total, indiferenciado de *V. parahaemolyticus*, como control de la contaminación alimentaria no es un buen indicador de la situación de riesgo alimentario.

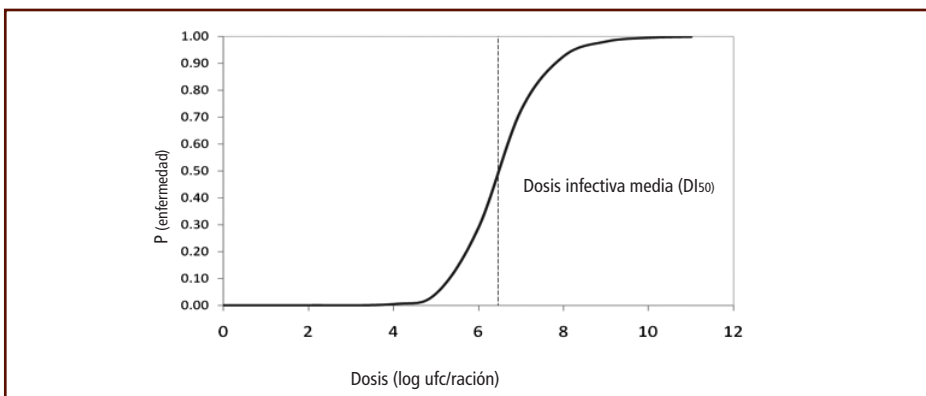
La dosis de riesgo se ha estimado en voluntarios humanos, con un rápido desarrollo de gastroenteritis después de la ingestión de niveles de  $2 \times 10^5$  a  $2 \times 10^7$  ufc del patógeno KP positivo; por otra parte, voluntarios que recibieron hasta  $1,6 \times 10^{10}$  ufc de un aislado KP negativo, no exhibieron signos de diarrea (Sanyal y Sen, 1974) (Oliver y Kaper, 1997). Sin embargo, en los brotes acontecidos en Canadá y Estados Unidos durante 1997 y 1998 por consumo de ostras, el análisis de muestras evidenció valores inferiores a 200 ufc/g de carne de ostra, lo que sugiere que la enfermedad puede aparecer como consecuencia de la exposición del agente a niveles mucho más bajos de los que habitualmente se habían considerado (CDC, 1999).

Con respecto a los modelos de dosis-respuesta (D-R) de *V. parahaemolyticus*, uno de los escasos modelos disponibles es el desarrollado por la FDA/CFSAN (2000). Basado en este estudio, se ha aplicado un modelo de dosis-respuesta tipo *Beta-Poisson*, con objeto de obtener la probabilidad de enfermar en función de la concentración ingerida del patógeno. El modelo aplicado se describe con la siguiente función:

$$P(\text{enfermedad}) = 1 - \left(1 + \frac{\text{dosis}}{\beta}\right)^{-\alpha}$$

donde  $\alpha$  y  $\beta$  son los parámetros a estimar por el modelo, dosis es la cantidad ingerida del microorganismo por servicio o ración expresada en ufc y  $P(\text{enfermedad})$  es la probabilidad de que un individuo contraiga enfermedad como consecuencia de la ingestión de una dosis determinada por servicio o ración.

Los parámetros del modelo *Beta-Poisson* utilizados fueron los siguientes:  $\alpha=0,6$  y  $\beta=1,31 \times 10^6$ .



**Figura 1.** Curva dosis-respuesta para *V. parahaemolyticus* obtenida con el modelo *Beta-Poisson*.

Como se puede observar en la Figura 1, la Dosis Infecciosa media ( $DI_{50}$ ), es decir, la dosis que produciría tras su ingestión una probabilidad del 50% de enfermar, correspondió a un valor de 6,5 log ufc. Este valor se encuentra en concordancia con los datos hasta ahora aportados sobre la posible dosis infecciosa.

### 3. *V. vulnificus*

*V. vulnificus* se define como un patógeno oportunista de procedencia ambiental e interés muy destacado en los últimos años, especialmente cuando se asocia a determinados grupos de riesgo en los que la infección por consumo o contagio a través de heridas, puede dar lugar a cuadros de una extrema mortalidad, superior al 50% en términos generales e incluso del 90% si se asocian otras características médicas particulares.

El consumo de pescado y marisco crudo contaminado puede dar lugar a una infección sistémica fulminante con fiebre, escalofríos, náuseas, *shock* séptico hipotensor y formación de lesiones secundarias en las extremidades de los enfermos (hasta el 60-70% de los casos) que se desarrollan en un plazo de 36 horas y que se inician en forma de eritema que evoluciona rápidamente a vesículas, ampollas y bullas hemorrágicas que se ulceran. Como se ha señalado, en un porcentaje superior al 50%, especialmente en determinados grupos de riesgo, la enfermedad puede terminar en un desenlace fatal. Especialmente se asocian con este pronóstico la concurrencia con enfermedades crónicas hepáticas, incluyendo cirrosis y hepatitis.

Además de septicemia, *V. vulnificus* se relaciona con infecciones graves de heridas resultantes del contagio de heridas abiertas con aguas contaminadas, como sucede con la práctica de baños en zonas contaminadas por la bacteria, heridas producidas por la manipulación del pescado o mariscos, etc. Igual que sucede en el caso de las infecciones sistémicas, las infecciones de heridas progresan rápidamente a celulitis, equimosis y vesículas que pueden evolucionar más tarde a fascitis necrotizante en el lugar de la infección, aunque en estos casos, la tasa de mortalidad es mucho más baja que en las infecciones sistémicas. Existe la posibilidad de diseminación secundaria al torrente circulatorio. La gastroenteritis es un cuadro menos frecuente que los dos anteriores, pero también se describe; en este caso, el diagnóstico por aislamiento sólo se lleva a cabo por coprocultivo.

En estas condiciones debería incluirse alguna cautela para la inspección en frontera de especies de pescado y marisco procedentes de zonas de riesgo, tanto con carácter general sobre la especie (los tres biotipos pueden ser causa de infecciones de heridas), como en particular en relación con el biotipo 1, que se asocia con la mayoría de las infecciones humanas por consumo de pescado o marisco crudo o escasamente cocinado.

Resumiendo, pues, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, guardan relación con procesos humanos de interés desde el punto de vista clínico, y en los tres casos el contagio se produce por ingestión de alimentos de origen marino (pescado o mariscos) o agua contaminados. En el caso de *V. vulnificus*, además, es típico contaminante de heridas abiertas a partir del contacto con agua contaminada o como consecuencia de la manipulación de pescados o mariscos contaminados.

## Evaluación de la exposición

### 1. *V. cholerae*

*V. cholerae* está ampliamente distribuido en ambientes marinos, aunque los serotipos O1 y O139 relacionados con la producción de la TC se aíslan con frecuencia muy baja. Según la información aportada por la Evaluación de Riesgo Microbiológico de *V. cholerae* O1 y O139 realizada por la FAO, en gambas importadas procedentes de aguas templadas (FAO/OMS, 2005), los procesos de inactivación como el lavado, refrigeración/congelación y cocinado, producen una reducción sustancial de la concentración de *V. cholerae* en el alimento final.

Los factores físico-químicos que limitan el crecimiento de *V. cholerae* fueron cuantificados en 1996 por la ICMSF<sup>2</sup>. La temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, pudiendo crecer en un rango entre 10-43 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 7,6 aunque el microorganismo puede crecer en un margen entre 5,0 y 9,6. *V. cholerae* puede tolerar concentraciones moderadas de NaCl (4,0%), y su nivel de *a<sub>w</sub>* óptimo para crecer es de 0,998 (el rango de crecimiento se puede dar entre 0,970 y 0,998). En cuanto a los factores que le inactivan se cuentan el pH ácido y la desecación, por lo que se recomienda utilizar contenedores de almacenamiento limpios y secos, para no favorecer la transmisión del microorganismo en la cadena producción-consumo.

Asimismo, es un microorganismo termolábil, que presenta un valor D de 2,65 min a 60 °C (ICMSF, 1996). Castro-Rosas y Escartin (2005) estudiaron la supervivencia de *V. cholerae* O1 en gambas frescas sometidas a diferentes temperaturas comprobando la inactivación en 10, 5, 3 y 1 min después de calentamientos de 50, 60, 65 y 70 °C respectivamente.

Kolvin y Roberts (1982) estudiaron el crecimiento de *V. cholerae* en pescado y marisco crudo y cocinado. No se observó crecimiento en gambas, ostras y mejillones crudos, aunque sí hubo crecimiento en marisco cocinado, llegándose a alcanzar niveles de 10<sup>10</sup> ufc/g en langostinos y mejillones cocinados y almacenados a 37 °C. No obstante, a temperaturas de refrigeración, se produce un descenso de la población de *V. cholerae*, aunque parte de la misma permanece viable durante un cierto periodo de tiempo.

En general, partiendo de concentraciones de entre 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> ufc/g se han podido aislar *V. cholerae* viables después de un almacenamiento de cuatro días a 5 °C, y de 9 días a 10 °C. A concentraciones mayores (10<sup>8</sup> ufc/g) se ha comprobado que *V. cholerae* puede sobrevivir durante 21 días a 7 °C (Reilly y Hackney, 1985). En relación al efecto de las temperaturas de congelación sobre la inhibición de *V. cholerae*, los estudios son contradictorios; según la ICMSF (1996) *V. cholerae* es capaz de sobrevivir durante más de seis meses en condiciones normales de congelación, aunque otros estudios indican que a -20 °C, puede producirse un descenso de 6 log ufc/g de la población microbiana en 30 días de almacenamiento (Nascumento et al., 1998). Parece necesario, por tanto, nuevos estudios a fin de poder establecer conclusiones fiables.

## 2. *V. parahaemolyticus*

La distribución de *V. parahaemolyticus* en ambientes marinos está relacionada con la temperatura de las aguas. En un estudio reciente (noviembre de 2002 a octubre de 2003) llevado a cabo en Oregón (EE UU) en zonas de cultivo de ostras se observó una correlación positiva entre la presencia de *V. parahaemolyticus* en agua de mar y su temperatura, encontrando las poblaciones más altas en los meses de verano (Duan y Su, 2005). Asimismo, el grado de contaminación de *V. parahaemolyticus* en marisco crudo se asocia con la temperatura del agua; aunque la concentración del microorganismo normalmente está por debajo de 10<sup>3</sup> ufc/g en ostras en el momento de su recogida (Kaysner y DePaola, 2000), hay que admitir que se podría superar esta concentración en ostras recogidas en aguas cálidas, multiplicándose después como consecuencia de la exposición a temperaturas elevadas. Algunos estudios han mostrado que las poblaciones de *V. parahaemolyticus* en el caso de ostras sin refrigerar pueden aumentar rápidamente

<sup>2</sup>International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

entre 50-790 veces dentro de las 24 horas después de la captura, si las ostras se exponen a 26 °C (Gooch et al., 2002). Cook et al. (2002), en un estudio sobre 370 lotes de ostras muestreadas de restaurantes, puestos de venta de ostras, tiendas y mercados de productos pesqueros en Estados Unidos, entre junio 1998-julio 1999, observaron una distribución estacional de *V. parahaemolyticus* con niveles altos (en algunos casos por encima de 1.000 MPN/g) en los meses de verano. Por otra parte, se ha demostrado también que tratamientos térmicos moderados, o tratamientos de congelación y de altas presiones hidrostáticas aplicados a ostras recién capturadas, producen una disminución de entre 5 a 6 unidades logarítmicas con respecto a ostras no procesadas (DePaola et al., 2009).

El crecimiento de *V. parahaemolyticus* a temperaturas entre 15-40 °C puede ser muy rápido, con un tiempo de generación de 8-9 minutos en caldo de cultivo, en condiciones óptimas (37 °C). Miles et al. (1997) desarrollaron un modelo de crecimiento en caldo de cultivo que describe la tasa de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en función de la temperatura y la actividad de agua ( $a_w$ ), con buenas predicciones en alimento. La temperatura mínima para el crecimiento fue 8,3 °C; la máxima de 45,3 °C; y la óptima, entre 37 y 39 °C. *V. parahaemolyticus* puede crecer en un amplio rango de  $a_w$  desde 0,936-0,995 (con 9,6-0,4% de NaCl), con un óptimo de 0,982-0,987.

Se dispone, además, de información sobre la viabilidad de *V. parahaemolyticus* en filetes de pescado fresco inoculados con una mezcla de tres cepas del agente, almacenados a 4 y 8 °C durante nueve días, y a -18 °C durante siete semanas (Vausdevan et al., 2002). En las dos temperaturas de refrigeración, con un inóculo inicial de  $10^3$  y  $10^4$  ufc/filete, el microorganismo sobrevivió, aunque se observó una reducción significativa al final del período de almacenamiento. En filetes congelados, la reducción fue muy acusada ya en el quinto día de almacenamiento. Los autores de la investigación concluyeron que la refrigeración o congelación, por sí solas, no constituyen métodos válidos para reducir *V. parahaemolyticus* en el pescado, pues tanto el tiempo como la magnitud de la reducción dependen de la concentración inicial del patógeno y de la temperatura de almacenamiento.

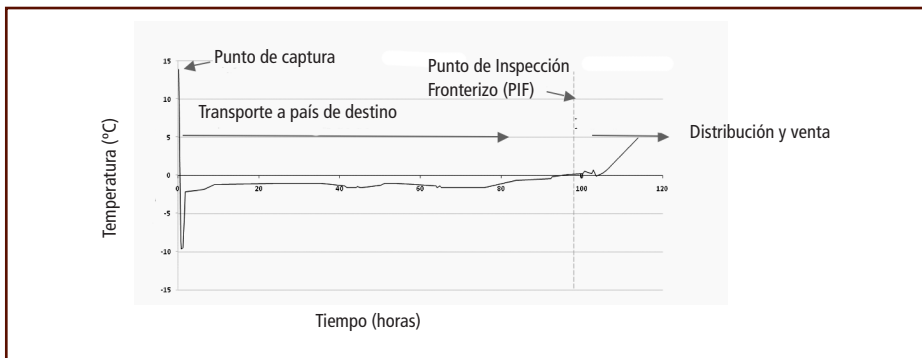
Más recientemente se han desarrollado varios modelos de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en salmón (Yang et al., 2009) y en preparados de ostras (Yoon et al., 2008). En el caso del salmón, se comprueba que el microorganismo es capaz de crecer a partir de los 12 °C, mientras que a temperaturas inferiores, la concentración microbiana se reduce con el tiempo. A partir de los 16 °C, el crecimiento se presenta muy acelerado, incrementándose dos unidades logarítmicas a 16 °C tras 130 h, mientras que a 20 °C requiere 30 h y a 25 °C, tan sólo 12 h.

En el caso de las ostras, hasta 15 °C decrece la concentración de *V. parahaemolyticus* que comienza a crecer, muy lentamente, a partir de 20 °C (a 20 °C aumenta una unidad logarítmica después de 75 horas de almacenamiento). Un aumento de la temperatura de tan sólo 5 °C (25 °C) produce un crecimiento muy acusado, observándose un incremento de dos unidades logarítmicas en 28 h; a 30 °C el tiempo necesario para producir tal incremento fue de 9,5 h.

### Estimación de la dosis de exposición mediante la simulación de escenarios de supervivencia-crecimiento de *V. parahaemolyticus*

Con objeto de representar el comportamiento del microorganismo, se recurre a simular las condiciones reales de mantenimiento refrigerado desde la captura hasta el consumo. A este respecto, tanto en

el caso del salmón como de las ostras, se consideran dos fases: a) desde la captura del producto hasta la toma de muestras en el PIF (Puesto de Inspección Fronterizo), y b) desde este momento hasta el consumo, partiendo de varios niveles hipotéticos de contaminación por *V. parahaemolyticus* y considerando un perfil habitual tiempo-temperatura (Figura 2).



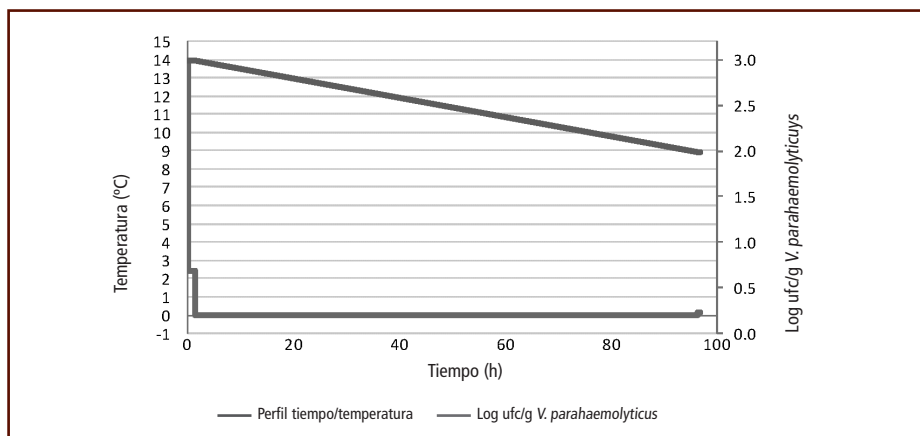
**Figura 2.** Perfil tiempo-temperatura desde la captura hasta la venta de productos pesqueros importados (merluza). Adaptado de (Zubia, 2008).

En cualquier caso, se contemplan los siguientes considerandos:

1. La temperatura es el factor más importante a controlar en relación al crecimiento de *V. parahaemolyticus*.
2. El nivel de riesgo potencial es en todo caso superior a  $10^2$  ufc/g en el alimento final, entendiéndose que no existe un riesgo significativo si la concentración es inferior.
3. En el primer escenario (captura-PIF), se asume un perfil tiempo-temperatura de enfriamiento en condiciones reales. En el segundo (PIF-consumo) se aplican modelos de crecimiento de *V. parahaemolyticus* en ostras y salmón a temperatura constante.

**Primer escenario (Captura-PIF).** Se aplica el modelo descrito por Yang et al. (2009) para cuantificar la inactivación de *V. parahaemolyticus* durante el almacenamiento en frío desde la captura hasta el PIF (Figura 3). La concentración final del microorganismo en el PIF se representa en la Tabla 2.





**Figura 3.** Perfil tiempo-temperatura y evolución de *V. parahaemolyticus* en el producto desde la captura hasta su entrada en el PIF.

**Tabla 2.** Concentración del microorganismo en el PIF partiendo de diferentes niveles de contaminación en el punto de captura

Concentración inicial <i>V. parahemolyticus</i> (ufc/g)	Concentración en PIF	
	Log ufc/g	ufc/g
1	-1,044	0,090
10	-0,044	0,904
100	0,956	9,043
1.000	1,956	90,426

Partiendo de las cuatro concentraciones hipotéticas que se contemplan en el punto de captura (Tabla 2), la concentración microbiana se reduciría 1,044 unidades logarítmicas, siendo la concentración final alcanzada inferior a 100 ufc/g en todos los casos.

**Segundo escenario (PIF-consumo).** Partiendo de diferentes concentraciones de *V. parahaemolyticus* en los PIF, se aplican los mencionados modelos tanto para salmón como para ostras, obteniéndose la concentración final alcanzada tras su almacenamiento durante 72 h a diferentes temperaturas (Stroud, 2001) (Tabla 3).

**Tabla 3.** Concentración final (log ufc/g) de *V. parahaemolyticus* en salmón y ostras tras el almacenamiento (72 h) previo al consumo a distintas temperaturas

T (°C)	Nivel en PIF (log ufc/g)							
	0		1		2		3	
	salmón	ostras	salmón	ostras	salmón	ostras	salmón	ostras
0	-1,21	-*	-0,22	-*	0,78	-*	1,78	-*
4	-0,74	-*	0,26	-*	1,26	-*	2,26	-*
8	-0,38	-*	0,62	-*	1,62	-*	2,62	-*
10	0,00	-*	1,00	-*	2,00	-*	3,00	-*
12	0,00	-*	1,00	-*	2,00	-*	3,00	-*
14	0,20	-*	1,20	-*	2,20	-*	3,20	-*
16	1,17	-*	2,17	-*	3,17	-*	4,17	-*
20	5,80	0,64	6,80	1,64	7,80	2,64	8,80	3,63
25	6,75	1,30	7,75	2,30	8,75	3,30	9,00	4,30

\*No se han encontrado modelos secundarios de supervivencia disponibles para ostras a estas temperaturas.

De los datos de la Tabla 3 se puede observar en el caso de salmón, que no existe crecimiento de *V. parahaemolyticus* por debajo de 12 °C, mientras que entre 16 y 20 °C, el crecimiento se acelera de forma notoria. Concentraciones de inicio en los PIF de  $10^1$  y  $10^2$  ufc/g en salmón, aumentarían hasta poco más de  $10^2$  y de  $10^3$  ufc/g respectivamente, tras 72 horas de almacenamiento a 16 °C. En el caso de las ostras, a esta temperatura, el microorganismo simplemente no crecería. Experimentos llevados a cabo en ostras a 10 y 15 °C demuestran que la concentración de *V. parahaemolyticus* disminuye a dichas temperaturas y comienza a crecer, muy débilmente, a partir de 20 °C (Yoon et al., 2008). En conclusión, se puede observar que el crecimiento de *V. parahaemolyticus* en ostras es marcadamente más lento que en salmón a las temperaturas de 20 y 25 °C. Por debajo de 20 °C, sólo se ha observado crecimiento en salmón.

### Caracterización del riesgo

El riesgo de padecer enfermedad por consumo de productos pesqueros contaminados por *Vibrio* spp. puede calificarse, 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*, en productos pesqueros procedentes de terceros países.

Salvo situaciones particulares, la exposición del consumidor a estos patógenos es muy baja, debido al mantenimiento de temperaturas de refrigeración bajo las cuales el microorganismo no crece, a la baja prevalencia de los serotipos patógenos de *Vibrio* en productos de la pesca, y al consumo muy limitado de pescado o marisco crudo en España. De hecho, los brotes de esta etiología son de carácter esporádico. No obstante, una razón para explicar los brotes producidos en los últimos años, pudiera ser la pérdida de control de las temperaturas, pues aún partiendo de concentraciones del patógeno muy bajas en la captura o en los PIF, las temperaturas elevadas pueden producir un aumento considerable en la concentración, pudiéndose alcanzar niveles de riesgo para la salud.

Por otro lado existen evidencias de la capacidad de especies de *Vibrio*, para mantenerse en estado viable pero no cultivable. En este estado las bacterias mantienen su viabilidad y su potencial patogénico pero no son recuperadas como unidades formadoras de colonia en los habituales métodos de recuento en placa. En el caso de *V.cholerae* O1 se ha demostrado su capacidad de entrar en este estado en condiciones de escasez de nutrientes u otras situaciones ambientales desfavorables (Alam et al., 2007) (Binsztein et al., 2004).

### **1. Estimación del tiempo en alcanzar niveles de riesgo de *V. parahemolyticus* en el momento del consumo**

Con los modelos de crecimiento descritos, se puede calcular el tiempo necesario para alcanzar niveles de riesgo en el momento de consumo ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  y  $10^6$  ufc/g), partiendo de concentraciones de *V. parahemolyticus* encontradas en los PIF (Tabla 4).

**Tabla 4.** Tiempo necesario (horas) para alcanzar determinados niveles de *V. parahaemolyticus* tras el almacenamiento a diferentes temperaturas

Concentraciones de inicio de <i>V. parahaemolyticus</i> (ufc/g)									
T (°C)	Nivel final (ufc/g)	1 ufc/g		10 ufc/g		100 ufc/g		1.000 ufc/g	
		salmón fresco	ostras	salmón fresco	ostras	salmón fresco	ostras	salmón fresco	ostras
10 °C	10 <sup>2</sup> ufc/g	> 1.000	-*	> 1.000	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 <sup>3</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	0,000	0,000
	10 <sup>4</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 <sup>5</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 <sup>6</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
12 °C	10 <sup>2</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 <sup>3</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	0,000	0,000
	10 <sup>4</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 <sup>5</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
	10 <sup>6</sup> ufc/g	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-	> 1.000	-
14 °C	10 <sup>2</sup> ufc/g	378	-	230	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 <sup>3</sup> ufc/g	527	-	379	-	230	-	0,000	0,000
	10 <sup>4</sup> ufc/g	676	-	529	-	379	-	230	-
	10 <sup>5</sup> ufc/g	826	-	678	-	529	-	379	-
	10 <sup>6</sup> ufc/g	975	-	827	-	678	-	529	-
16 °C	10 <sup>2</sup> ufc/g	92	-	56	-	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 <sup>3</sup> ufc/g	128	-	92	-	56	-	0,000	0,000
	10 <sup>4</sup> ufc/g	164	-	128	-	92	-	56	-
	10 <sup>5</sup> ufc/g	200	-	165	-	128	-	92	-
	10 <sup>6</sup> ufc/g	237	-	201	-	165	-	128	-
20 °C	10 <sup>2</sup> ufc/g	23	147	14	89	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 <sup>3</sup> ufc/g	31	206	23	148	14	89	0,000	0,000
	10 <sup>4</sup> ufc/g	40	265	32	207	23	148	14	89
	10 <sup>5</sup> ufc/g	49	325	41	266	32	207	23	148
	10 <sup>6</sup> ufc/g	58	384	50	326	41	266	32	207
25 °C	10 <sup>2</sup> ufc/g	9	88	5	52	0,000	0,000	0,000	0,000
	10 <sup>3</sup> ufc/g	12	124	9	88	5	52	0,000	0,000
	10 <sup>4</sup> ufc/g	15	160	12	124	9	88	5	52
	10 <sup>5</sup> ufc/g	19	196	15	161	12	124	9	88
	10 <sup>6</sup> ufc/g	22	233	19	197	15	160	12	124

\*Según los modelos de predicción existentes en la bibliografía, no hay crecimiento a temperaturas inferiores a 20 °C.

Como puede observarse en la Tabla 4, el tiempo necesario en alcanzar un determinado nivel de riesgo viene determinado por la concentración inicial y la temperatura de almacenamiento para cada tipo de producto pesquero. A 20 °C o más, concentraciones en ostras de 1, 10 y 10<sup>2</sup> ufc/g de *V. parahaemolyticus* en los PIF, alcanzarían el nivel de 10<sup>6</sup> ufc/g, respectivamente en aproximadamente 16, 14 y 11 días respectivamente. En el caso del salmón se observan tiempos más cortos. Así a temperaturas de 20 °C y partiendo de los mismos niveles iniciales (1, 10 y 10<sup>2</sup> ufc/g) se alcanzarán niveles de 10<sup>6</sup> ufc/g en tiempos inferiores a los 2,5 días. A temperaturas de 12 °C o inferiores se necesitarían más de 40 días en alcanzarse dicha dosis de exposición.

## 2. Estimación de la probabilidad de enfermar asociada al consumo de productos pesqueros contaminados con *V. parahaemolyticus*

Para estimar la probabilidad de enfermar asociada al consumo de productos pesqueros, se aplicó el modelo D-R, descrito en el apartado "Caracterización del Peligro", sobre la concentración de *V. parahaemolyticus* en el alimento antes de su consumo (Tabla 3) y en relación a la ración consumida. Las unidades de consumo habitual pueden venir expresadas como medidas caseras, como porciones o raciones típicas o medias o como unidades convencionales. En este caso, se ha considerado un tamaño medio de ración de 100 g de salmón y ostras.

Las probabilidades obtenidas revelan que la temperatura de almacenamiento es un factor crítico, junto con el nivel de contaminación inicial. En el caso del salmón mantenido a 14 °C y asumiendo un nivel de contaminación de *V. parahaemolyticus* de 10<sup>3</sup> ufc/g en PIF la probabilidad de enfermar es del 6,64%, mientras que un almacenamiento a 16 °C supone un incremento superior al 36,66% y por encima de 20 °C, la probabilidad es superior al 90%. En el caso de las ostras, como el crecimiento de *V. parahaemolyticus* es menor, asumiendo el peor caso posible en el modelo (contaminación inicial de 10<sup>3</sup> ufc/g en PIF seguido de un almacenamiento a 25 °C), el valor máximo alcanzado de probabilidad de enfermar llega al 42,77%.

La probabilidad de contraer enfermedad difirió de forma notoria en función de los distintos niveles de contaminación de *V. parahaemolyticus* en los PIFs (1, 10, 100 y 1.000 ufc/g); por ejemplo, una reducción de la contaminación de 10<sup>3</sup> a 10<sup>2</sup> ufc/g en el salmón produce una reducción de la probabilidad del 920%, suponiendo un almacenamiento a 14 °C y en el caso de las ostras, la misma reducción del grado de contaminación hace que la probabilidad disminuya hasta en un 815%, asumiendo un almacenamiento a 20 °C. A partir de estos resultados, se desprende que la concentración máxima admisible de *V. parahaemolyticus* en los PIFs no debe superar 10<sup>2</sup> ufc/g, ya que niveles superiores producen un incremento muy significativo de la probabilidad de contraer enfermedad.

## Consideraciones finales derivadas del análisis de los datos y de la información disponible

En España, los casos de enfermedad producida por *Vibrio* spp. se han limitado a brotes esporádicos. De esta afirmación podría deducirse que las medidas de control vigentes hasta ahora (detección de *V. cholerae* serotipo O:1 y O:139, y concentraciones permitidas hasta 10<sup>2</sup> ufc/g de *V. parahaemolyticus*) son eficaces. Su anulación podría tener consecuencias indeseables, sobre todo tratándose de productos de la pesca importados de países terceros (principalmente asiáticos), con una elevada incidencia de la enfermedad y marcado protagonismo de *V. parahaemolyticus* con respecto a otros patógenos vehiculados por alimentos.

Por otra parte, pese a que el Reglamento (CE) N° 2073/2005 no establece criterio microbiológico específico para *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, "en función de las pruebas científicas disponibles" (aunque se refiere a la necesidad de elaborar métodos fiables, en el caso de *V. parahaemolyticus*), sí recomienda el establecimiento de códigos de prácticas para la aplicación de "Buenas Prácticas de Higiene". Además, el documento de la SCVPH (2001) se refiere a que la mayoría de los brotes producidos en Europa por *V. parahaemolyticus* se deben al consumo de pescado y mariscos importados, especialmente de Asia, consumido crudo o cocinado inadecuadamente o recontaminado, por lo que parece oportuno el mantenimiento del control del pescado y derivados procedentes de países terceros.

Respecto de la situación vigente en las legislaciones de otros países, en el caso de *V. cholerae*, mayoritariamente los límites aplicados establecen tolerancia cero. Por ejemplo, la FDA en Estados Unidos en el caso de productos pesqueros listos para el consumo, establece ausencia en 25 g (FDA, 1998); la *Australian New Zealand Food Standards Code* (ANZSC), define un criterio  $n=5; c=0$  para crustáceos crudos y cocidos (ANZSC, 2001) y en algunos países europeos, como el Reino Unido, se mantiene también un criterio de tolerancia cero definido por su ausencia en 25 g. En todos los casos no se hace distinción entre grupos O1 y no O1 (PHLS, 1996).

En el caso de *V. parahaemolyticus*, existen criterios microbiológicos y/o recomendaciones en distintos puntos de la cadena alimentaria. En Holanda, por ejemplo, se aceptan niveles inferiores a  $10^2$  ufc/g en el momento de venta para productos pesqueros importados congelados, cocinados o crudos (SCVPH, 2001). En el Reino Unido la *Health Protection Agency* (HPA), para productos listos para el consumo, también en el punto de venta, consideran insatisfactorios niveles superiores a  $10^2$  ufc/g, y potencialmente peligrosos por encima de  $10^3$  ufc/g (HPA, 1996). En el caso de Estados Unidos, la FDA (1998) considera el límite máximo un nivel de  $10^4$  ufc/g, incluyendo *V. parahaemolyticus* Kanagawa positivo o negativo. En Australia y Nueva Zelanda, la ANZSC establece como criterio estándar de obligado cumplimiento en manufactura y venta  $n=5; c=2; m=10^2; M=10^3$  (ANZSC, 2001). Finalmente, Japón ha definido un estándar para ostras crudas que tolera valores inferiores a  $10^2$  ufc/g (CCFH, 2002). Concluyendo pues, en nuestro caso podría establecerse como apropiado un límite máximo de  $10^2$  ufc/g. para *V. parahaemolyticus*.

Aunque existe muy poca información respecto a la dosis infectiva (infecciosa) de *V. parahaemolyticus* y en todo caso depende de otros factores (como el estado inmune del consumidor), algunos organismos internacionales se han pronunciado por valores de  $10^6$  ufc (FDA CFSAN, 2000). No obstante, a tenor de la investigación de brotes que tuvieron lugar en Canadá y Estados Unidos durante 1997 y 1998 por consumo de ostras, en el que el análisis de muestras procedentes de zonas de captura implicadas en los brotes, evidenció valores inferiores a 1.000 ufc/g, algunas de ellas con niveles tan bajos como de 100 ufc/g de *V. parahaemolyticus* en carne de ostra, se sugirió que la enfermedad podría aparecer como consecuencia de la exposición al agente a niveles mucho más bajos de los que habitualmente se habían considerado (CDC, 1999). Esto no debe cuestionar la propuesta del criterio ( $m=10^2$  ufc/g), ya que aún teniendo en cuenta que dosis inferiores a la  $DI_{50}$  pudieran causar enfermedad, aunque con una menor probabilidad, estas pueden explicar la aparición de casos aislados o brotes esporádicos que pudieran estar asociados a tan bajas dosis. Por otra parte, dicho criterio debe estar especialmente condicionado al mantenimiento de la cadena del frío para proporcionar un nivel adecuado de protección al consumidor. Así, partiendo de los niveles encontrados en los PIFs, por ejemplo  $10^2$  ufc/g, solo en el supuesto de temperaturas de mantenimiento

inadecuadas (más de 14 °C en el caso del salmón y superiores a 20 °C en el caso de las ostras) pueden conllevar riesgo, y por debajo de ellas, se obtienen probabilidades de enfermar inferiores al 1%.

## Conclusiones del Comité Científico

1. La aplicación de criterios microbiológicos en los PIFs, como medida adicional y complementaria de control, se considera justificada y muy adecuada, en relación con la importación de pescado y productos pesqueros procedentes de terceros países, por lo que se refiere a la presencia de microorganismos patógenos del género *Vibrio*.
2. Respecto de *V. cholerae*, se recomienda aplicar, igual que sucede en otros países, un criterio de tolerancia cero (ausencia en 25 g) sin distinción entre serotipos. En el caso de serotipos distintos de O:1 y O:139 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.
3. Respecto de *V. parahaemolyticus*, se considera adecuado la aplicación de un límite máximo de 10<sup>2</sup> ufc/g, por otra parte, el más común en la normativa de distintos países. Igualmente consideramos que el criterio microbiológico y plan de muestreo establecido para *V. parahaemolyticus* en los PIFs ( $n=5$ ,  $c=0$ ,  $m=M=10^2$  ufc/g) es adecuado y suficiente. En cualquier caso, a partir de capturas procedentes de zonas de riesgo, debería establecerse un plan de vigilancia especial en relación con algunas de las serovariantes principales del O3:K6 surgidas en los últimos años en relación con brotes de enfermedad, como paso previo para la adopción de otro tipo de criterios.
4. Se recomienda extender, igualmente, la vigilancia de pescado y mariscos procedentes de zonas de riesgo a *V. vulnificus*. Desde el punto de vista epidemiológico, el dato de su inclusión en la lista de riesgos sería de gran utilidad y, en particular, la detección del biotipo 1, que se asocia en mayor medida a procesos debidos a consumo de pescado. Sobre esta base, la advertencia a los grupos de consumidores de riesgo (pacientes de enfermedades hepáticas, enfermos crónicos, pacientes inmunodeprimidos, etc.), de eliminar de la dieta este tipo de alimentos o en todo caso, garantizar que su preparación culinaria eliminase el agente, sería una consecuencia deseable. Igualmente se recomienda mantener cierta cautela respecto de las mismas zonas (de riesgo) en lo que se refiere a cualquiera otra especie de *Vibrio*, en particular las consideradas patógenas (además de las referidas, *Vibrio alginoliticus*, *V. fluviales* y *V. harveyi*).
5. Se destaca la importancia crítica de la temperatura de mantenimiento del pescado y productos de la pesca. El mantenimiento de estos productos a temperaturas de refrigeración correctas, proporcionan un nivel adecuado de protección al consumidor, ya que, incluso en abusos de temperatura, se necesitarían más de 28 días en alcanzarse la dosis infectiva de 6,5 log ufc de *V. parahaemolyticus* en salmón mantenido a 14 °C, mientras que en ostras sólo se evidencia crecimiento a partir de 20 °C. La pérdida de la cadena de frío, justifica que la mayoría de los brotes descritos presenten carácter esporádico.
6. En España, en función de los datos disponibles sobre el consumo de pescado y productos de la pesca, y de los datos sobre identificación, prevalencia y concentración de microorganismos patógenos del género *Vibrio*, el riesgo de padecer enfermedad por el consumo de productos pesqueros contaminados, puede calificarse con carácter general de muy bajo.

## Referencias

- Alam, M., Chowdhury, W.B., Bhuiyan, N.A., Islam, A., Hasan, N.A., Balakrish Nair, G., Watanabe, H., Siddique, A.K., Huq, A., Sack, B., Akhter, N.A., Grim, C.J., Kam, M., Luey, C.K.Y., Endtz, H.Ph., Cravioto, A. y Colwell, R.R. (2009). Serogroup, virulence and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh. *Applied Environmental Microbiology*, 75 (19), pp: 6268-6274.
- Alam, M., Sultana, M., Nair, G.B., Siddique, A.K., Hasan, N.A., Sack, R.B., Sack, D.A., Ahmed, K.U., Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C. J., Huq, A. y Colwell, R.R. (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104 (45), pp: 17801-17806.
- Anónimo (2005). Food Poisoning in Taiwan, 1981-2003. Department of Health, Taiwan. Disponible en: [http://food.doh.gov.tw/chinese/academic/academic2\\_1.htm](http://food.doh.gov.tw/chinese/academic/academic2_1.htm) [acceso: 2-7-06].
- ANZSC (2001). Australian New Zealand Food Standards Code. User guide to Standard 1.6.1-Microbiological Limits for Food with additional guideline criteria.
- Austin, B. (2009). *Vibrios* as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*. (in press: doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.015).
- Austin, B. y Austin, D.A. (2007). Bacterial fish pathogens. En libro: *Diseases of farmed and wild fish*. Godalming, Springer Praxis.
- Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, G.L. y Pruzzo, C. (2006). Detection of free-living and plankton-bound vibrios in coastal waters of the Adriatic Sea (Italy) and study of their pathogenicity associated properties. *Environmental Microbiology*, 8 (7), pp: 1299-1305.
- Balakrish Nair, G. y Hormázabal, J.C. (2005). The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. *Revista Chilena de Infectología*, 22 (2), pp: 125-130.
- Bennish, M.L. (1994). Cholera: Pathophysiology, clinical features and treatment. En libro: *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to Global Perspectives*. Wachsmuth, I.K., Blake P.A. y Olsvik, B. Washington D.C., American Society for Microbiology Press.
- Binsztein, N., Costagliola, M.C., Pichel, M., Jurquiza, V., Ramírez, F.C., Akselman, R., Vacchino, M., Huq, A. y Colwell, R. (2004). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in the aquatic environment of Argentina. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (12), pp: 7481-7486.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lemer, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D.N., Wykstra, D.L., Serdlow, D.L. y Farmer III, J.J. (1999). Clinical, epidemiological and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. *Lancet*, 354 (9188), pp: 1421-1424.
- Blake, P.A., Wachsmuth, K., Davis, B.R., Bopp, C.P., Chaiken, B.P. y Lee, J.V. (1983) Choleraogenic *V. cholerae* O1 strains from Mexico identical to United States isolates. *Lancet*, 322 (8355), pp: 912.
- Castro-Rosas, J. y Escartin, E.F. (2005). Increased tolerance of *Vibrio cholerae* O1 to temperature, pH, or drying associated with colonization of shrimp carapaces. *International Journal of Food Microbiology*, 102 (2), pp:195-201.
- CCFH (2002). Codex Committee on Food Hygiene. Discussion paper on risk management strategies for *Vibrio* spp. in seafood. CX/FH 03/5-Add.3. Disponible en: [http://www.cofexalimentarius.net/ccfh35/fh03\\_01e.htm](http://www.cofexalimentarius.net/ccfh35/fh03_01e.htm) [acceso: 8-2-10].
- CDC (1991). Centers for Disease Control and Prevention. Epidemiological notes and reports cholera-New York 1991. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 40 (30), pp: 516-518.
- CDC (1998). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infections associated with eating raw oysters-Pacific Northwest, 1997. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 47 (22), pp: 457-462.
- CDC (1999). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey and New York, 1998. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 48 (3), pp: 48-51.



- CDC (2006). Centers for Disease Control and Prevention. *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish-Three States, 2006. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 55 (31), pp: 1-2.
- Chatterjee, B.D., Mukherjee, A. y Sanyal, S.N. (1984). Enteroinvasiveness model of *Vibrio parahaemolyticus*. *Indian Journal of Medical Research*, 79, pp: 151-158.
- Chiou, C.S., Hsu, S.Y., Chiu, S.I., Wang, T.K. y Chao, C.S. (2000). *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of food-borne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (12), pp: 4621-4625.
- Cho, S.H., Shin, H.H., Choi, Y.H., Park, M.S. y Lee, B.K. (2008). Enteric bacteria isolated from acute diarrheal patients in the Republic of Korea between the year 2004 and 2006. *Journal of Microbiology*, 46 (1), pp: 325-330.
- CAC (1999). Codex Alimentarius Commission. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment. Codex Alimentarius Commission, Washington, D.C., E.U.
- Colwel, R.R. (1996). Global climate and infectious diseases: the cholera paradigm. *Science*, 274 (5295), pp: 2025-2031.
- Cook, D.W., O'Leary, P., Hunsucker, J.C., Sloan, E.M., Bowers, J.C., Blodgett, R.J. y DePaola, A. (2002). *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in US retail shell oysters: a national survey from June 1998 to July 1999. *Journal of Food Protection*, 65 (1), pp: 79-87.
- Dalsgaard, A., Huss, H.H., H-Kithikun, A. y Larsen, J.L. (1995). Prevalence of *Vibrio cholerae* and *Salmonella* in a major shrimp production area in Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 28, pp: 101-113.
- Daniels, N.A., MacKinnon, L., Bishop, R., Altekruise, S., Ray, B., Hammond, R.M., Thompson, S., Wilson, S., Bean, N.H., Griffin, P.M. y Slutsker, L. (2000a). *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *Journal of Infectious Diseases*, 181 (5), pp: 1661-1666.
- Daniels, N.A., Ray, B., Easton, A., Marano, N., Kahn, E., McShan, A.L., Del Rosario, L., Baldwin, T., Kingsley, M.A., Puhf, N.D., Wells, J.G. y Angulo, F.J. (2000b). Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters. *Journal of the American Medical Association*, 284 (12), pp: 1541-1545.
- Deepanjali, A., Kumar, H.S., Karunasagar, I. y Karunasagar, I. (2005). Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters along the southwest coast of India. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (7), pp: 3575-3580.
- DePaola, A., Cachicas, V., Cornelius, A., Croci, L., Espejo, R., Hervio-Heath, D., Karunasager, I., Hara-Kudo, Y., Liu, J., Madigan, T., Martinez-Urtaza, J., Rangdale, R., Suffredini, E. y Jones, J. (2009). Evaluation of international PCR method performance for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. En libro: *7th International Conference on Molluscan Shellfish Safety*. Conference handbook, 14-19 Junio, 2009; Nantes.
- DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J.C. y Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters following outbreaks in Washington, Texas and New York (1997, 1998). *Applied and Environmental Microbiology*, 66, pp: 4649-4654.
- DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C.A., Tenge, B.J., Nordstrom, J.L., Wells, J., Puhf, N. y Gendel, S.M. (2003). Molecular, serological and virulence characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp: 3999-4005.
- Drake, S.L., DePaola, A. y Jaykus, L.A. (2007). An overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6, pp: 120-144.
- Duan, J. y Su, Y.C. (2005). Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. *Journal of Food Science*, 70, pp: M58-M63.
- FAO/OMS (2005). Risk assessment of choleraogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 in warm-water shrimp in international trade. Interpretative summary and technical report. Microbiological Risk Assessment series N°. 9. ISSN 1726-5274.
- Farama, E., Lesne, J., Touron, A. y Wallet, F. (2008). Shellfish and non-cholera vibrios in coastal waters: characterization of human exposure. *Environment, Risques & Sante*, 7, pp: 191-201.
- Faruque, S.M., Albert, M.J., y Mekalanos, J.J. (1998). Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, pp: 1301-1314.

- FDA (1998). Food and Drug Administration. FDA and EPA Guidance Levels. Appendix 5. En libro: *Fish and Fishery Products, Hazards and Control Guides, 2nd edition*, Department of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration, Centre for Food Safety and Applied Nutrition, Office of Seafood, Washington DC, pp. 245-248.
- FDA (2005). Food and Drug Administration. Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Oysters. Disponible en: [http://www.cfsan.fda.gov/\\_dms/vpra-toc.html](http://www.cfsan.fda.gov/_dms/vpra-toc.html), [acceso 18-3-2010].
- FDA/CFSAN (2000). Quantitative risk assessment on the public health impact of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/ucm050421.htm> [acceso: 18-03-2010].
- Fouz, B., Roig, F.J. y Amaro, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of a new fish-virulent *Vibrio vulnificus* serovar that lacks potential to infect humans. *Microbiology*, 153 (6), pp: 1926-1934.
- Glass, R.I. y Black, R.E. (1992). The epidemiology of cholera. En libro: *Cholera*. Barua, D. y Greenough III, W.B., New York, Plenum Publishers Co., pp. 129-154.
- González-Escalona, N., Cachicas, V., Acevedo, C., Riaseco, M.L., Vergara, J.A., Cabello, F., Romero, J. y Espejo, R.T. (2005). *Vibrio parahaemolyticus* diarrhoea, Chile, 1998 and 2004. *Emerging Infectious Diseases*, 11, pp: 129-131.
- Gooch, J.A., DePaola, A., Bowers, J. y Marshall, D.L. (2002). Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*, 65, pp: 970-974.
- 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.
- Haldari, S., Chatterjee, S., Asakura, M., Viyakumaran, M. y Yamasak, S. (2007). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* (non O1 and O139) from moribund shrimp (*Penaeus monodon*) and experimental challenge study against post-larvae and juveniles. *Annals of Microbiology*, 57, pp: 55-60.
- Herrington, D.A., Hall, R.H., Losonsky, G., Mekalanos, J.J., Taylor, R.K. y Levine, M.M. (1988). Toxin, toxin-coregulate4d pili, and the toxR regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 168, pp: 1487-1492.
- Honda, S., Goto, I., Minematsu, I., Ikeda, N., Asano, N., Ishibashi, M., Kinoshita, Y., Nishibuchi, M., Honda, T. y Miwatani, T. (1987). Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. *Lancet*, I, pp: 331-332.
- Honda, T., Ni, Y. y Miwatani, T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolates of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection and Immunity*, 56, pp: 961-965.
- Hornstrup, M.K. y Gahrnhansen, B. (1993). Extraintestinal infections caused by *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in a Danish county, 1987-1992. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 25, pp: 735-740.
- ICMSF (1996). International Commission for Microbiological Specifications for Foods. *Vibrio cholerae*. En libro: *Microorganisms in Foods: 5. Characteristics of Microbial Pathogens*. London, Blackie Academic and Professional, pp. 414-425.
- Jiang, S., Chu, W. y Fu, W. (2003). Prevalence of cholera toxin (ctxA and zot) among non-O1/O139 *Vibrio cholerae* strains from Newport Bay, California. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12), pp: 7541-7544.
- Jones, M.K. y Oliver, J.D. (2009). *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infection and Immunity*, 77 (5), pp: 1723-1733.
- Kaper, J.B., Morris, J.G. y Levine, M.M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8, pp: 48-86.
- Kaysner, C.A. y DePaola, A. (2000). Outbreaks of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis from raw oyster consumption: assessing the risk of consumption and genetic methods for detection of pathogenic strains. *Journal of Shellfish Research*, 19, pp: 657.
- Kaysner, C.A. y DePaola, A. (2001). *Vibrio*. En libro: *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Downes, F.P. e Ito, K. Washington, DC. American Public Health Association. pp. 405-420.

- Klontz, K.C., Lieb, S., Schreiber, M., Janowski, H.T., Baldy, L.M. y Gunn, R.A. (1988). Syndromes of *Vibrio vulnificus* infections. Clinical and epidemiological features in Florida cases, 1981-1987. *Annals of Internal Medicine*, 109, pp: 318-323.
- Kolvin, J.L. y Roberts, D. (1982). Studies on the growth of *Vibrio cholerae* biotype El Tor and biotype Classical in foods. *Journal of Hygiene Cambridge*, 89, pp: 243-252.
- Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., Lanata, C., Sears, S., Honda, T., Young, C.R. y Finkelstein, R.A. (1984). Evaluation in humans of attenuated *Vibrio cholerae* El Tor Ogawa strain Texas Star-S.R as a live oral vaccine. *Infection and Immunity*, 43, pp: 515-522.
- Levine, M.M., Black, R.E., Clements, M.L., Nalin, D.R., Cisneros L. y Finkelstein, R.A. (1981). Volunteer studies in development of vaccines against cholera and enterotoxigenic *Escherichia coli*: a review. En libro: *Acute enteric infections in children. New prospects for treatment and prevention*. Holme, J. et al. Amsterdam (The Netherlands) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp: 443-459.
- Liu, X., Chen, Y., Wang, X. y Ji, R. (2004). Foodborne disease outbreaks in China from 1992 to 2001—national foodborne disease surveillance system. *Journal of Hygiene Research*, 33, pp: 725-727.
- Lozano-León, A., Torres, J., Osorio, C.R. y Martínez-Urtaza, J. (2003). Identification of thdh-positive *Vibrio parahaemolyticus* from and outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 226, pp: 281-284.
- Mahmud, Z.H., Beogi, S.B., Kassu, A., Mai Huong, B.T., Jahid, I.K., Islam, M.S. y Ota, F. (2008). Occurrence, seasonality and genetic diversity of *Vibrio vulnificus* in coastal seaweeds and water along the Kii Chanel, Japan. *FEMS Microbiology Ecology*, 64, pp: 209-218.
- Manfrin, A., Friso, S., Perin, R., Quattieri, K. y Bovo, G. (2001). Tropical fish importation from third countries: the potential risk of introducing human and aquatic animal pathogens. En libro: *Proceedings, Risk Analysis in Aquatic Animal Health*. Rodgers, C.J. Paris. Office Internationale de Epizooties, pp: 167-170.
- Martínez-Urtaza, J., Lozano-León, A., DePaola, A., Ishibashi, M., Shimada, K., Nishibuchi, M. y Liebana, E. (2004). Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American Pandemic isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (10), pp: 4672-4678.
- Martínez-Urtaza, J., Lozano-León, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y. y García-Martín, O. (2008). Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (1), pp: 265-274.
- Martínez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C. y Pousa, A. (2005). Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11, pp: 1319-1320.
- Miles, D.W., Ross, T., Olley, J. y McMeekin, T.A. (1997). Development and evaluation of a predictive model for the effect of temperature and aw on the growth rate of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 3 (2-3), pp: 133-142.
- Molenda, J.R., Johnson, W.G., Fishbein, M., Wentz, B., Mehlman, I.J. y Dadisman Jr., T.A. (1972). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: laboratory aspects. *Applied Microbiology*, 24, pp: 444-448.
- Molero, X., Bartolome, R.M., Vinuesa, T., Guarner, L., Accarino, A., Casellas, F. y Garcia, R. (1989). Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain. Presentation of 8 cases. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 92, pp: 1-4.
- Morris, J.G. (2003). Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell. *Clinical Infectious Diseases*, 37, pp: 272-280.
- Nascimento, D.R., Viera, R.H., Almeida, H.B., Patel, T.R. y Laria, S.T. (1998). Survival of *Vibrio cholerae* O1 strains in shrimp subjected to freezing and boiling. *Journal of Food Protection*, 61, pp: 1317-1320.
- Nishibuchi, M. y Kaper, J.B. (1995). Minireview. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*, 63, pp: 2093-2099.
- Okuda, J., Ishibashi, M., Hayakawa, E., Nishino, T., Takeda, Y., Mukhopadhyay, A.K., Grag, S., Bhattacharya, S.K., Nair, G.B. y Nishibuchi, M. (1997). Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India,

- and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travellers arriving in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, pp: 3150-3155.
- Oliver, J.D. y Kaper, J.B. (1997). *Vibrio species*. En libro: *Food microbiology- Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., y Montville, T.J. Washington D.C. ASM Press. pp: 228-264.
- 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 non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 132, pp: 47-53.
- PHLS (1996). Public Health Laboratory Service. Microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. PHLS Microbiol. Dig.k 13, pp: 41-43.
- Popovic, T., Fields, P.I., Olsvik, O., Wells, J.G., Evins, G.M., Caameron, D.N., Farmer III, J.J., Bopp, C.A., Wachsmuth, K., Sack, R.B., Albert, M.J., Nair, G.B., Shimada, T. y Feeley, J.C. (1995). Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992-1993. *The Journal of Infectious Diseases*, 171, pp: 122-127.
- 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.
- Robert-Pillot, A., Guénolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M. y Quilici, M.L. (2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology*, 91, pp: 319-325.
- Sanyal, S.C. y Sen, P.C. (1974). Human volunteer study on the pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus*. En libro: *International Symposium on Vibrio parahaemolyticus*. Fujimo, T., Sakaguchi, G., Sakazaki, R., y Takeda, Y. Tokyo, pp: 227-230.
- SCVMPH (2001). European Commission Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health. Opinion on *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* (in raw and undercooked seafood). Disponible en: [http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out45\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scv/out45_en.pdf) [acceso 18-3-2010].
- Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N., Kumagai, K., Takeda, Y. y Nishibuchi, M. (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunity*, 58, pp: 3568-3573.
- Stroud, G.D. (2001). Handling and Processing Oysters. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food/Torry Research Station. Torry Advisory Note. Nº. 84. Disponible en: <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5954e/x5954e00.htm> [acceso 18-3-2010].
- Swaminathan, T.R., Rathore, G., Sood, N., Abidi, R. y Likra, W.S. (2007). *Vibrio cholerae* non O1 and non O139 serogroup isolated from ornamental fish in India. *Indian Veterinary Journal*, 84, pp: 1023-1025.
- Vausdevan, P., Marek, P., Daigle, S., Hoagland, T. y Venkitanarayanan, K.S. (2002). Effect of chilling and freezing on survival of *Vibrio parahaemolyticus* on fish fillets. *Journal of Food Safety*, 22, pp: 209-217.
- Vuddhakul, V., Chowdhury, A., Laohaprerthisan, V., Pungrasamee, P., Patararungrong, N., Thianmontri, P., Ishibashi, M., Matsumoto, C. y Nishibuchi, M. (2000). Isolation of a pandemic O3:K6 clone of a *Vibrio parahaemolyticus* strain from environmental and clinical sources in Thailand. *Applied Environmental Microbiology*, 66, pp: 2685-2689.
- Watnick, P.I., Fullner, K.K. y Kolter, R. (1999). A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *Journal Bacteriology*, 181, pp: 3606-3609.
- Wong, H.C., Liu, S.H., Ku, L.W., Lee, I.Y., Wang, T.K., Lee, Y.S., Lee, C.L., Kuo, L.P. y Shin, D.Y.C. (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 63, pp: 900-906.
- Yang, Z., Jiao, X., Li, P., Pan, Z., Huang, J., Gu, R., Fang, W. y Chao, G. (2009). Predictive model of *Vibrio parahaemolyticus* growth and survival on salmon meat as a function of temperature. *Food Microbiology*, 26, pp: 606-614.
- Yoon, K.S., Min, K.J., Jung, Y.J., Kwon, K.Y., Lee, J.K. y Oh, S.W. (2008). A model of the effect of temperature on the growth of pathogenic and nonpathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from oysters in Korea. *Food Microbiology*, 25, pp: 635-641.
- Zubia, P. (2008). Nuevas tecnologías aplicadas a la trazabilidad de productos a temperatura controlada. Disponible en <http://conferencias.logitransonline.com/web/pages/ponencias/lunes/itene/Pablo%20Zubia%20-%20ITENE.ppt> [acceso: 18-3-2010].