



UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL  
EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO  
DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

**PRESENTA  
DIANA BERENICE MEDINA GARCIA**

**ASESORES  
Q.B.P.MARTINA GUADALUPE BOLAÑOS MONROY  
Q.F.B. MA. CARMEN SERNA ESCUTIA**

**MORELIA. MICHOACÁN**

**OCTUBRE 2012**

AGRADECIMIENTOS:

Q.B.P.MARTINA GUADALUPE BOLAÑOS MONROY

Q.F.B. MA. CARMEN SERNA ESCUTIA

A MIS SINODALES

FACULTAD DE QUIMICO FARMACOBIOLOGIA

QUIMICAS HOSPITAL INFANTIL

A DIOS

A MIS PADRES POR EL AMOR, ESFUERZO Y CONFIANZA QUE SEMBRARON EN MI

A MIS HERMANOS

A MIS AMIGAS

A HEBER SAID

ÍNDICE	
I.INTRODUCCIÓN.....	4
ANTECEDENTES.....	4
II. CLASIFICACIÓN.....	7
CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	7
CLASIFICACIÓN CLÍNICA.....	8
CLASIFICACIÓN BIOQUÍMICA.....	9
III. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	12
ASPECTOS GENERALES.....	12
TIPIFICACIÓN.....	13
HÁBITAT NATURAL.....	18
TRANSMISIÓN.....	19
CUADRO CLÍNICO.....	20
TRATAMIENTO.....	21
EPIDEMIOLOGÍA.....	22
PREVENCIÓN.....	27
RECOMENDACIONES.....	27
IV. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.....	28
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	28
<i>Vibrio cholerae</i> .....	32
V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
VI. JUSTIFICACIÓN.....	36
VII. OBJETIVOS.....	38
VIII. METODOLOGÍA.....	39
IX. RESULTADOS.....	41
X. DISCUSIÓN.....	57
XI. CONCLUSIÓN.....	61
XII. GLOSARIO.....	62
XIII. ABREVIATURAS.....	65
XIV. ÁPENDICE.....	66
XV. REFERENCIAS.....	79

## **I.INTRODUCCIÓN**

### **ANTECEDENTES**

El análisis de la naturaleza y evolución de las pandemias, en general y, relativas al género *Vibrio*, en particular nos brinda la posibilidad de comprender las causas y mecanismos por los cuales los microorganismos causantes se diseminan mundialmente tales como factores ambientales y de saneamiento; incluyendo la participación de los alimentos en su extensión mundial.

Al género *Vibrio* pertenece uno de los patógenos intestinales más importantes para el hombre: *Vibrio cholerae* responsable de epidemias y pandemias de enfermedades diarreicas de riesgo mortal. <sup>(87)</sup>

Otro patógeno intestinal del mismo género, con características de pandemia, es el *Vibrio parahaemolyticus*, el cual ha sido aislado de agua de mar, organismos marinos y de las heces de los enfermos con enteritis agudas. Las infecciones causadas por el citado miembro del género *Vibrio* se han incrementado mundialmente en los últimos 10 años<sup>(87,7)</sup>; Causante de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) que son especialmente importantes por sus altas tasas de morbilidad y también aunque en menor proporción mortalidad entre los grupos más vulnerables de la población, y además representan una proporción muy alta del costo de la atención médica y de las hospitalizaciones.<sup>(102)</sup> Por ello los problemas de inocuidad de los alimentos son considerados en la actualidad como un problema de salud pública.<sup>(20, 93,102)</sup>

La dosis infectante y el límite permisible en alimentos de *Vibrio parahaemolyticus* es aun discutida, aunque las cepas Hemolisina directa termoestable (TDH) son las que con mayor frecuencia se encuentran asociadas a brotes de intoxicación alimentaria. Aunque la capacidad de los vibrios para producir infección en individuos sanos se considera dependiente del inóculo y de los factores de virulencia de la cepa involucrada.<sup>(48)</sup>

El Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-242-SSA1-2005, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba, establece un límite de  $10^4$  Número Más Probable (NMP) en 100g de muestra de *Vibrio parahaemolyticus* para moluscos bivalvos y crustáceos.<sup>(63,104)</sup>

A finales de 2007 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) reportó dos presuntos casos de intoxicación alimentaria por *Vibrio parahaemolyticus* asociados al consumo de moluscos bivalvos provenientes de México. En el periodo 2007 a 2010 la FDA había comunicado

menos de una decena de casos atribuidos a moluscos bivalvos de origen mexicano, tratándose de eventos esporádicos y aislados, donde no se demostró asociación epidemiológica de dos o más casos relacionados entre sí, para ser considerado un brote de Enfermedad Transmitida por Alimentos (ETA).<sup>(20)</sup>

A mediados del 2008 la FDA comunicó al Programa Mexicano de Sanidad de Moluscos Bivalvos (PMSMB) conformado principalmente por Baja California, Baja California Sur y Sonora donde se encuentran la mayoría de las áreas de cosecha clasificadas por el PMSMB, cuya producción se destina al mercado nacional y de exportación, comunicó que se habían producido cambios en la guía técnica del Programa Nacional de Sanidad de Moluscos Bivalvos de los EE.UU., donde se establecía como obligatorio que todos los Estados miembros de este programa, incluyendo los países extranjeros que exportan al mercado estadounidense, desarrollen una evaluación de riesgo y en su caso, un plan de control de *Vibrio parahaemolyticus*.<sup>(20)</sup>

Dados estos antecedentes y las características de acumulación de contaminantes que presentan los moluscos bivalvos, así como al hecho de que se consumen crudos o poco cocidos, la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) realizó una evaluación de riesgo de *Vibrio parahaemolyticus* en estos productos, con el propósito de determinar la aplicación de medidas de control para disminuir el riesgo de presentación de esta enfermedad.<sup>(20)</sup>

Entre las acciones a realizar fue procesamiento de las muestras de producto para determinar *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico como NM P, en los laboratorios que se encuentren dentro de la Red Nacional de Laboratorios coordinada por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC).<sup>(20)</sup>

Las enfermedades infecciosas agudas son un importante problema de salud pública a nivel mundial. Son responsables de una cuarta parte de las muertes que se producen en el mundo. La mayor parte de estas muertes ocurren en los países subdesarrollados, sobretodo en las áreas con mayor grado de exclusión social, deterioro ambiental, pobreza, la malnutrición, la falta de medicamentos y vacunas, y la inadecuada infraestructura sanitaria contribuyen a su rápida propagación.<sup>(34)</sup>

La distribución de estas enfermedades en el mundo está variando continuamente, debido a cambios que se producen en el patógeno, en el ambiente y en la población huésped. El incremento de la resistencia a los antimicrobianos, el sobrecalentamiento del planeta, la globalización de los mercados y las migraciones de población son los principales factores que intervienen en el desarrollo y proliferación de este grupo de enfermedades.<sup>(104)</sup>

Distintas especies marinas pueden acumular diversas especies de bacterias como Vibrios en su tracto intestinal, branquias y exoesqueleto.<sup>(56)</sup> Es el caso de los Vibrios, uno de los géneros que conforman esta micro biota de los ecosistemas acuáticos, y en los que a menudo se encuentran asociados como comensal a diversos organismos acuáticos, como crustáceos, algas, fitoplancton, copépodos y raíces de plantas acuáticas.<sup>(34)</sup>

Ocupando una gran variedad de nichos, *Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria común en los estuarios y entornos marinos. Se descubre en 1953, al ocasionar una intoxicación alimentaria que causaría muertes. Se ha reconocido que *Vibrio parahaemolyticus* es una de las principales causas de gastroenteritis transmitida por pescados y mariscos en el Japón y en otros países asiáticos.<sup>(73,103)</sup> En cambio, en la mayoría de los países fuera de Asia, la incidencia notificada parece ser reducida, lo que tal vez refleje una forma diferente de consumir los pescados y mariscos. La gastroenteritis causada por este organismo se asocia casi exclusivamente a pescados y a mariscos consumidos crudos o insuficientemente cocidos, o contaminados después de la cocción.<sup>(71)</sup>

Este microorganismo es reconocido como una causa importante, en todo el mundo de gastroenteritis, especialmente en las zonas donde el consumo de mariscos es alto como el Sureste Asiático.<sup>(57)</sup> Por ello es considerado patógeno emergente en el norte y centro de América Latina.<sup>(71)</sup>

## II. CLASIFICACIÓN

### CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

En 1854, el médico italiano Filippo Pacini descubrió la primera especie de *Vibrio*, el *Vibrio cholerae* (agente causante del cólera), mientras estudiaba los brotes de esta enfermedad en Florencia. En 1884 el científico alemán Robert Koch aisló la bacteria causante del cólera cuando trabajaba con enfermos coléricos en Egipto. La bacteria presentaba una morfología bacilar curvada, por lo que la denominó *Vibrio comma*.<sup>(56,102)</sup>

En 1965, Veron se propuso crear la familia *Vibrionaceae* considerando agrupar aquellos géneros cuyas especies fueran oxidasas positivas y móviles por un flagelo polar.<sup>(63)</sup>

*Vibrio parahaemolyticus* fue identificado por primera vez como agente de gastroenteritis por Fujino en 1951, quienes originalmente lo clasificaron al organismo en el género *Pasteurella*. Sin embargo, la denominación actual fue establecida por Sakazaki en 1963.<sup>(63)</sup> En el 2008, la familia *Vibrionaceae* se encuentra en la sub-sección V del Manual de Bergey's de Bacteriología sistemática en el grupo de bacterias Gram-negativas facultativamente anaerobias correspondiente a la orden Vibrionales.

- DOMINIO: *Bacteria*
- PHYLUM: *Proteobacteria*
- SECCION: *Gammaproteobacteria*
- CLASE: *Zymobacteria*
- ORDEN: *Vibrionales*
- FAMILIA: *Vibrionaceae*
- GENERO: *Vibrio*
- ESPECIE:
  - Vibrio parahaemolyticus*
  - Vibrio cholerae*
  - Vibrio vulnificus*
  - Vibrio fluviales*
  - Vibrio alginolyticus*
  - Vibrio damsela*
  - Vibrio furnissi*
  - Vibrio hollisae*
  - Vibrio mimicus*
  - Vibrio metschnikovii*
  - Vibrio cincinnatiensis*

Estos son actualmente patógenos tanto para vertebrados como para invertebrados.

Dicha familia se encuentra constituida por bacilos, rectos curvos, móviles por medio de flagelos laterales adicionales. No forman endosporas ni microsporas, y son quimioorganotróficos capaces de metabolismos respiratorio y fermentativo. No desnitrifican y la mayoría de las especies son positivas a la prueba de oxidasa. Todas utilizan D-glucosa como única fuente de carbono y energía; mientras que, la mayoría utiliza sales de amonio como únicas fuentes de nitrógeno; unas cuantas tienen requerimientos de factores orgánicos de crecimiento relativamente simples, las principales características bioquímicas se observan en las tablas 2, 3, 4 y 5. La mayoría requiere 2-3% de NaCl. Dentro de los seis géneros considerados como parte de la familia *Vibrionaceae*, encontramos varias especies patógenas para el hombre, así como para otros vertebrados e invertebrados. Éstas son: *Allomonas*, *Enhydrobacter*, *Listonella*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* y *Vibrio*.<sup>(45,63,90)</sup>

### **CLASIFICACIÓN CLÍNICA**

El género *Vibrio*, de la familia *Vibrionaceae*, posee más de 48 especies, y su taxonomía está en constante revisión gracias a la incorporación de técnicas de biología molecular. Al menos 12 de ellas son patógenas para el hombre y varias son también patógenas para animales tanto vertebrados como invertebrados.<sup>(47)</sup> El género *Vibrio* está compuesto por microorganismos cuyo hábitat natural son los ecosistemas marinos y fluviales.<sup>(44)</sup>

Las especies que se asocian a diarrea son el *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio fluviales* y *Vibrio furnissii*. Por su parte, el *Vibrio vulnificus* causa septicemia e infección de heridas en pacientes inmunodeprimidos.

El *Vibrio parahaemolyticus* también se han asociado a infección de heridas como se observa en la tabla 1, pero principalmente presente en casos reportados de gastroenteritis.<sup>(56)</sup>

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

TABLA 1. ASOCIACIÓN DE *Vibrio spp.* PATÓGENOS CON SINDROMES CLÍNICOS

Especies	Gastroenteritis	Infección de herida	Infección de oído	Septicemia primaria	Septicemia secundaria
<i>Vibrio cholerae</i> 01	+++	+			
<i>Vibrio cholerae</i> NO 01	+++	++	+	+	+
<i>Vibrio mimicus</i>	++		+		
<i>Vibrio fluvialis</i>	++				
<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>	<b>+++</b>	<b>+</b>	<b>+</b>		<b>+</b>
<i>Vibrio alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>Vibrio cincinnatiensis</i>			+		
<i>Vibrio hollisae</i>	++			+	
<i>Vibrio vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>Vibrio furnissii</i>	(+)				
<i>Vibrio damsela</i>		++			
<i>Vibrio metschnikovii</i>	(+)			(+)	
<i>Vibrio carchariae</i>		+			

<sup>a</sup>+++ = reportados frecuentemente, ++ = menos frecuente (6-100 reportados);

+ = raro (1-5) reportados, y (+) = asociación no es clara.

<sup>b</sup> Tabla tomada de A. T. Pavia et. Al. (BAM, 2001)

**CLASIFICACIÓN BIOQUÍMICA**

TABLA 2. PROPIEDADES DEL GENERO VIBRIO Y DIFERENCIACIÓN DE OTROS GÉNEROS FENOTÍPICAMENTE SIMILARES.

Reacción o propiedad de:	<i>Vibrio</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>
PRUEBA				
Oxidasa	+	+	+	-
Requerimiento Na <sup>+</sup>	+	-	-	-
Fermenta Manitol	+	+	-	+
Crece en TCBS	+	+	-	-

FUENTE: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* 2008. Instituto de Salud Pública, Chile.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

TABLA 3. PRUEBAS CLAVES DIFERENCIALES ENTRE LOS GRUPOS 1,5 y 6.

Prueba	Grupo 1		Grupo 5		Grupo 6			
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio damsela</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
Crece en caldo con:								
Sin NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina Moeller 1% NaCl	0	0	95	93	0	0	0	0
Lisina Moeller 1% NaCl	99	100	50	0	99	100	99	100
Ornitina Moeller 1% NaCl	99	99	0	0	50	95	55	0

FUENTE: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* 2008. Instituto de Salud Pública, Chile.

TABLA 4. BI QUÍMICA DIFERENCIAL PARA SEPARAR ESPECIES ENTRE GRUPOS 1, 5 y 6.

% de Positividad para <sup>a</sup>								
Prueba	Grupo 1		Grupo 5		Grupo 6			
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio damsela</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
Voges-proskauer 1%	75	9	95	0	95	0	0	50
Movilidad	99	98	25	80	99	99	99	0
Acido de:								
Sacarosa	100	0	5	100	99	1	15	50
D-manitol	99	99	0	97	100	100	45	50
Celobiosa	8	0	0	30	3	5	99	50
Salicina	1	0	0	0	4	1	95	0

<sup>a</sup> El número indica el porcentaje de cepas que son positivas después de 48 hrs. De incubación a 36° C.

FUENTE: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* 2008. Instituto de Salud Pública, Chile

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

TABLA 5. PRUEBAS BIOQUIMICAS GRUPOS 1, 5 Y 6.

% de Positividad para <sup>a</sup>								
Prueba	Grupo 1		Grupo 5		Grupo 6			
	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio damsela</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Vibrio harveyi</i>
Indol (Caldo infuso-corazón, 1% NaCl)	99	98	0	13	85	98	97	100
Citrato Simmons	97	99	0	93	1	3	75	0
Urea	0	1	0	0	0	15	1	0
Acido de Glucosa	100	100	100	100	100	100	100	50
Gas de Glucosa	0	0	0	0	0	0	0	0
ONPG	94	90	0	0	0	5	75	0
Producción ácido de:								
L-Arabinosa	0	1	0	1	1	80	0	0
Lactosa	7	21	0	0	0	1	85	0
Sacarosa	100	0	5	99	99	1	15	50
Crecimiento en caldo con:								
NaCl 0%	100	100	0	0	0	0	0	0
NaCl 6%	53	49	95	100	100	99	65	100
NaCl 8%	1	2	0	94	94	80	0	2
NaCl 10%	0	0	0	69	69	2	0	2

<sup>a</sup> El número indica el porcentaje de cepas que son positivas después de 48 hrs. De incubación a 36° C.

FUENTE: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus* 2008. Instituto de Salud Pública, Chile.

### III. CARACTERISTICAS GENERALES DE *Vibrio parahaemolyticus*

#### ASPECTOS GENERALES

*Vibrio parahaemolyticus* (“que descompone la sangre”) es una especie del género *Vibrio* es un bacilo marino halofílico, recto o ligeramente curvo, móvil, con un tamaño de 1.4 – 2.6  $\mu\text{m}$  de longitud por 0.5 – 0.8  $\mu\text{m}$  de diámetro, Gram negativo, crece a temperatura entre 10°C – 44°C con una óptima de crecimiento de 35°C – 37°C, en cuanto al pH varía de 5 a 11 con intervalo óptimo de 7.5 a 8.6 y un tiempo de generación estimado en 10 a 12 minutos. Microorganismo anaerobio facultativo, con metabolismo oxidativo y fermentativo, produce catalasa que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo.<sup>(17,112)</sup>

FIGURA 1. *Vibrio parahaemolyticus*



FUENTE: Zamora Pantoja Diana Ruth. Quiróz Santiago Carolina. UN ENEMIGO MARINO SILENCIOSO VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS. Revista Digital Universitaria 10 de abril 2005 • Volumen 6 Número 4 • ISSN: 1067-6079.<http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/art33.htm>

Bacteria con flagelo monotrico, no esporulado y no capsulado.<sup>(41)</sup> Fermenta la glucosa sin producción de gas, fermenta manitol, arabinosa y manosa, pero no fermenta sacarosa, lactosa, inositol, ureasa variable y su contenido de G + C, varía del 44% al 49% (Contenido de las bases guanina y citosina en el material genético de la bacteria).<sup>(35)</sup> Se ha comprobado que las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* productoras de ureasa, poseen el gen *trh* ligado a la producción de hemolisina relacionada con la hemolisina directa termoestable (TDH), importantes variantes en su mecanismo de patogenicidad, por lo que se ha sugerido que esta característica bioquímica puede ser un marcador de virulencia en esta especie. En este sentido, recientes investigaciones epidemiológicas han documentado que el biotipo ureasa positiva- Fenómeno Kanagawa negativo, es el responsable de la mayor parte de gastroenteritis en la zona Noroeste del Pacífico.<sup>(101)</sup>

La hemolisina termoestable de Kanagawa o hemolisina directa termoestable (TDH) es producida por más del 90% de las cepas patógenas para el hombre. Sin embargo, la mayoría de las cepas ambientales carecen de ella. Su

detección se efectúa en el medio de agar Wagatsuma con 5% de eritrocitos humanos o de conejo.<sup>(49,101)</sup>

Una particularidad de todas las especies de este género es su dependencia del ion sodio. Este catión estimula su crecimiento y favorece la rapidez del mismo. El requerimiento de sodio es específico e independiente de una función osmótica, dado que es difícilmente reemplazado por cantidades equimoleculares de otros cationes monovalentes. El Na<sup>+</sup> actúa sobre los sistemas de permeasas existentes en la bacteria permitiendo la entrada de sustratos exógenos. No obstante, se puede sustituir NaCl por KCl dentro de ciertos límites. Crece en un intervalo de NaCl de 3, 6 y 8%.<sup>(49, 29,106, 113)</sup>

## TIPIFICACIÓN

Existen diversos métodos de tipificación para *Vibrio parahaemolyticus*, tanto fenotípicos como moleculares. Dentro de los primeros destaca la serotipificación de lipopolisacáridos somáticos (O) y polisacáridos capsulares (K). El esquema antigénico de tipificación fue diseñado inicialmente por Sakazaki en Japón en 1963 (TABLA 6), y complementado posteriormente por otros investigadores.<sup>(33)</sup> Actualmente existen kits comerciales que reconocen 13 grupos O y 71 tipos K. En relación a los métodos moleculares, existe una gran variedad, destacando la determinación de genes *tdh* y *trh* por PCR, de gran utilidad para diferenciar cepas patógenas de las no patógenas, ya que ambos genes representan los mayores factores de virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*.<sup>(58,69,91)</sup>

Para la determinación de genotipos se puede realizar electroforesis de campo pulsado (PFGE), ribotipificación y diversas técnicas basadas en amplificación como RPC con partidores arbitrarios (AP-PCR), amplificación de elementos Palindrómicos extragénicos repetitivos (REPPCR), amplificación de secuencias intergénicas de consenso repetitivas (ERIC-PCR), etc. La PFGE representa la técnica de tipificación genética de elección por su poder discriminatorio, estandarización y capacidad de almacenamiento de los distintos patrones genéticos en bases de datos.<sup>(5)</sup>

TABLA 6. ESQUEMA ANTIGENICO O LIPOPOLISACARIDO, K CAPSULA.

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

FUENTE: El esquema antigénico fue propuesto por Sakazakiet *al.* 1963, Hugh, R., and J. C. Feeley. 1972, (Elliot. E. L., FDA U.S.A., 1998.)

De un total de 71 combinaciones de serogrupos O:K, hoy en día reconocidas para *Vibrio parahaemolyticus*, 28.2% han adquirido el potencial pandémico, la tipificación por secuencia de multilocus ha proporcionado un fuerte soporte molecular para establecer el origen clonal del *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandémico, y las cepas pandémicas, independientemente del serotipo, son clonales, con la base de un perfil alélico idéntico y evidenciando que el solo serotipo no puede definir adecuadamente una cepa pandémica.<sup>(23,27)</sup>

#### DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Vibrio parahaemolyticus* POR PCR DE MUESTRAS CLÍNICAS

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de los ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse las polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

La técnica de PCR amplifica un fragmento de ADN, en forma exponencial, utilizando una enzima ADN polimerasa termoestable durante ciclos sucesivos. El segmento de ácidos nucleicos amplificado es específico ya que sus extremos son reconocidos por oligonucleótidos sintéticos diseñados especialmente que se unen a secuencias complementarias en el extremo 5' de cada hebra de ADN a amplificar. Se utiliza como molde una muestra de ADN o ARN, que puede estar presente en un bajo número de copias.

A partir de la PCR se puede obtener distintos tipos de información, que básicamente se puede resumir en: 1) presencia o ausencia de las secuencias complementarias a los oligonucleótidos, y 2) distancia a la que se encuentran los cebadores o “primers” en el ADN templado.<sup>(97)</sup>

De los aislamientos clínicos confirmados de *Vibrio parahaemolyticus* se amplifican los genes que codifican los factores de virulencia, TDH (hemolisina termoestable directa), TRH (termolisina relacionada a TDH) y la detección de cepas pandémicas mediante PCR de grupo-específico, del gen *toxRSy* del marco de lectura abierto *orf8*.

Las distintas secuencias de los primers o partidores y programas de PCR utilizados para la detección de los genes blanco son mostradas a continuación:

TDH-F 5'-GGTACTAAATGGCTGACATC-3'  
TDH-R 5'-CCACTACCACTCTCATATGC-3'

94° x 5 min, 30 ciclos 94° x 1 min, 48° x 1 min, 72° x 1 min; 72° x 5 min

TRH-F 5'-GGCTCAAATGGTTAAGCG-3'  
TRH-R 5'-CATTTCCGCTCTCATATGC-3'

94° x 5 min, 30 ciclos 94° x 1 min, 48° x 1 min, 72° x 1 min; 72° x 5 min

toxRS 1 5'-TATCTCCCATGCGCAAACGTA-3'  
toxRS 2 5'-ACAGTACCGTAGAACCGTGAT-3'

95° x 5 min, 30 ciclos 95° x 1 min, 55° x 1 min, 72° x 1 min; 72° x 7 min

ORF8A 5'-GTTTCGCATACAGTTGAGG-3'  
ORF8B 5'-AAGTACAGCAGGAGTGAG-3'

94° x 5 min, 30 ciclos 94° x 30 seg, 60° x 30 seg, 72° x 30 seg; 72° x 5 min

GS-VP 1 5'-TAATGAGGTAGAAACA-3'  
GS-VP 2 5'-ACGTAACGGGCCTACA-3'

95° x 5 min, 30 ciclos 94° x 1 min, 50° x 2 min, 72° x 3 min; 72° x 7 min

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio parahaemolyticus* EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

Los aislamientos de origen clínicos de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* presentan factores relacionados con la virulencia en un 99% de las cepas. Los aislados de origen ambientales sólo los presentan en un 1% o menos. La identificación molecular de estas toxinas mediante PCR, es importante para caracterizar las cepas clínicas y evaluar su rol patogénico. Los estudios genéticos se basan en identificación de especie (*tl*) y de factores de virulencia presentes en islas de patogenicidad (*TDH*, *TRH*) y la identificación del clon pandémico (*orf8*).

AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS BLANCO DE *Vibrio parahaemolyticus*

Amplificar primero el gen *tl* que confirma especie. Luego verificar si la cepa es o no toxigénica con los partidores que identifican los genes *tdh* y *trh*. Si se ha descrito en el país la presencia del clon asiático pandémico identificar la presencia del fragmento de *orf8*.<sup>(15,75)</sup>

Realizar los ciclos de amplificación considerando la temperatura de fusión de los partidores:

TABLA 7. CICLOS DE AMPLIFICACIÓN.

Gen	Proteína codificada	Ubicación	Secuencia	Tamaño amplificado Pares de base (pb)	Ciclo de amplificación
<i>tlh</i>	Hemolisina termoestable		F 5'aaa gcg gat tat gca gaa gca ctg 3' R 5'gct act ttc tag cat ttt ctc tgc 3'	450	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 60°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido.
<i>tdh</i>	Hemolisina termoestable directa		F5'GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC-3 R5'GGAATAGAACCTTCATCTTCACC-3	270	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 58°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido
<i>trh</i>	Hemolisina termoestable relacionada		F5 TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT-3 R 5-CATAACAAACATATGCCCATTTCCG-3	500	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 60°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido
<i>Orf8</i>	Marco de lectura abierto 8		F 5'AGGACGCAGTTACGCTTGATG-3 R 5'CTAACGCATTGTCCCTTTGTAG-3	369	94°C 3 min 25 ciclos= 94°C 1min 60°C 1 min 72°C 2 min 72°C 3min 8°C indefinido

FUENTE: SILVA SAN CRISTÓBAL WALLY, Et al. Aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Manual de procedimientos. Departamento Laboratorios Biomédicos. Ministerio de Salud- Instituto de Salud Pública. Chile 2008.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

---

INFORME:

TL: Positiva. Confirma especie *Vibrio parahaemolyticus*.

tdh: Positiva: Presencia de Vp toxigénico

trh: Positiva: Presencia de Vp toxigénico

Orf8 : Positiva: Presencia de cepa asiática pandémica.

## **HABITAT NATURAL**

Es una bacteria halófila, que al igual que otros vibrios marinos, es una de las especies que compone la micro biota en estuarios y del agua del mar y de algunos organismos que en ella viven. El numero de *Vibrio parahaemolyticus* en agua de mar estaría asociado, al igual que el *Vibrio cholerae* a la concentración de zooplanton, especialmente a copépodos y a la temperatura. Esto indicaría que las concentraciones de *Vibrio parahaemolyticus* en el agua de mar puede variar con aquellos factores que produzcan variaciones del zooplanton, incluyendo, temperatura, luminosidad, corrientes marinas, concentración de nutrientes, y concentración de fitoplanton, entre muchos otros. El *Vibrio parahaemolyticus*, por estar en suspensión en el agua de mar se concentra en moluscos filtradores bivalvos que en nuestro país son una importante parte de la dieta diaria de la población, incluyendo ostiones, almejas y camarón, en cuyas carnes puede alcanzar grandes concentraciones.<sup>(48)</sup>

La infección humana se adquiere por la ingesta de estos productos del mar, ya sea crudos o parcialmente cocidos, conteniendo concentraciones infecciosas de la bacteria, que algunos estudios han caracterizado como de  $1 \times 10^4$  bacterias por gramo de marisco. Factores importantes en la concentración de *Vibrio parahaemolyticus*, en las carnes de bivalvos ingerida son la concentración inicial de la bacteria, la temperatura de almacenamiento y de transporte y la temperatura de cocción. Esta bacteria tiene un tiempo de generación a la temperatura de 37° de 8 a 9 minutos de tal modo que puede alcanzar concentraciones altas en poco tiempo, ya que la bacteria puede crecer después de la recolección de los mariscos si la temperatura es la adecuada para este crecimiento.<sup>(48)</sup>

Se pensaba que el *Vibrio parahaemolyticus* se limitaba a los climas tropicales, los estudios recientes informaron de la recuperación de O3:K6 del agua en el sur de Chile y Alaska, que hasta ahora eran considerados como demasiado frío para apoyar el crecimiento de este organismo. Estos descubrimientos recientes sugieren un cambio en el organismo en su capacidad de adaptarse y sobrevivir en ambientes más fríos. De hecho, la capacidad de *Vibrio parahaemolyticus* para sobrevivir y proliferar en sus nichos ambientales, en mariscos y en el intestino humano pudo haber resultado de la adquisición de las regiones de codificación, rasgos nuevos que son diferencialmente regulada en diferentes nichos. Además, la propagación del organismo es otra indicación del calentamiento global, que es probable que desempeñe un papel en *Vibrio parahaemolyticus* para aumentar la distribución y ocurrencia.<sup>(64)</sup>

Se ha visto que almacenar congelado el alimento, además de detener el crecimiento del Vibrio, disminuye su número, no obstante se ha descrito que el *Vibrio parahaemolyticus* sobrevive congelado a -18°C durante 7 semanas.<sup>(56, 64)</sup>

## TRANSMISIÓN

*Vibrio parahaemolyticus* es un patógeno de hábitat marino, por lo que los alimentos de esta procedencia deben ser analizados, ya que suelen ser los principales transmisores del microorganismo al ser humano. *Vibrio parahaemolyticus* puede estar presente en alimentos marinos, como los pescados y mariscos (Fig.2), que tienen un importante papel en la transmisión de este agente etiológico cuando se consumen crudos o insuficientemente cocinados.

FIGURA 2. OSTIONES, CAMARONES Y PESCADO, ALIMENTOS INVOLUCRADOS EN LA TRANSMISIÓN DE *Vibrio parahaemolyticus*.



Los mariscos, especialmente los moluscos bivalvos, como ostiones y almejas acumulan cantidades importantes del microorganismo debido al mecanismo de alimentación por medio de filtración que llevan cabo. En general, crustáceos y pescados no acumulan a *Vibrio parahaemolyticus* en cantidad importante para causar infección, pero pueden alcanzar grandes cantidades de éste al dejarse sin adecuada refrigeración por unas pocas horas. La enfermedad se transmite por ingestión de cualquier alimento contaminado crudo o mal cocido. También se puede transmitir por contaminación cruzada, al ingerir cualquier alimento que haya tenido contacto con mariscos o agua contaminada. <sup>(46,64)</sup>

## CUADRO CLÍNICO

Este microorganismo causa gastroenteritis y los síntomas que se presentan son dolor abdominal severo, náusea, vómito, fiebre, dolor de cabeza y diarrea, la cual persiste hasta ocho días, en casos severos la diarrea es acuosa con moco y sangre, y pueden presentarse cuadros de deshidratación, hipotensión y acidosis, como se observa en la tabla 8. El periodo de incubación es de 12-24 horas.<sup>(59)</sup>

En un estudio realizado entre Enero y Febrero del 2005 en Chile, se reunieron los datos de las manifestaciones clínicas de personas diagnosticadas, los cuales también tenían deshidratación, pero sin llegar a la hipotensión ni shock (Tabla 8).<sup>(98,111)</sup>

TABLA 8. PRINCIPALES MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE *Vibrio parahaemolyticus*.

SÍNTOMAS	PORCENTAJE DE FRECUENCIA
Dolor abdominal	90%
Náuseas y vómitos	89%
Diarrea sin sangre	80%
Fiebre	77%
Deshidratación	38%
Hormigueo	16%
Calambres	16%
Diarrea con sangre	6%
Cefalea	4%

FUENTE: Elaborado por Departamento de Epidemiología, Ministerio de Salud de Chile SEREMI X Región (n = 502 acumulados al día 12 de febrero 2005).

Se han reportado casos de infecciones extra intestinales en el ojo, oído, tracto urinario y en heridas superficiales, además de procesos de septicemia asociado a enfermedades preexistentes como alcoholismo, enfermedad renal, vascular y diabetes. La septicemia es causada por la entrada del microorganismo al torrente sanguíneo a través de la vena porta o del sistema linfático intestinal, los síntomas incluyen fiebre, hipotensión, escalofríos y

ocasionalmente náusea, vómitos, diarrea y dolor abdominal. Las infecciones de heridas pueden ocurrir cuando existen lesiones de piel, quemaduras o cortes preexistentes que entran en contacto con el agua de mar o con las especies marinas contaminadas. El cuadro se caracteriza por una lesión en la piel que se desarrolla dentro de las primeras 24 horas posteriores al contacto con el material contaminado. El sitio de la infección se presenta inicialmente con eritema, extremadamente edematoso, luego progresa rápidamente a una lesión con vesículas y finalmente necrosis que involucra la piel y la grasa subcutánea. Estas infecciones pueden ocurrir tanto en personas sanas como aquellos con enfermedades preexistentes. <sup>(11, 60, 64)</sup>

## TRATAMIENTO

En relación a su susceptibilidad antimicrobiana, no hay estándares de interpretación para *Vibrio parahaemolyticus* (guías NCCLS-CLSI 2005). Usando los estándares de interpretación para *Vibrio cholerae* y *Enterobacteriaceae*, *Vibrio parahaemolyticus* es sensible a tetraciclina, doxiciclina, furazolidona, cloranfenicol, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y quinolonas. La resistencia a colistin y ampicilina (esta segunda mediada por beta lactamasas), es variable. <sup>(47)</sup>

El manejo básico consiste en tratamiento sintomático y rehidratación, es decir, corregir los trastornos hidroelectrolíticos y ácido-base. Los antimicrobianos están indicados muy pocas ocasiones: persistencia de diarrea por más de cinco días; infecciones extra intestinales, que son muy poco frecuentes. En estos casos, se plantea la administración de ciprofloxacina en dosis de mg de cada 12 horas por 5 días. <sup>(3,50)</sup>

Se realizaron estudios en cepas de muestras clínicas, en donde se observaron diferentes susceptibilidades: TRIMETROPIN/SULFAMETOXAZOL (100%), CLORANFENICOL (100%), AMIKACINA (67%), CEFO TAXIME (58%), TETRACICLINA (50%), AMPICILINA (0%) y ERITROMICINA (0%). Esto después de casos de intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*, de marzo del 2010 en Lázaro Cárdenas, Michoacán. <sup>(81)</sup>

También están establecidos los criterios de hospitalización, que son los siguientes: diabetes *mellitus*, hepatopatías, mesenquimopatías, inmunosupresión, insuficiencia renal, cáncer, aclorhidria, edad mayor de 65 años, embarazo y paciente de gravedad evidente. En estos casos es mejor hospitalizar, porque aumenta la posibilidad de muerte secundaria a hipocalcemia y arritmias. <sup>(3,70,94)</sup>

## **EPIDEMIOLOGÍA**

En el año 1953, investigadores japoneses encabezados por Fujino identificaron por primera vez al *Vibrio parahaemolyticus* como el causante de intoxicación alimentaria, esto ocurrió durante la aparición de un brote en la provincia de Osaka en la cual hubo 272 personas afectadas, con 20 fallecidos. El brote se asoció al consumo de sardinas crudas. <sup>(83,89)</sup>

Más tarde, Takikawa (1958) describe otro brote de gastroenteritis causada por un organismo similar al aislado por Fujino et al. (1953). En 1960 una epidemia de gastroenteritis ocurrió a lo largo de la costa del Pacífico de Japón, y el Ministerio de Salud y Bienestar Social estableció un comité para estudiar esta epidemia. Posteriormente, un *Vibrio* similar al descrito por Fujino et al. y Takikawa fue identificado como el agente etiológico. En 1963 Sakazaki et al. establece esquema antigénico con 11 lipopolisacáridos somáticos (O) y 41 polisacáridos capsulares (K). <sup>(114)</sup>

Posteriormente numerosos brotes de intoxicaciones alimentarias y casos esporádicos de *Vibrio parahaemolyticus* fueron reportados en EEUU, Europa y Asia, pero no fue hasta 1969 en que este microorganismo se consideró un problema de salud pública, principalmente en EEUU, y por lo tanto una alarma para el continente americano. <sup>(97,109)</sup>

En los Estados Unidos de América, antes de 1997 lo más común era asociar la enfermedad a cangrejos, ostras, camarones y langostas. (Tabla 9) <sup>(73,78)</sup> En ese país se notificaron cuatro brotes de *Vibrio parahaemolyticus* asociados al consumo de ostras crudas en 1997 y 1998. <sup>(29)</sup>

TABLA 9. BROTES ASOCIADOS CON BIVALVOS 1969-2000.

AGENTE	BROTOS	CASOS	PAIS	BIVALVO
Calicivirus	18	5923	USA, UK, Australia, Japón, España	Almejas Ostras
Hepatitis A	8	290.965	USA, Italia, China, Australia	Almejas, Ostras, Choritos
<b><i>V parahaemolyticus</i></b>	<b>5</b>	<b>669</b>	<b>USA, Canadá</b>	<b>Ostras, Almejas</b>
<i>V cholerae</i>	4	120	Malasia, Italia, USA	Ostras
<i>V vulnificus</i>	1	72	USA	Ostras
<i>V mimicus</i>	1	17	USA	Ostras
<i>V hollisae</i>	1	2	USA	Ostras
<i>Salmonella sp</i>	3	98	Singapur, UK, Japón	Ostras, Caracoles
<i>Shigella sp</i>	2	64	Francia, USA	Ostras, Choritos
<i>Plesiomonas sp</i>	2	54	USA, Canadá	Ostras

Fuente: Potasman I. *Clin Infect Dis* 2002; 35(8): 921-8.

En Australia, en 1990 y 1992, hubo dos brotes de gastroenteritis causadas por *Vibrio parahaemolyticus* en camarones congelados y cocidos importados de Indonesia y también se produjo una muerte en 1992 asociado al consumo de ostras. Y se sabe de brotes en Chile en donde analizan alrededor de 30 cepas durante 1992 y 1997.<sup>(30)</sup>

Un nuevo clon de *Vibrio parahaemolyticus* de serotipo O3:K6 apareció en Calcuta 1996 entre pacientes hospitalizados. Durante la vigilancia activa de las etiologías de diarrea entre los hospitales, pacientes en Calcuta, una ciudad en la parte noreste de India, un aumento de los ingresos hospitalarios de pacientes con gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus* se observó a partir de febrero de 1996. Análisis de las cepas reveló que un único serotipo, O3:K6, que no fue aislado previamente durante investigaciones en Calcuta, del 50 al 80% de las infecciones en los meses siguientes se relacionó con el serotipo.<sup>(9,77,84)</sup>

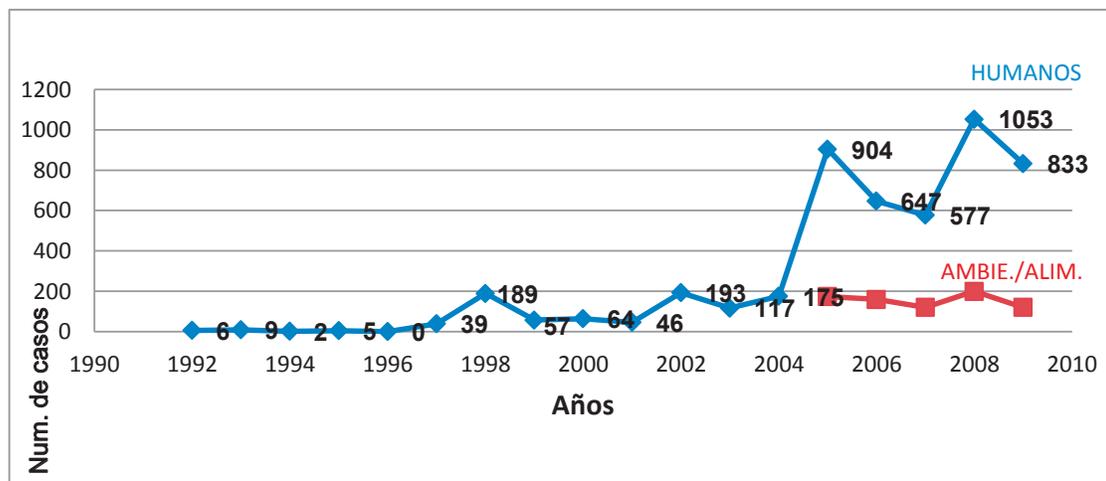
De igual manera las cepas de ese serotipo causaron una gran proporción de brotes en Taiwán desde 1996 a 1999, sugiriendo algo inusual en la ecología, epidemiología o virulencia del organismo. El clon pandémico ha continuado expandiéndose a través de Asia a Estados Unidos, Canadá, Rusia, Chile y Mozambique. Recientemente, ha emergido un nuevo grupo pandémico que ha mostrado ser genéticamente muy relacionado a la cepa O3:K6. Este grupo incluye O4:K68, O1:K25, O1:K41 y O1: KUT (UT: no tipificable).<sup>(47,66)</sup>

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

Antes de 1997 *Vibrio parahaemolyticus* se encontraba en forma esporádica en Chile. Entre 1992 y 1997 el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), recibió solamente 30 aislados de muestras clínicas provenientes de los hospitales regionales para su identificación. Sin embargo, un brote epidémico ocurrido en Antofagasta entre noviembre de 1997 y marzo de 1998, periodo de gran actividad de la Corriente del Niño, afectó a 340 personas posicionando a *Vibrio parahaemolyticus* como causa importante de ETA en Chile.<sup>(24,79)</sup>

En esa oportunidad *Vibrio parahaemolyticus* fue detectado en almejas, algas y ostiones. El segundo brote epidémico reportado en Chile ocurrió en el Servicio de Salud Llanquihue-Chiloé- Palena (Llanquihue) de la Xª Región, al sur del país, entre enero y marzo de 2004 y afectó a más de 1500 personas, en su mayoría adultos. En dicha oportunidad el ISP confirmó microbiológicamente los casos, detectando la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* con toxina TDH. Secundariamente se produjeron brotes epidémicos en otras regiones donde se consumían mariscos procedentes de Llanquihue, como la Región Metropolitana (RM), Vª, VIIIª y IXª regiones. Un tercer brote epidémico, de mayor magnitud que los anteriores, se inició en el verano del 2005. Como se observa en la figura 4, los picos más altos de la prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* tanto en muestras humanas como muestras de alimentos y ambientales fueron en el 2008.<sup>(5,37)</sup>

FIGURA 4. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS, CEPAS RECIBIDAS POR EL LABORATORIO DE REFERENCIA, ISP 1998 - 2009



FUENTE: Laboratorio Agentes ETAs. Sección Bacteriología-ISP. Chile, 2011.

En el 2005, el clon pandémico fue asociado con casos hospitalizados de diarrea en Mozambique, África del Este, y se aislaron también cepas O3:K6 con rasgos moleculares del clon pandémico a partir de fuentes ambientales en la costa francesa.<sup>(52,54)</sup>

El clon de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 para el 2005 ya se había diseminado en los cuatro continentes: Asia, América, África y Europa. Tal diseminación de un sólo serotipo del *Vibrio* no había sido reportada anteriormente, haciéndose evidente que se encontraban frente a una pandemia de gastroenteritis causada por *Vibrio parahaemolyticus*.<sup>(12,43)</sup>

En México se realizaron las primeras investigaciones en 1974 en donde fueron estudiadas en la ciudad de Puebla por Gil Recasens y colaboradores, dos cepas aisladas (0.26%) a partir de 777 muestras de heces humanas. Dichas cepas fueron aisladas de las heces de dos adultos del sexo masculino con cuadro clínico de gastroenteritis aguda y con antecedentes de ingesta previa de mariscos crudos y encontraron una incidencia del 6%.<sup>(104,79)</sup>

Franco y Flores, en 1988, aislaron una cepa (3.85%) del microorganismo a partir de 26 muestras de heces de manipuladores de alimentos marinos en la ciudad de Progreso de Castro, en Yucatán. Posteriormente, en 1989, aislaron 12 cepas (6.32%) a partir de 190 muestras de alimentos marinos crudos, insuficiente o parcialmente cocidos con calor de restaurantes de la ciudad de Mérida, Yucatán.

Un estudio realizado en el puerto de Acapulco, Guerrero, demostró la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en dos (0.73%) de las 275 muestras de heces tomadas de manipuladores de alimentos marinos.

En 1983, Molina García y colaboradores realizaron una búsqueda de anticuerpos contra *Vibrio parahaemolyticus* en 100 manipuladores de alimentos encontrando 17 sueros positivos. De este 17 por ciento el 10 por ciento correspondió a antígeno "vivo" y 7 por ciento a antígeno "muerto". De estos 100 manipuladores, 10 fueron manejadores de alimentos marinos y se encontraron un 50 por ciento de positividad (cinco sueros), que corresponde 40 por ciento a antígeno "vivo" (cuatro sueros), y 10 por ciento a antígeno "muerto" (un suero). De los 90 sueros de manipuladores de alimentos no marinos, 12 (13.33%) tuvieron anticuerpos contra *Vibrio parahaemolyticus*: seis (7%) contra antígeno "vivo" y seis (7%) contra antígeno "muerto". En dicho estudio se usaron dos cepas aisladas de casos de gastroenteritis como antígenos.<sup>(18)</sup>

En México no había reportes por infección de *Vibrio parahaemolyticus*, hasta que en el año 2004 se reportó el único brote en México causando más de 1,230 casos de gastroenteritis en el sur del estado de Sinaloa, debido al serotipo O3:K6. En el 2006 y 2008 aparecen nuevos casos de gastroenteritis debido a *Vibrio parahaemolyticus*.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDÉMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

---

En un estudio realizado en Sinaloa en el 2009 se concluyó, que el porcentaje de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con toxinas ha ido en aumento no sólo en muestras clínicas sino en las ambientales, las cuales pueden ser potencialmente patógenas para el humano por lo que se esperaría un aumento en los casos de gastroenteritis, y de acuerdo a la combinación de genes del grupo pandémico y que el serotipo identificado mayormente fue O3:K6, al que se atribuye como el responsable de los brotes del 2004 y los casos esporádicos tanto en el 2006 y el 2008, también se encontraron otros serogrupos con combinación de genes pandémicos.<sup>(113)</sup>

Al igual que se observó tendencia de la combinación de los genes que identifican las cepas pandémicas. El grupo solo con toxinas ha ido en aumento, mientras que la combinación del grupo pandémico probable O3:K6 ha disminuido. El grupo sin toxinas ha disminuido. Por lo que se concluyó que el porcentaje de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con toxinas ha sido en aumento no sólo en muestras clínicas sino en las ambientales, las cuales pueden ser potenciales patógenas para el humano por lo que se esperaría un aumento, al igual estudiar las variaciones de esta bacteria para evitar nuevos brotes futuros y poder llevar a cabo mejores medidas de prevención.<sup>(113)</sup>

En Michoacán, durante la última epidemia de *Vibrio cholerae*, los casos aunque esporádicos, se pudo aislar distintas especies de Vibrios. Siendo los primeros aislamientos en nuestro estado durante este periodo. (Tabla 10).

TABLA 10. CASOS AISLADOS A PARTIR DE DIARREAS EN MICHOACAN

	<i>Vibrio cholerae</i> NO O1	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio furnussi</i>	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>Vibrio mimicus</i>	<i>Vibrio Metschnikovi</i>
1991	1					
1992	8					
1993	1					
1994						
1995					1	
1996						
1997	2	5				1
1998	3	2	1			
1999	4			1		

FUENTE: LABORATORIO DE INVESTIGACION EN MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA "EVA SAMANO DE LOPEZ MATEOS".

Es el caso de *Vibrio parahaemolyticus* que en 1997, produjeron cinco casos en Zinapécuaro, Michoacán. Causando síntomas como diarrea, vomito y deshidratación y un caso requirió hospitalización e hidratación parenteral. Lo cual no ha permitido conocer por primera vez otro Vibrio diferente a *Vibrio cholerae* causante de enfermedad a un grupo de personas en un lugar determinado.

## **PREVENCIÓN**

La contaminación de alimentos marinos por *Vibrio parahaemolyticus* es un hecho común, dada la ecología que la caracteriza. El análisis y adecuado tratamiento de los alimentos de esta procedencia contribuyen en gran medida a la prevención de posibles brotes, ya que las cepas, de origen ambiental pueden presentar factores de virulencia tales como la TDH, asociada con la patogenicidad del microorganismo.

El insuficiente control de los alimentos de origen marino, que involucra las condiciones de transporte, almacenamiento (refrigeración) y escasa cocción, aunado a las prácticas de consumo de mariscos crudos sin desinfección pueden ocasionar un aumento considerable en la probabilidad de contraer el agente etiológico y desarrollar enfermedad.

La ebullición inactiva rápidamente a este patógeno, cifras apenas por encima de la máxima para su crecimiento destruyen al 90% de la población de un cultivo en menos de una hora. Los yodóforos parecen ser más efectivos que el cloro en la desinfección de ostiones contaminados cuando el tratamiento se aplica a una concentración de 25 mg/L.<sup>(13)</sup>

## **RECOMENDACIONES**

Hervir ó cocer al vapor los mariscos, en el caso de mariscos en su concha permitir el cocimiento hasta que la concha se abra y continuar el proceso durante 5 – 9 minutos.

Freír o cocer perfectamente pescados y ostión (sin concha).

No permitir la contaminación cruzada, una vez que los alimentos han sido adecuadamente procesados evitar el contacto con superficies de trabajo o con alimentos crudos.

Refrigerar los alimentos, sino son consumidos inmediatamente.

No consumir alimentos de dudosa procedencia.<sup>(13)</sup>

#### **IV. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD**

##### ***Vibrio parahaemolyticus***

Históricamente la patogenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* se ha asociado con el fenómeno de Kanagawa (KP) que se observa como la beta-hemólisis en agar Wagatsuma. Prácticamente todos los aislamientos clínicos de *Vibrio parahaemolyticus* KP-son positivas, mientras que sólo 1 a 2 de las cepas ambientales KP-positivo (Sakazaki y otros 1968; Miyamoto y otros 1969; Nishibuchi y Kaper 1995). Ahora se sabe que la reacción de Kanagawa es causada por el Hemo lisina termoestable directa (TDH), proteína descrita por Nishibuchi y Kaper en 1995, llamada así porque no se inactiva por el calor 100 ° C durante 10 min y porque su actividad hemolítica no se ve reforzada por la adición de lecitina que sugiere una actividad directa en eritrocitos.

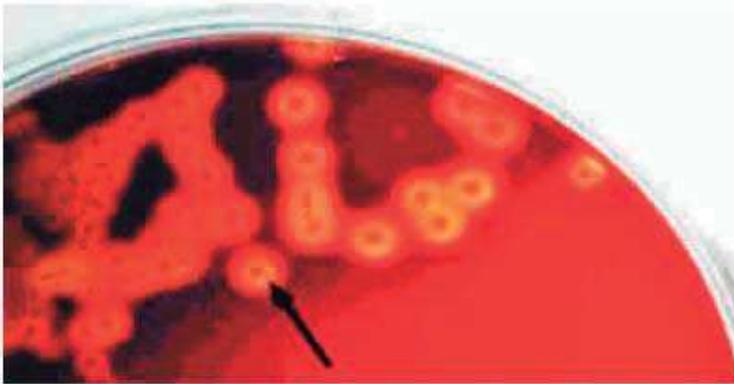
Una encuesta realizada por Nishibuchi y Kaper mostró que todos los KP-positivo (clínica) cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en efecto, contiene dos genes *tdh*, mientras que las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* (clínicas y ambientales) que muestran la hemólisis débil en agar Wagatsuma y se consideran sólo KP-intermedia sólo tienen un gen *tdh*. Al observar KP-negativos mayoría de las cepas de las cuales son de origen del medio ambiente 16 de estas cepas contenían una copia del gen *tdh* mientras que el resto de las cepas KP-negativos no tienen el gen *tdh* lo que sugiere que la mayoría de las cepas KP-negativos no pueden producir la proteína TDH. De vez en cuando los aislamientos de otras especies de *Vibrio*, incluso *Vibrio hollisae*, *Vibrio cholerae* no-O1 y *Vibrio mimicus* se ha encontrado que llevan el gen *tdh*. A pesar de la importancia del factor de Kanagawa y la TDH proteína KP-negativos cepas de *Vibrio parahaemolyticus* en ocasiones han sido asociados con brotes de gastroenteritis.

Se ha sugerido que la hidrólisis de la urea puede utilizarse como un marcador para predecir las cepas potencialmente virulentas del *Vibrio parahaemolyticus* informó por primera vez este fenómeno es conclusión de que el fenotipo ureasa positivo se asoció con el O4: K12 serotipo, se reportó que cepas *tdh* positivas de origen clínico y ambiental también fueron ureasa positivo.<sup>(114)</sup>

La patogénesis de este microorganismo ha sido estudiada extensamente, los factores de virulencia principales son la hemolisina directa termoestable (TDH), la hemolisina relacionada a la TDH (TRH) y factores de adherencia que interactúan con los receptores superficiales de la célula huésped.<sup>(38)</sup> La adherencia, la colonización y multiplicación de los microorganismos en el intestino, es un paso inicial en el proceso de una infección. Diferentes investigadores señalan al pili, al flagelo y a las hemaglutininas como posibles factores de adherencia; sin embargo, el mecanismo de adherencia de este enteropatógeno, no ha sido completamente dilucidado. La toxina denominada

hemolisina directa termoestable (TDH-thermostabledirecthemolysin), considerada como un factor de virulencia determinante para la producción de enfermedad en el ser humano. Las cepas que presentan dicha hemolisina cultivadas sobre agar Wagatsuma que contiene eritrocitos humanos, son hemolíticas (beta-hemólisis, a este hecho se le conoce como fenómeno o prueba de Kanagawa, estudios epidemiológicos revelan una fuerte asociación entre éste fenómeno y la gastroenteritis. (FIGURA 4) <sup>(35,53,66,74)</sup>

FIGURA 4. FENOMENO DE KANAGAWA .



FUENTE: Zamora Pantoja Diana Ruth. Quiróz Santiago Carolina. UN ENEMIGO MARINO SILENCIOSO VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS. Revista Digital Universitaria 10 de abril 2005 • Volumen 6 Número 4 • ISSN: 1067-6079. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/art33.htm>

La toxina termoestable directa (TDH) es el factor de virulencia más importante en el mecanismo de producción de la diarrea. <sup>(65,86)</sup> La TDH es una proteína con actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos (fenómeno de Kanagawa); esta toxina posee varias propiedades entre las que destacan: citotoxicidad, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de líquido en el asa de íleon en el modelo experimental en conejos. El mecanismo patogénico es la alteración del flujo iónico de las células intestinales, el que desencadena una diarrea secretora. La toxina TDH es codificada por un gran número de genes *tdh*, los que han sido secuenciados, evidenciándose una estrecha relación genética entre ellos (97% de similitud). Se dice que más del 90% de aislamientos de muestras clínicas de *Vibrio parahaemolyticus* pero menos del 1% de las cepas de alimentos o ambientales produce TDH o posee *tdh*. Por su parte, la frecuencia de detección de TDH o la detección de *tdh* en muestras ambientales y alimentos marinos varían del 0% a 6%. <sup>(29)</sup>

Otro factor importante en la producción de diarreas es la presencia de la toxina hemolisina relacionada (TRH), que es codificada por los genes *trh*, genéticamente relacionado a *tdh*, con 68,6% de similitud genética. <sup>(21,45)</sup> Esta

toxina fue inicialmente determinada en cepas provenientes de casos de gastroenteritis que no presentaban el fenómeno hemolítico de Kanagawa. Al igual que TDH, TRH produce acumulación de líquido en el modelo experimental de asa ligada de conejo y presenta actividad citotóxica en una variedad de tejidos.

La presencia del gen *tdh*, que codifica TDH es de uso frecuente como una herramienta de diagnóstico para identificar patógenos aislados de *Vibrio parahaemolyticus*. Cinco variantes de la secuencia de *tdh* (llamado *tdh1* a *tdh5*) han sido identificadas, sin embargo, sólo *tdh2* parece tener un alto nivel de la transcripción. TDH y TRH son considerados los factores principales de virulencia en *Vibrio parahaemolyticus* y las cepas pueden contener TDH o TRH o ambos.<sup>(15)</sup>

En un estudio anterior, se informó acerca de un fago filamentoso que se asocia específicamente con la reciente O3:K6 cepas serotipo de *Vibrio parahaemolyticus*. Este fago, f237, tiene varios genes en común y una estructura genómica similar a otro fago filamentoso CTX (9), que es conocido por llevar los genes de la enterotoxina del cólera (*ctxAB*), el factor de virulencia más importante de *Vibrio cholerae*. En lugar de *ctxAB*, f237 posee un marco abierto de lectura única, ORF8, que no tiene homología con otras secuencias de ADN en las bases de datos. En este estudio, se analizó la distribución de la f237 en los últimos aislamientos clínicos de *Vibrio parahaemolyticus*.

La prevalencia tan alta de los fagos f237 en las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que muestra propagación de la pandemia indica que el fago puede conferir un fenotipo hasta ahora desconocido para la bacteria. El fenotipo puede, a su vez, proteger al organismo frente a la presión selectiva en un ambiente determinado antes de que infecte a los humanos. Si fago f237 ha jugado un papel importante en la potencia recientemente creciente pandemia de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* es un objeto de estudio.

El tipo de sistema de secreción (T3SS) translocón complejo se compone de varias proteínas asociadas, que forman un canal de translocación a través de la membrana plasmática de la célula huésped. Estas proteínas son moléculas clave que participan en la patogenicidad de las bacterias que T3SS-positivo, porque son necesarios para generar las proteínas efectoras en células del huésped. Un T3SS designado T3SS2 de *Vibrio parahaemolyticus* se cree que estar relacionado con la enterotoxicidad de esta bacteria en humanos.<sup>(61)</sup>

La secuenciación de genomas enteros de *Vibrio parahaemolyticus* cepa RIMD2210633 (cepa aislada de una muestra clínica de *Vibrio parahaemolyticus* en Japon en 1996) reveló la presencia de dos conjuntos de genes en los cromosomas 1 y 2 que codifican dos diferentes sistemas de secreción tipo III (T3SS), T3SS1, T3SS2, que son designados respectivamente.<sup>(61)</sup> El grupo de genes T3SS1 se encuentra en cepas positivos y negativos-TDH, y aunque hay

algunas excepciones, el grupo de genes T3SS2 es altamente asociados con cepas positivas TDH.<sup>(67)</sup> Un análisis funcional de T3SS2 reveló que está asociado con la actividad citotóxica contra las células Caco-2 observado in vitro.<sup>(50)</sup> Por lo tanto, T3SS2 también se cree que está relacionado con la enterotoxigenicidad de *Vibrio parahaemolyticus* en los seres humanos.<sup>(82,107)</sup>

Asociado con T3SS-2 codificada en el cromosoma 2 son Tdh1 y Tdh2, así como un factor necrosante citotóxico, un T exoenzima y al menos cinco transposasas. La presencia de transposasas y un contenido de G + C (bases guanina y citocina) del 40% (menos que el genoma total), sugiere que T3SS-2 puede ser un elemento integrador similares a las islas de patogenicidad identificados en patógenas de *E. coli*, *S. enterica*, y *V. cholerae*, que nombramos *Vibrio parahaemolyticus* isla-7 (VPa I-7). T3SS-2 está presente principalmente en el *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 cepas altamente virulenta se recuperaron después de 1995, mientras que la mayoría de los aislamientos clínicos que se recuperaron antes de 1995 no codifican T3SS-2 que indica que la región está, no son esenciales para la virulencia, pero puede incrementar la virulencia cuando está presente.<sup>(101,108)</sup>

Las moléculas bacterianas tienen la capacidad de secretar una gran variedad de moléculas, incluyendo polisacáridos muy complejos y proteínas. Algunas de estas moléculas son requeridas para la viabilidad de la célula, mientras que otras son usadas para la interacción con el ambiente. Los polisacáridos pueden ser secretados por la célula en dos formas: polisacáridos que se vierten al ambiente próximo a la célula (exopolisacárido para la formación de biopelículas) y polisacáridos asociados a la célula (cápsula y lipopolisacárido). Dentro de la familia *Vibrionaceae* se han encontrado estos dos tipos de polisacáridos, como es el caso de *Vibrio parahaemolyticus*, el cual con la cápsula juega un papel crítico en las interacciones entre la bacteria y su ambiente más inmediato.

La cápsula es una estructura que envuelve la superficie de la bacteria, compuesta por polisacáridos de alto peso molecular que están firmemente anclados a la superficie celular; está demostrado que esta estructura es un factor de virulencia, ofreciendo protección contra la respuesta inmune del hospedero (opsonización, fagocitosis y acción lítica del complemento).<sup>(102)</sup>

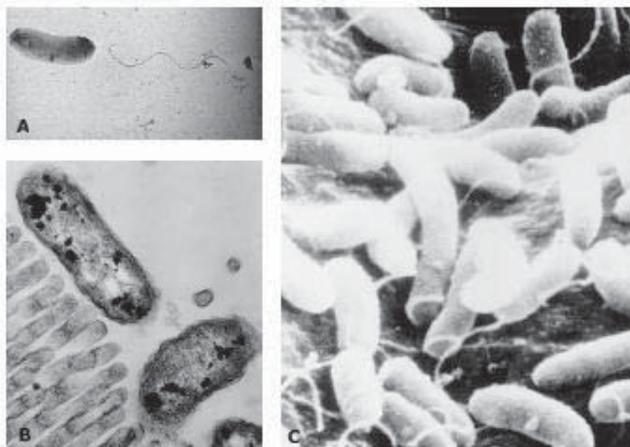
Además de los anteriores, *Vibrio parahaemolyticus* requiere de otros factores para causar enfermedad, como una variedad de pili, hemaglutininas (hemaglutinina manosa sensitiva), factores de colonización y capacidad de invasión celular.<sup>(5,80)</sup>

### ***Vibrio cholerae***

En la actualidad, *Vibrio cholerae* es una bacteria que está bien caracterizada bioquímicamente, y se clasifica en serogrupos en función de la composición del antígeno O del lipopolisacárido (LPS).<sup>(5)</sup> De los cerca de 200 serogrupos identificados hasta el momento, solamente dos de ellos, O1 y O139, se reconocen como los únicos responsables de las epidemias de cólera. A su vez, el grupo de cepas del serogrupo O1 se clasifica en dos biotipos: *clásico* y *El tor*, y en cada uno de ellos se distinguen tres serotipos distintos: Inaba, Ogawa e Hikojima. El resto de serogrupos se les denomina comúnmente como no-O1/no-O139, suelen aislarse de fuentes ambientales pueden producir casos esporádicos de gastroenteritis y de infecciones extra intestinales.<sup>(49)</sup>

*Vibrio cholerae* presenta un ciclo de vida libre, formando parte de la microbiota de los ecosistemas acuáticos, tanto de aguas saladas como dulces, en la que a menudo se encuentra asociada como comensal a diversos organismos acuáticos. Se ha descrito que puede adherirse a la quitina de los caparzones de algunos crustáceos y puede colonizar las superficies de algas, fitoplancton, copepodos y raíces de plantas acuáticas. En estos hábitats son aislados con mayor frecuencia las cepas no-O1/no-O139. Sin embargo, la adquisición de factores de virulencia por parte de algunas de estas cepas las capacita para colonizar la mucosa del intestino delgado humano, en donde persisten, se multiplican y producen la toxina causante del cólera.<sup>(34,64)</sup>

FIGURA 5. (Fotografías de microscopía electrónica de barrido y de transmisión del trabajo de Nelson y col. (1976), A: la bacteria presenta forma de coma y un flagelo polar, y habita normalmente ambientes acuáticos; B y C: vibrios adheridos a la superficie de la mucosa intestinal).



El cólera se transmite por medio del agua y los alimentos contaminados. De hecho, los grandes brotes súbitos suelen ser causados por un abastecimiento de agua contaminada. Rara vez el cólera es transmitido por contacto directo de

persona a persona.

En 1991 el cólera reemergió en Perú, luego de aproximadamente 100 años de ausencia de casos en Sudamérica. Esta epidemia fue causada por *Vibrio cholerae* O1 biotipo El Tor. En Argentina ocurrieron siete brotes de cólera entre 1992 y 1998. En el país se estableció un activo programa de vigilancia que incluyó la creación de la Red de Laboratorios de Diarreas y Patógenos Bacterianos de Transmisión Alimentaria. En el marco de este programa y también a través de estudios de monitoreo en el medio ambiente, desde 1992 hasta 2007 se identificaron y caracterizaron alrededor de 3.500 aislamientos de *Vibrio cholerae* O1 y no-O1 de origen humano y ambiental provenientes de distintas regiones del país. *Vibrio cholerae* O1 fue aislado únicamente durante los periodos epidémicos, principalmente en el norte del país y en los meses de verano. En cambio, los aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 siguieron un patrón diferente, ya que se recuperaron principalmente en primavera y verano, pero también en los meses de otoño e invierno. En general, los aislamientos clínicos estaban asociados a casos esporádicos de diarrea grave o moderada, aunque también hubo microorganismos recuperados de septicemias. En diciembre de 1999 y enero de 2000, ocurrió en Orán (provincia de Salta) un brote de diarrea que afectó a niños y adultos y que duplicó el número de coprocultivos esperados para la época del año; durante ese brote se recuperó *V. cholerae* no-O1 de diez pacientes y también de fuentes de agua de la zona.

Los principales factores de virulencia asociados al cólera epidémico incluyen la enterotoxina conocida como CT y el factor de colonización TCP (*toxina corregulada por el pilus*) codificado en la isla de patogenicidad VPI, ambos habitualmente ausentes en *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139. Para estos serogrupos se postula un mecanismo de patogenia diferente, en el que intervienen otros factores de virulencia.

Por otra parte, *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 puede producir otros productos extracelulares como la toxina termoestable NAG-ST y las citolisinas VCC/HlyA y RTX, los que pueden estar contribuyendo a la virulencia de estas cepas. También se ha descrito una neuraminidasa codificada en otra isla de patogenicidad (VPI-2), que cliva el ácido siálico de los gangliósidos presentes en las células eucariotas. Se cree que esta enzima aumenta la sensibilidad de las células hospedadoras a la toxina CT, ya que expone al gangliósido GM1, receptor de la toxina.

Un trabajo realizado por el laboratorio de Mekalanos y cols., en el año 2005, describió por primera vez una cepa clínica de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 que porta en su genoma un segmento homólogo de la isla de patogenicidad denominada VPal-7 de *Vibrio parahaemolyticus*. Este segmento génico codifica para un sistema de secreción tipo III (TTSS) funcional que probablemente pueda estar contribuyendo a la virulencia de este tipo de cepas. La isla de patogenicidad Vpal-7 porta los principales genes de virulencia de este vibrión (gen *tdh* que codifica la hemolisina directa termoestable o TDH) y otros probables genes de virulencia.

## **V. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

*Vibrio parahaemolyticus* ha sido considerado, tanto por su número como por los lugares de recolección, una causa de gastroenteritis de proporciones mundiales. Ha sido aislado de áreas marinas y estuarios casi mundialmente y, a pesar de su naturaleza halofílica, aun no ha podido ser hallado en aguas libres de sal. Sin embargo, las regiones en las que las enfermedades gastrointestinales son endémicas constituyen un mayor peligro para la población que aquellas libres de dichos brotes, especialmente cuando los productos marinos provienen de las proximidades costeras en las que hay gran densidad poblacional. <sup>(99)</sup>

Por las condiciones ambientales que se saben de *Vibrio parahaemolyticus*, cuando las temperaturas del agua son bajas, los peligros para la salud pública son menores que en épocas calurosas. Por esta razón, los principales problemas microbiológicos asociados a pescados y mariscos son su aprovechamiento y la conservación de su calidad. No obstante, así como otros alimentos comercializados intensamente en todo el mundo, ellos comparten la posibilidad de actuar como vehículos de microorganismos patógenos y su peligrosidad guarda relación estrecha con las condiciones ambientales y con la naturaleza de los organismos involucrados. <sup>(95)</sup>

Por lo cual, los moluscos, al ser animales sésiles que se alimentan filtrando el agua, pueden concentrar en ellos diversas bacterias y virus, y son potenciales vehículos de microorganismos peligrosamente patógenos. A su vez, crustáceos y peces también se hallan expuestos a estas bacterias patógenas para el hombre al ser el medio acuático su único medio de vida. <sup>(22)</sup>

En el año 1953, investigadores japoneses identificaron por primera vez al *Vibrio parahaemolyticus* como el causante de intoxicación alimentaria, esto ocurrió durante la aparición de un brote en la provincia de Oosaka en la cual hubo 272 personas afectadas, con 20 fallecidos. <sup>(83,89)</sup>

A partir de esta fecha las intoxicaciones alimentarias se presentaron casos esporádicos de *Vibrio parahaemolyticus* los cuales fueron reportados en EEUU, Europa y Asia, pero no fue hasta 1969 en que este microorganismo se consideró un problema de salud pública, principalmente en EEUU, y por lo tanto una alarma para el continente americano. <sup>(97,109)</sup>

En Latinoamérica los brotes alimentarios se presentaron a lo largo de 1997 a 2008 por *Vibrio parahaemolyticus*.

A finales de 2007 la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. (FDA) reportó dos presuntos casos de intoxicación alimentaria por

*Vibrio parahaemolyticus* asociados al consumo de moluscos bivalvos provenientes de México.

De 2005 a 2008 en México, 547 casos de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus* fueron notificados por 20 entidades federativas, los cuales fueron confirmados por el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), siendo el promedio anual de notificación de 136 casos. Durante 2006 se presentaron 47% de los casos reportados en el período de estudio, mientras que los años 2007, 2008 y 2005 representan 24.7, 24.9 y 3.5 % de los casos respectivamente. Pese a no tratarse de una enfermedad de informe obligatorio el número de estados notificantes ha ido en aumento (5, 2005; 11, 2006; 13, 2007; 16, 2008).<sup>(38)</sup>

En un estudio realizado en el InDRE durante el 2010, Michoacán se encontraba dentro de los primeros estados con mayor aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* a partir de muestras clínicas por debajo de estados como Sinaloa y Nayarit, donde se menciona que de cada cinco *Vibrio parahaemolyticus* aislados en muestras clínicas cuatro son toxigénicos.<sup>(2)</sup>

## **VI. JUSTIFICACION**

Las enfermedades transmitidas por alimentos, en su mayoría son de tipo infeccioso y de origen químico como las intoxicaciones. La incidencia de estas enfermedades sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública más extendidos en el mundo contemporáneo y permanecen como una de las causas principales de morbilidad, que ocupan el segundo lugar entre las enfermedades transmisibles de notificación obligatoria.

Entre los alimentos involucrados resaltan los moluscos bivalvos, debido a que estos productos en su origen están sometidos a una contaminación microbiológica y química, entre otras, lo que aunado a la forma de consumo generan enfermedades para el consumidor.<sup>(76)</sup>

Es el caso de América del Norte se produjeron importantes brotes de enfermedad debidos a *Vibrio parahaemolyticus* tras el consumo de ostras crudas, la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) encargó una evaluación cuantitativa de riesgos acerca de las consecuencias para la salud pública de la presencia *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos crudos" (FDA-VPRA), uno de cuyos resultados fue la elaboración de un modelo de riesgo.

Entre las acciones realizadas se implementó el análisis de las muestras de productos alimenticios para determinar *Vibrio parahaemolyticus* por Número Más Probable (NMP), en los laboratorios que se encuentren dentro de la Red Nacional de Laboratorios coordinada por la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC).<sup>(20)</sup>

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), a través de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC) colabora en la realización de ensayos de laboratorio a todos aquellos productos sujetos al control sanitario, para contribuir a la prevención y protección contra riesgos sanitarios.

Por lo tanto la importancia de este estudio impacta a México, pues la cercanía de otros países con brotes importantes de esta bacteria nos demuestra una estimación de las afectaciones de salud, sociales y económicas que sufren ciertas regiones. Además que la exportación de estos alimentos de origen marino podría estar amenazada causando pérdidas económicas importantes para el país.

A partir de ello surge la necesidad de un estudio más extenso para confirmar estos resultados, ya que la comunidad de pescadores que se sostienen de la pesca del camarón se vio afectada seriamente el año 2003 al ser decretada

una veda precautoria por la Comisión Federal Para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS).<sup>(16)</sup>

Se estima que las pérdidas económicas que generan los alimentos contaminados por algún patógeno ascienden a 35, 000 millones de dólares al año tan solo en los EUA según la Organización Mundial de Salud en el 2007, por lo tanto en México las pérdidas serían de mayor impacto para el país.

## **VII. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Conocer la prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* con potencial epidémico en muestras humanas y en alimentos en el Estado de Michoacán.

### **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Identificar *Vibrio parahaemolyticus* en muestras clínicas de 2000 al 2010 en el Estado de Michoacán.

Conocer edad, sexo y procedencia de los pacientes a los cuales, a partir de muestras clínicas se identificó *Vibrio parahaemolyticus*.

Determinar *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico en muestras clínicas.

Identificar *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de alimentos durante 2009 y 2010 en el Estado de Michoacán.

Conocer tipo de alimento, época estacional y lugar de procedencia de los aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus*.

Determinar *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico en muestras de alimentos.

## VIII. METODOLOGIA

- TIPO DE ESTUDIO: AMBIPECTIVO, EXPERIMENTAL, LONGITUDINAL, ESTUDIO DE POBLACION.
- POBLACIÓN DE ESTUDIO:

a) Todas las muestras clínicas para la búsqueda de *Vibrio* sp. que lleguen al Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, recibidos desde el año 2000 hasta 2010, las cuales fueron recibidas en hisopado rectal con formato de identificación y procedencia del paciente. Las muestras procedían de los diferentes centros de salud de Michoacán.

b) Todas las muestras de alimentos que lleguen al área de *Vibrio* sp. del Laboratorio Estatal de Salud Pública, a partir de Enero 2009 hasta Agosto del 2010. Las muestras de camarón y moluscos bivalvos recolectadas en los diferentes expendios de alimentos de origen marino, por verificadores, con guantes, se tomaban las muestras para colocarlas en bolsas estériles en refrigeración. Recolectadas de los diferentes municipios de Michoacán.

- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS:

a) Las muestras clínicas se analizaron de acuerdo a los lineamientos establecidos por el InDRE, NOM-016-SSA2-1994 tal como se describe en el Apéndice 1.

b) A las muestras de alimentos se realizó la determinación de *Vibrio parahaemolyticus* por la técnica del NMP de acuerdo a la NOM-242-SSA1-2005 tal como se describe en el Apéndice 1.

- CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

a) Para el Laboratorio Estatal de Salud Pública, Crustáceos y Moluscos bivalvos que cumplan con el procedimiento de selección de muestras, en recepción.

b) Para el Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia toda muestra clínica de hisopado rectal o hisopado de heces en medio Cary Blair, con encuesta epidemiológica en donde describe el caso clínico y posible sospecha del agente infeccioso.

- CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

a) Alimentos de origen marino que lleguen a recepción del Laboratorio Estatal de Salud Pública: Que no cumplan con los datos completos del formato de recepción.

Que no cumplan con el peso para su análisis.

En el caso de Moluscos Bivalvos conchas abiertas.

Que los alimentos estén congelados.

b) Muestras clínicas que lleguen al Hospital Infantil de Morelia:

Sin encuesta epidemiológica de especificaciones e identificación.

Medios de transporte que no estén bien selladas.

- CRITERIOS DE ELIMINACIÓN: Todas aquellas muestras que lleguen al laboratorio sin identificación.

- VARIABLES DE ESTUDIO:

EDAD, SEXO, EPOCA ESTACIONAL DEL AÑO, PROCEDENCIA, TIPO DE ALIMENTO.

- FUENTES DE INFORMACIÓN:

a) Bitácoras de Registro del Laboratorio de Investigación de Microbiología Parasitología, Programa de Cólera en el Estado.

b) Bitácoras del Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, Laboratorio de *Vibrio* sp. y Laboratorio de Bacteriología.

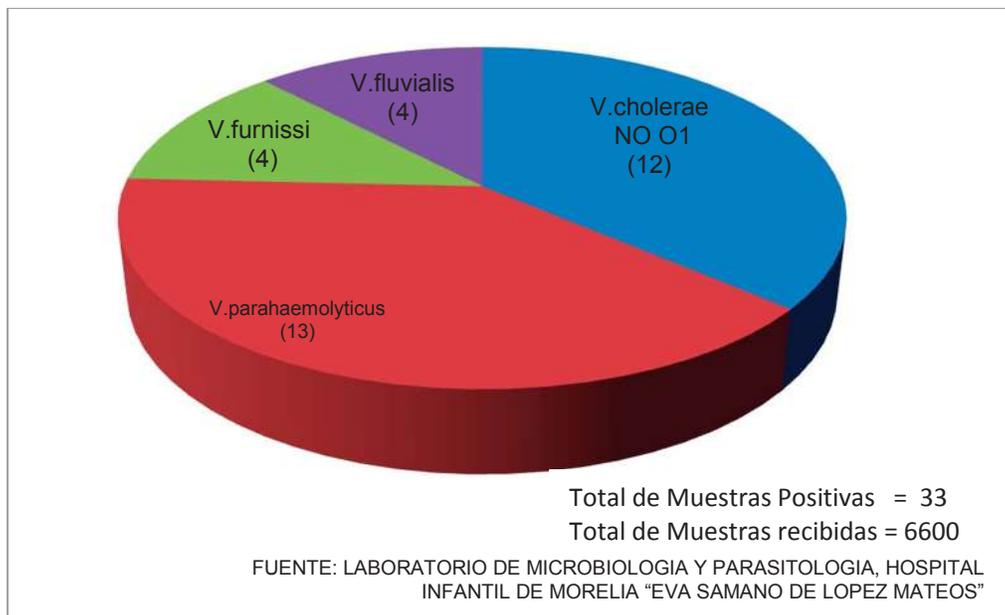
- ANÁLISIS DE RESULTADOS: Porcentajes y números absolutos, utilizando el programa Excel.

### IX.- RESULTADOS

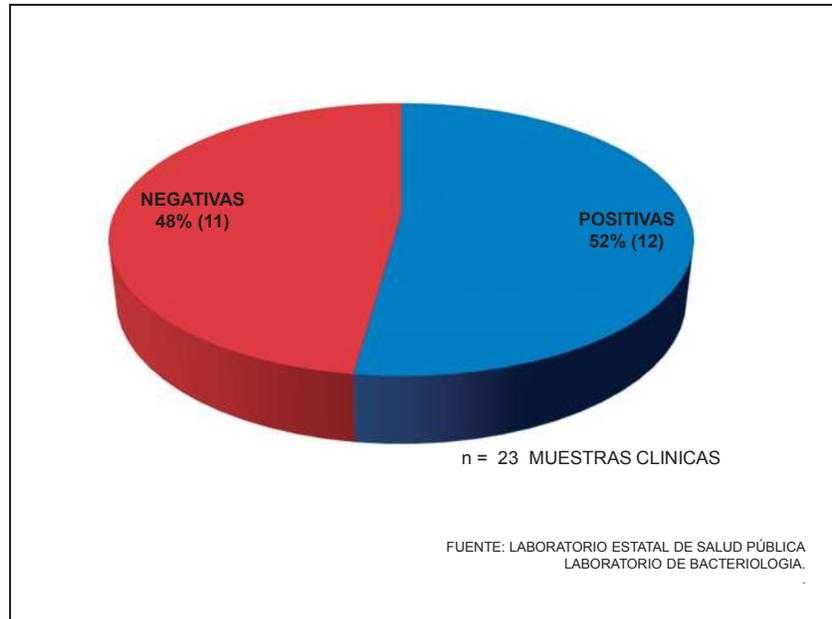
De las 6600 muestras analizadas 99.5% resultaron negativa y en 0.5% (33) muestras positivas se identificaron: *Vibrio parahaemolyticus* 0.19%(13), *Vibrio cholerae* NO O1 0.18%(12), *Vibrio furnissi* 0.06%(4) y *Vibrio fluvialis* 0.06%(4) respectivamente.

La mayoría de los Vibrios fueron casos aislados solo en el 2010 se presentó un brote por *Vibrio parahaemolyticus*.

Gráfica 1. AISLAMIENTOS DE VIBRIO SP. EN MUESTRAS CLINICAS (2000 – 2010)



Gráfica 2. BROTE DE *Vibrio parahaemolyticus* 2010 INTOXICACIÓN ALIMENTARIA.

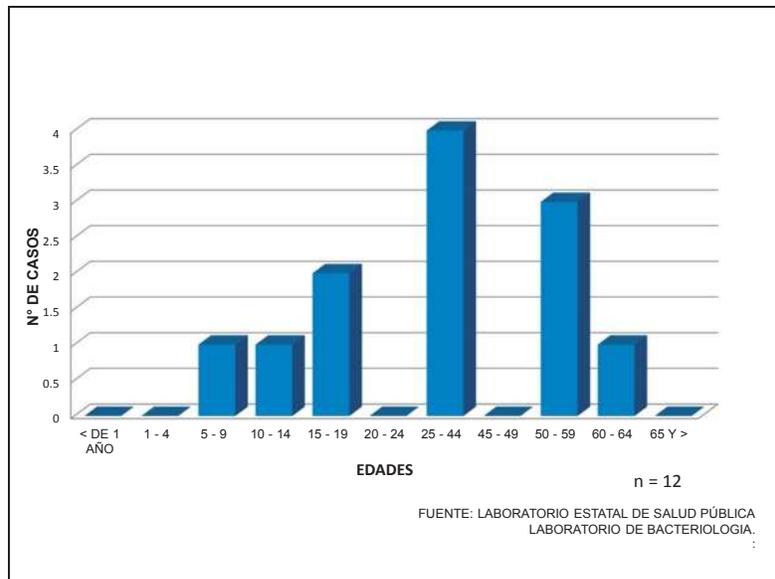


En el año 2010 se presentó una intoxicación que provocara la ingesta de alimento de origen marino en un comercio de Lázaro Cárdenas, Michoacán. En el Laboratorio Estatal de Salud Pública, se recibieron 23 muestras clínicas analizadas, 52% (12) fueron positivas a *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico, como se muestra en la gráfica 2.

Se analizaron los alimentos que se consumieron en el establecimiento, encontrando las muestras positivas a *Vibrio parahaemolyticus*, pero todas ellas fueron reportadas como No Toxigenicas por el InDRE. Aunque también no se tiene la certeza de que hayan sido las muestras originalmente consumidas.

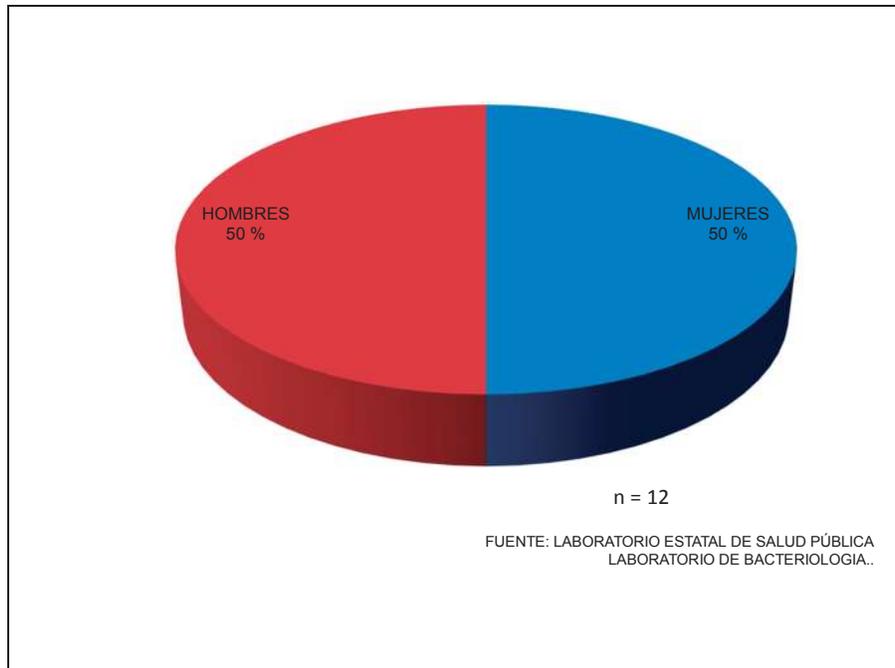
En los casos clínicos de *Vibrio parahaemolyticus* en Michoacán se presentan en su mayoría en adultos de 24 a 44 años como se muestra en la gráfica 3, todos ellos por cepas toxigénicas. De los casos clínicos 100% presentó síntomas como diarrea y vómito.

Gráfica 3. AISLAMIENTOS POR EDAD DE *Vibrio parahaemolyticus* PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS (2010). A

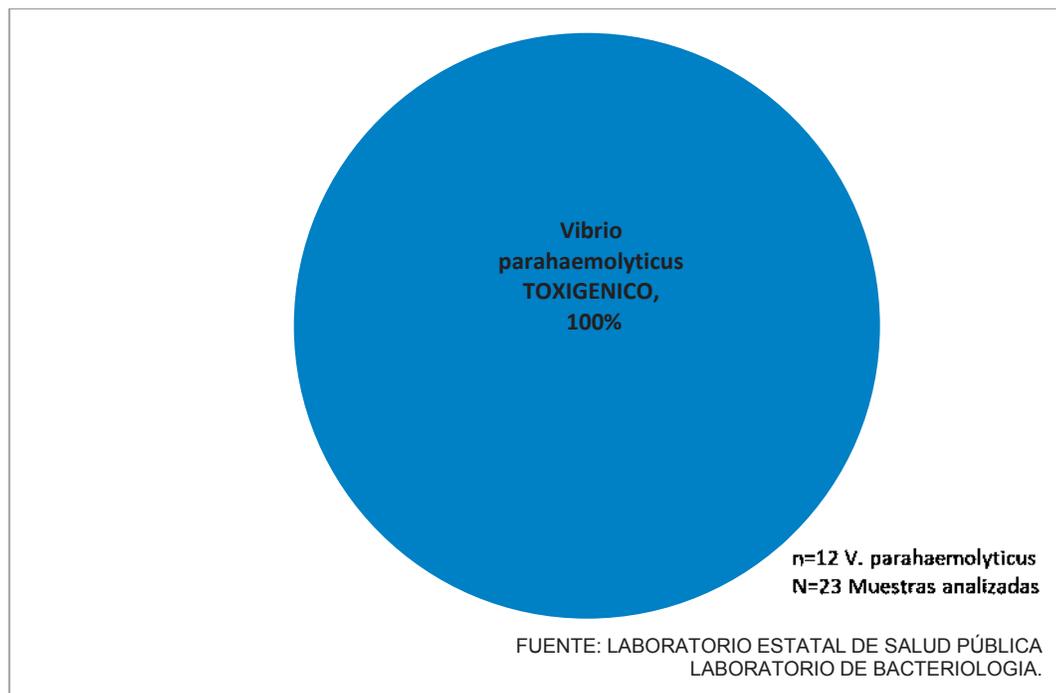


De acuerdo al sexo de los afectados no se observa marcada tendencia estadísticamente significativa, ya que de los 12 casos que se presentaron 6 (50%) fueron del sexo masculino y 6 (50%) del sexo femenino como se observa en la gráfica 4.

Gráfica 4. AISLAMIENTOS DE *Vibrio parahaemolyticus* A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS POR SEXO 2010.



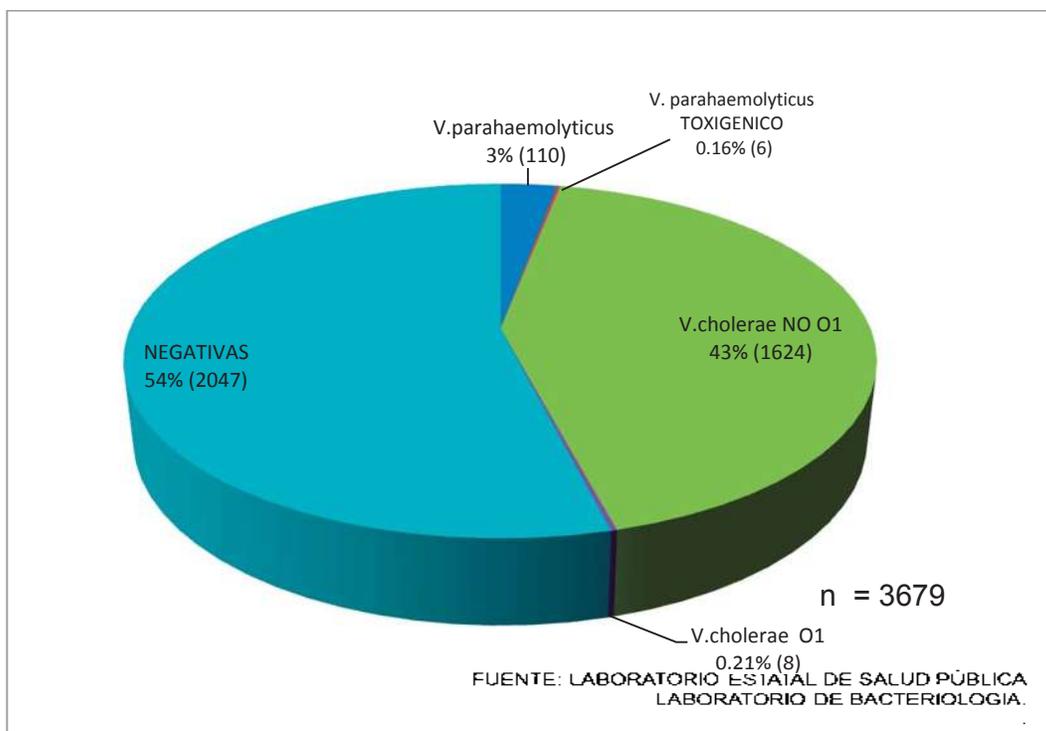
Gráfica 5. AISLAMIENTOS DE *Vibrio parahaemolyticus* TOXIGÉNICO EN EL BROTE DE 2010 POR INTOXICACIÓN ALIMENTARIA.



### MUESTRAS DE ALIMENTOS

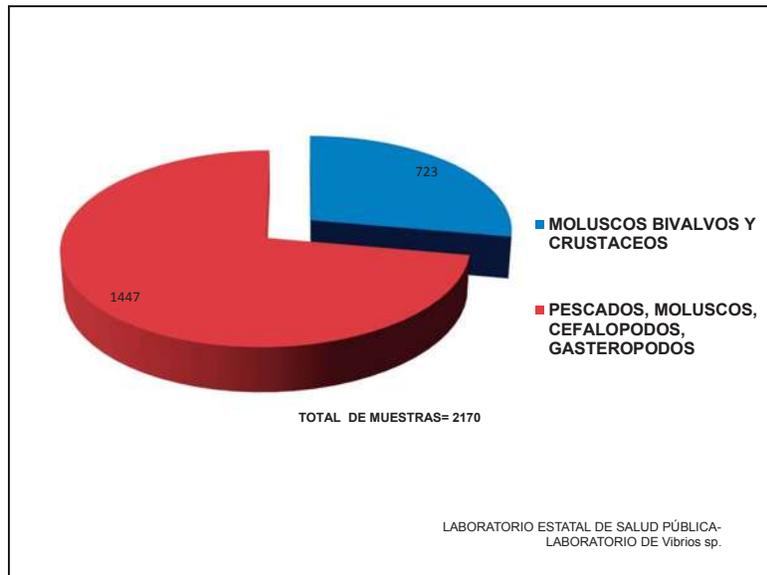
De las 3679 muestras de alimentos analizadas, 2047 fueron negativas (54%), se aisló 8 (0.21%) *Vibrio cholerae* O1 No Toxigénico, 1624 (43%) *Vibrio cholerae* NO O1, 110 (3%) *Vibrio parahaemolyticus* No Toxigénico y 6 (0.16%) *Vibrio parahaemolyticus* Toxigénico como se muestra en la figura 5.

Gráfica 5. PRINCIPALES AISLAMIENTOS DE VIBRIOS EN MUESTRAS DE PESCADOS Y MARISCOS 2009-2010



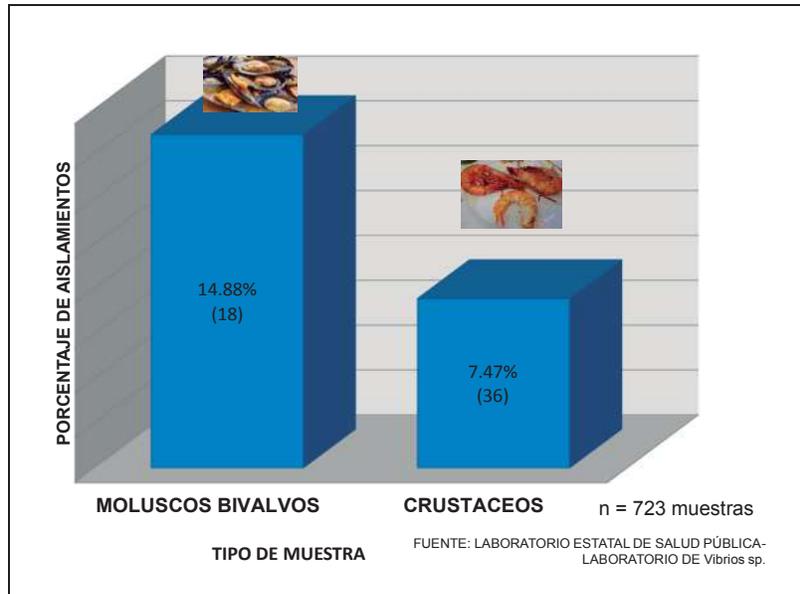
A partir de 2009 un porcentaje de alimentos (723 muestras) que llegaron al Laboratorio de Vibrios sp. se analizaron para búsqueda de *Vibrio parahaemolyticus*, de ellos fueron moluscos bivalvos y crustáceos, como se muestra en la gráfica 6.

Gráfica 6. TIPO DE MUESTRAS RECIBIDAS 2009.



Un total de 723 muestras recibidas de tipo moluscos bivalvos y crustáceos, se analizaron por el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-242-SSA1-2005 por la técnica del NÚMERO MAS PROBABLE durante el 2009. Mientras que el resto de alimentos se trabajo según la Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA1-1993- PRODUCTOS DE LA PESCA, MOLUSCOS BIVALVOS FRESCOS, REFRIGERADOS Y CONGELADOS.

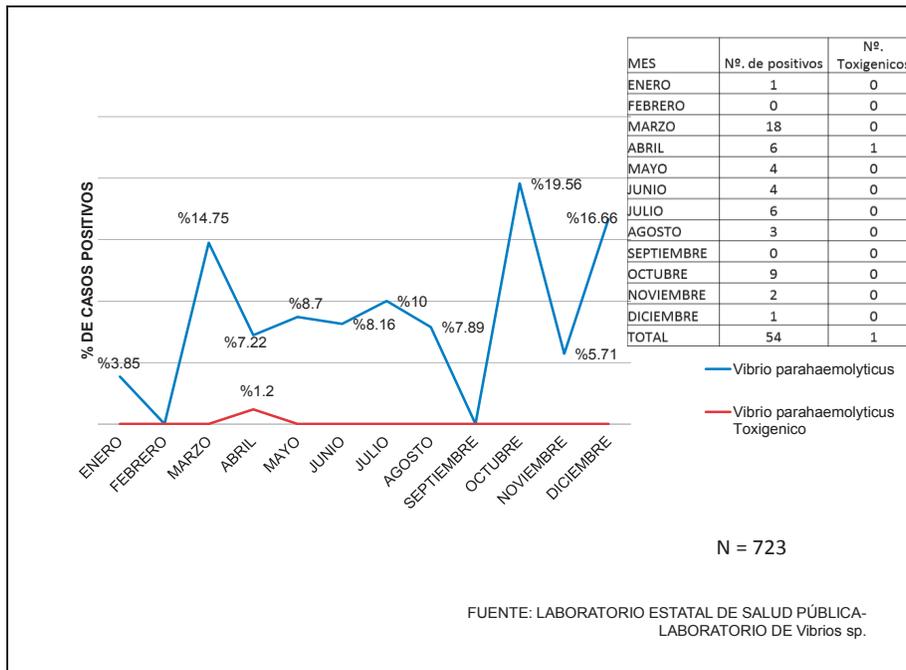
Gráfica 7. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS POSITIVOS DE *Vibrio parahaemolyticus* 2009.



Durante el 2009 el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* fue a partir de Moluscos Bivalvos en mayor porcentaje, a pesar que se muestrea en las jurisdicciones mayormente Crustáceos. (Gráfica 7)

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

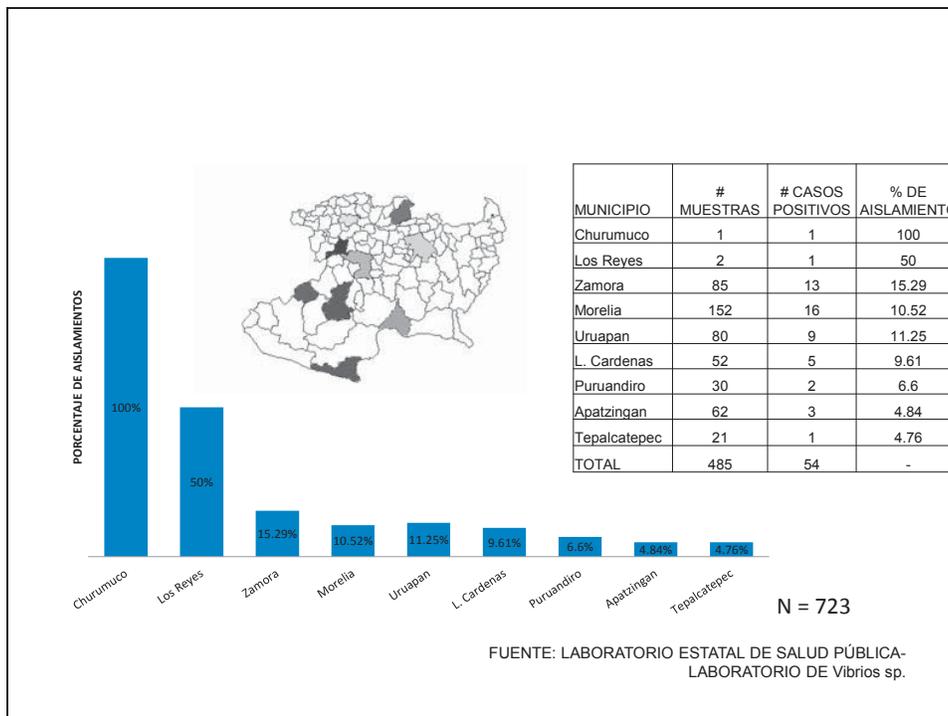
Gráfica 8. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS DE *Vibrio parahaemolyticus* 2009.



En esta gráfica se muestra la tendencia del aislamiento por mes, observándose mayor porcentaje 14.75% en el mes de Marzo (Gráfica 8) época cálida, mientras que el *Vibrio* toxigénico aparece también en el mes de Abril con un 1.2% de aislamiento.

Se observa un aumento en el mes de octubre 19.56%, que no se relaciona con la temperatura óptima de este microorganismo.

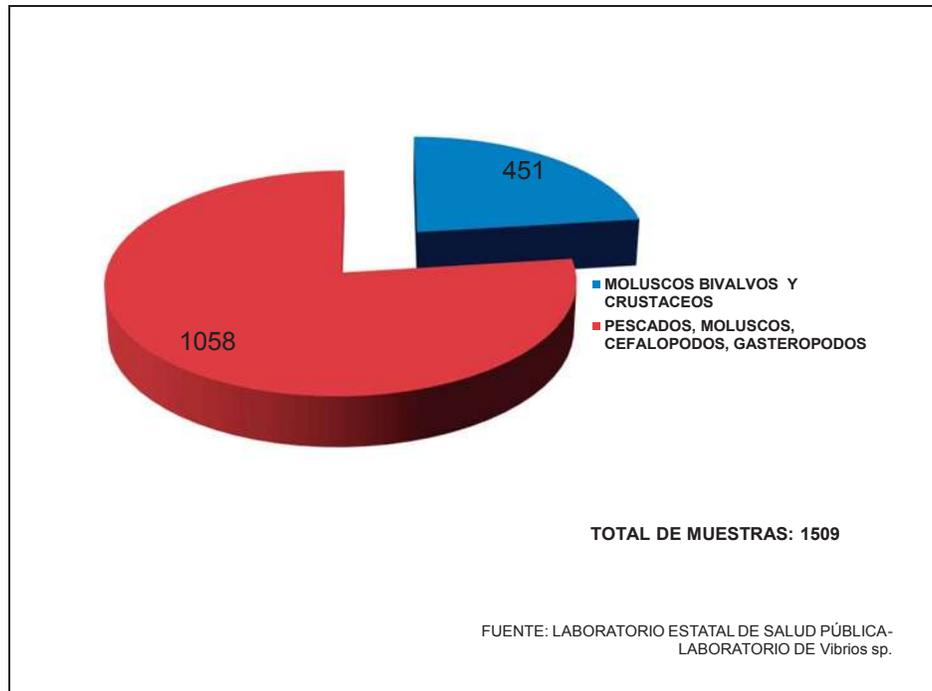
Gráfica 9. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS POSITIVOS DE *Vibrio parahaemolyticus* POR MUNICIPIO 2009.



En la gráfica 9 se muestran los Municipios donde existe mayor aislamiento positivo de *Vibrio parahaemolyticus*, municipios como Churumuco y Los Reyes, tienen el 100% por que están en relación al número de muestra que se procesaron en el Laboratorio.

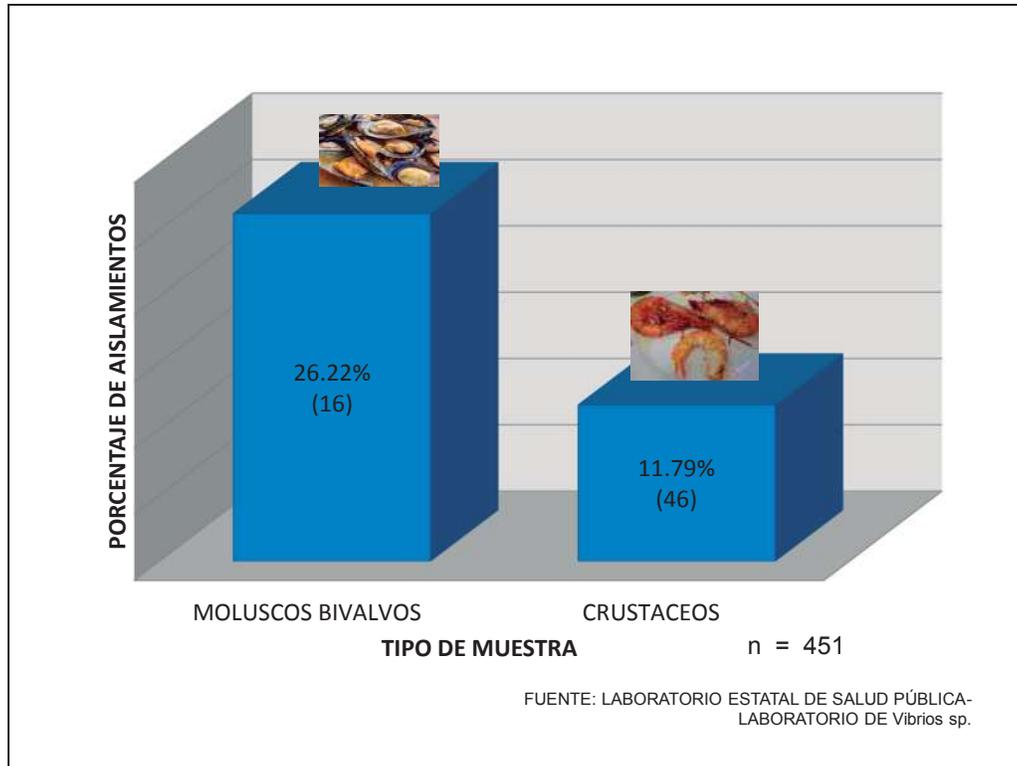
Encontramos a Zamora, Morelia y Uruapan con un mayor aislamiento en relación con las muestras que se analizaron.

Gráfica 10. TIPO DE MUESTRAS RECIBIDAS 2010 (ENE-JUL).



Para 2010 los datos se obtuvieron hasta Julio, donde llegaron un total de 451 muestras entre Moluscos Bivalvos y Crustáceos para la búsqueda de *Vibrio parahaemolyticus*.

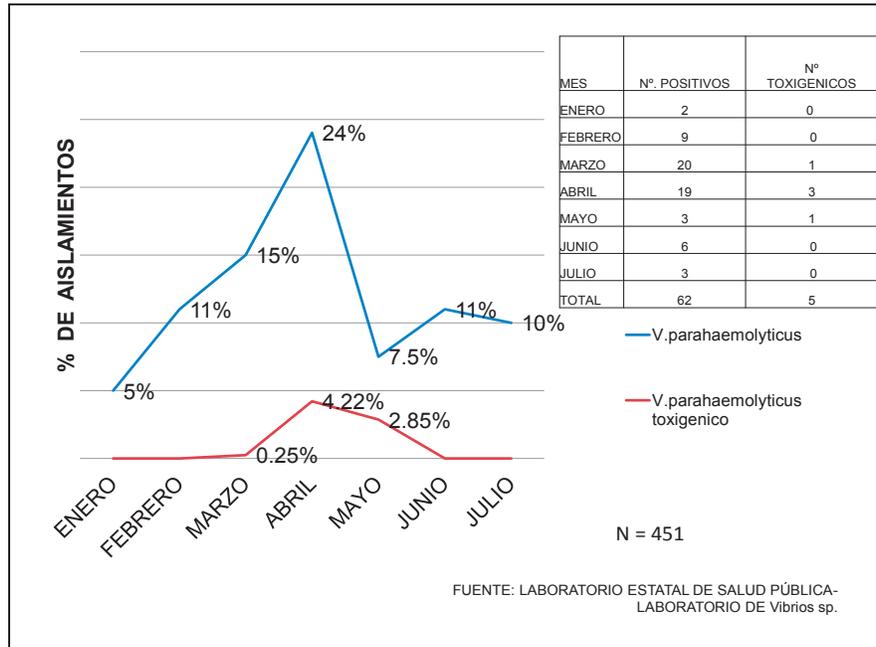
Gráfica 11. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS POSITIVOS DE *Vibrio parahaemolyticus* 2010.



Para 2010 sigue el aumento del porcentaje de aislamiento en Moluscos Bivalvos con un 26.22 % (16). Aunque el grupo de crustáceos son los que mayor se muestrean, con un 11.79% representando 46 muestras (Gráfica 11).

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

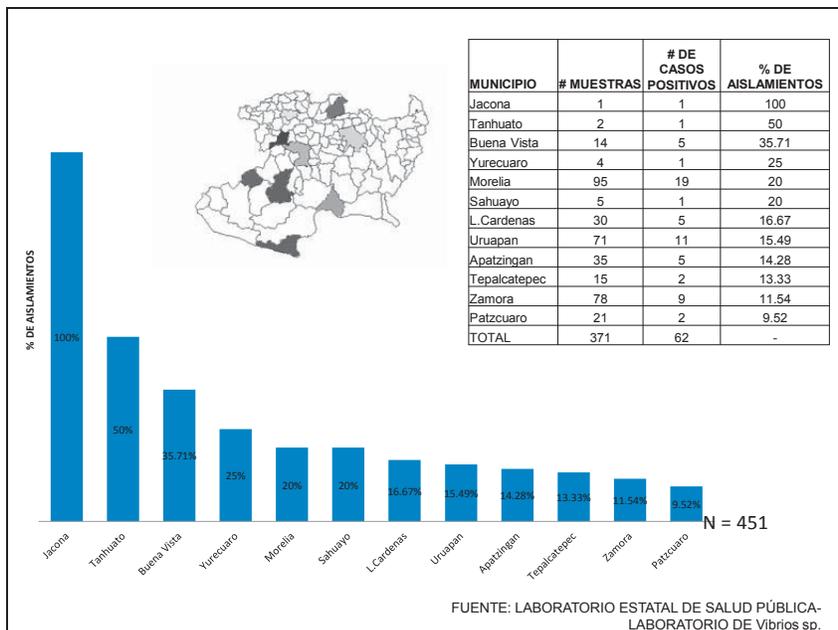
Gráfica 12. PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS POSITIVOS DE *Vibrio parahaemolyticus* 2010.



En la gráfica 12 se muestra que para 2010 el aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* aumentó para los primeros seis meses del año a comparación del 2009, y el *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico aumenta el aislamiento en los mismos meses.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

Gráfica 13. PORCENTAJE DE CASOS POR MUNICIPIO 2010 (ENE-JUL).

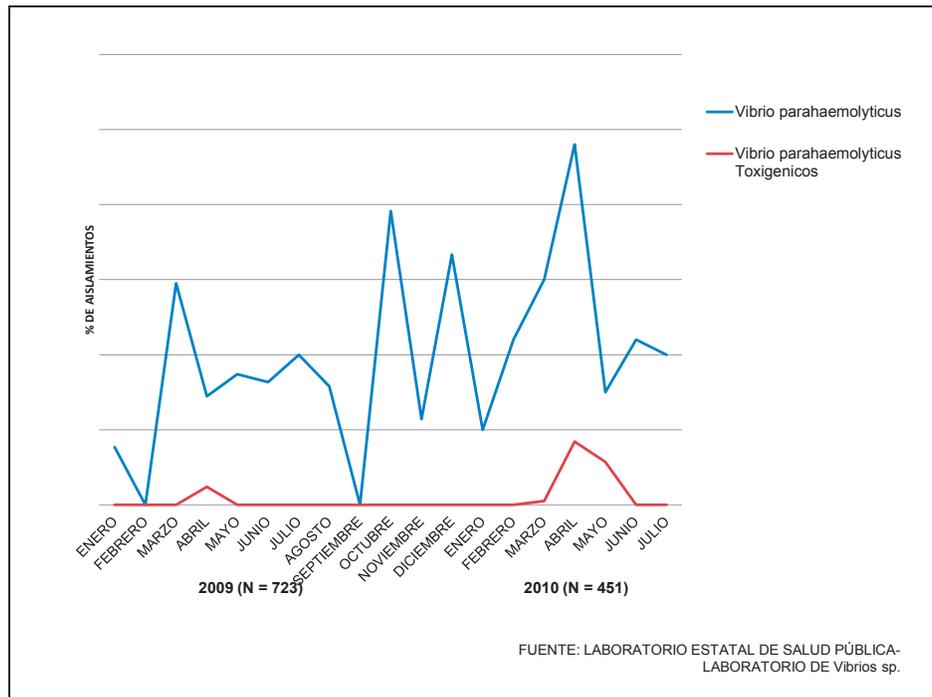


En la gráfica 13 se observa los Municipios donde existe mayor aislamiento positivo de *Vibrio parahaemolyticus*, municipios como Jacona y Tanhuato, tienen porcentajes elevados por que están en relación al número de muestra que se proceso en el Laboratorio.

Encontramos a Buenavista, Morelia y Yurécuaro con un mayor aislamiento en relación con las muestras que se analizaron.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

Gráfica 14. COMPORTAMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus* DURANTE 2009-2010 A PARTIR DE ALIMENTOS.



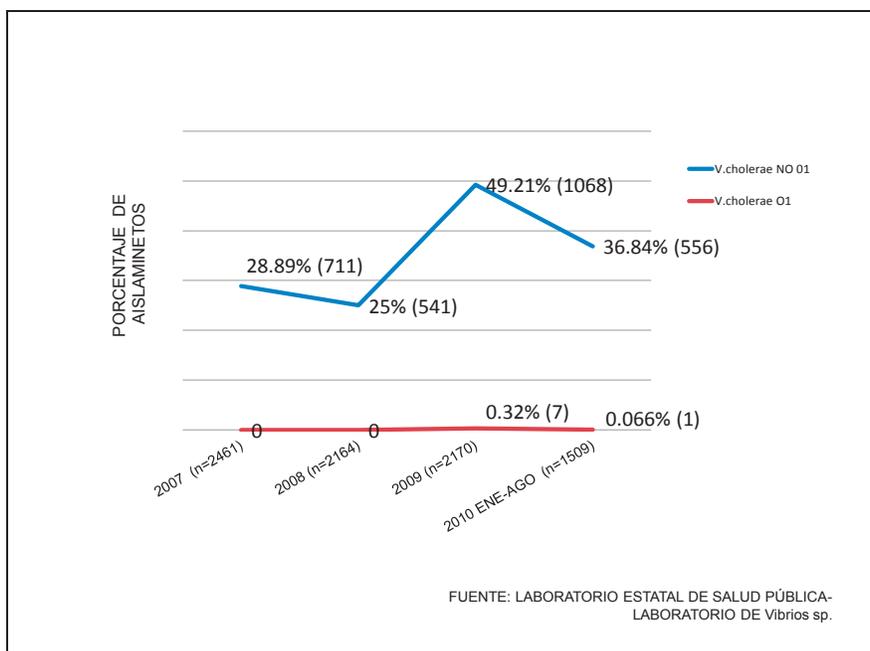
En la gráfica 14 se presenta el comportamiento del *Vibrio parahaemolyticus* durante los diferentes meses del año durante 2009 y 2010. Donde se observa el aumento significativo de un año a otro, así como de gran importancia *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico en los primeros meses del año.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

---

En la gráfica 15 la tendencia de la vigilancia de *Vibrio cholerae* NO O1 a partir de muestras de alimentos, lo que se observa es un aumento de porcentajes de aislamiento, para en el 2009 llegar a un 49.21% (1068) siendo el más alto también para *Vibrio cholerae* O1 con un 0.32%.

Gráfica 15. TENDENCIA DE LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE *Vibrio cholerae* EN ALIMENTOS DEL 2007 AL 2010



La vigilancia de *Vibrio cholerae* NO O1 en alimentos muestra un mayor porcentaje de aislamientos a partir del 2007 a 2010 en tres principales grupos de alimentos de origen marino, Pescados, Moluscos Bivalvos y Crustáceos, datos en comparación con *Vibrio parahaemolyticus* en donde los principales aislamientos se dan también en Moluscos Bivalvos y Crustáceos pero en menor porcentaje.

## **X. DISCUSIÓN**

De acuerdo a los datos que obtuvimos durante la investigación en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, en el periodo 2000 a 2010, se observó que *Vibrio cholerae* NO O1 se presenta en forma de casos aislados y que *Vibrio parahaemolyticus* tanto en casos aislados como brotes, durante el programa de vigilancia de cólera en nuestro estado por lo que es motivo de seguir con la vigilancia principalmente para estos dos agentes etiológicos.

Durante la vigilancia epidemiológica de Cólera en Michoacán entre 2000 y 2010 se logro identificar y aislar *Vibrio cholerae* NO O1 en 0.18% (12 casos) que se relaciona con el porcentaje de aislamientos en un estudio realizado durante el período 2003-2005, donde se investigó la presencia de *Vibrio cholerae* en la materia fecal de niños con diarrea atendidos en el Hospital del Niño Jesús, Tucumán, Buenos Aires, Argentina. Donde se recuperaron 34 aislamientos de *Vibrio cholerae* no-O1, no-O139 representando el 0.23 %. Por lo tanto destacar la importancia de reactivar la vigilancia de *Vibrio cholerae*, tanto en casos clínicos como en los reservorios acuáticos, para detectar oportunamente la aparición de cepas con potencial patogénico, ya sea del serogrupo O1 o de otros serogrupos.

En el brote de *Vibrio parahaemolyticus* en Lázaro Cárdenas, Michoacán, donde se presentaron la mayoría de los casos de esta investigación, se observa que los casos no muestran tendencia con el sexo de los afectados, como lo mencionan en el Manual para la Vigilancia epidemiológica del Cólera en México en 2001, donde los varones suelen constituir los primeros casos ya que están más expuestos a los diversos factores de riesgo (consumo de agua de río, consumo de alimentos callejeros). Las mujeres enferman en segundo lugar y al ser manejadoras de alimentos se constituyen en fuentes de infección para el resto de los miembros de la familia. Los niños alimentados al seno materno son más resistentes a enfermar y a sufrir cuadros diarreicos graves.

Hay muchas cepas de *Vibrio parahaemolyticus*, pero sólo aquellos que producen una hemolisina directa termoestable (TDH) y/o la hemolisina relacionada con la TDH (TRH) tienen la capacidad de causar la gastroenteritis, y casi todas las cepas aisladas de muestras clínicas tienen uno o ambos genes (tdh y trh) que codifican la hemolisinas respectivas, es el caso de los aislados de *Vibrio parahaemolyticus* en el brote de Lázaro Cárdenas en el 2010 lo cual se relaciona estrechamente con lo mencionado por Nishibuchi y colaboradores en 1992 donde menciona; solo los productores de la toxina causan gastroenteritis. Por lo tanto la vigilancia constituye todos aquellos *Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos a partir de casos clínicos con sintomatología que incluyen gastroenteritis con náuseas, diarrea, vómitos, calambres abdominales, poca fiebre y escalofríos y, en raras ocasiones,

diarrea con sangre. La enfermedad es leve y autolimitada, pero puede ser mortales especialmente en pacientes inmunocomprometidos, por ello la importancia de la vigilancia epidemiológica.

Después de múltiples brotes de *Vibrio parahaemolyticus* en Estados Unidos, se regula la entrada de alimento de origen marino exportado por México, la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura, fue la encargada por medio de los Laboratorios Estatales de Salud Pública de realizar la vigilancia sanitaria de alimentos de origen marino.<sup>(15)</sup>

En el estudio realizado en el estado de Michoacán, las muestras de alimentos se obtuvieron a partir del 2007 por lo que se observó que *Vibrio cholerae* NO O1 es el principal agente etiológico aislado de muestras de alimentos de origen marino y en bajo porcentaje de 0.21 % (8 casos) *Vibrio cholerae* O1 no toxigenico. Mientras que *Vibrio parahaemolyticus* se obtuvo una recuperación a partir del 2008 por implementarse recientemente la técnica de aislamiento, representando en el año 2009 un 7.47% (54) de aislamiento positivo mientras que en los primeros seis meses del año 2010 el porcentaje de aislamiento fue de un 13.75% (62).

*Vibrio parahaemolyticus* toxigénico a partir de muestras de alimentos, tuvo en el año 2009 un 0.13% de aislamientos y durante Enero a Julio del 2010 aumento a 1.10% de aislamientos toxigénicos, lo que concuerda con Cabrera-García, en un estudio realizado en el Golfo de México, en el que menciona que alrededor del 90% de las cepas aisladas de casos clínicos son toxigénicas y sólo del 1 al 2 % de cepas aisladas del medio ambiente corresponden a cepas toxigénicas.<sup>(111)</sup> Lo que también se relaciona con las cepas clínicas las cuales todas fueron toxigénicas.

No se encontraron datos de otros casos en Michoacán de *Vibrio parahaemolyticus*, sólo en Lázaro Cárdenas en el año 2010, este fue el causante de intoxicación a un grupo de personas que consumieron alimentos de origen marino, por lo cual se analizaron los alimentos de dicho establecimiento, los cuales se les aisló la bacteria, pero no el *Vibrio* Toxigénico. Vale la pena mencionar que los alimentos analizados no se tiene la seguridad de que hayan sido los que se consumieron en fecha de la intoxicación. Este brote puso en evidencia a esta bacteria como posible potencial epidémico en el Estado de Michoacán como los son los estudios realizados por Cabanillas-Beltrán en el 2006 donde Durante el año 2003 y fines de septiembre de 2004, más de 1230 casos de gastroenteritis se registraron en el sur del Estado de Sinaloa atribuidos al consumo de camarones crudos o poco cocidos donde se identificó *Vibrio parahaemolyticus*. El cual se identificó por métodos bioquímicos estándar, y muchas cepas fueron positivas productoras de toxina y un representante de la cepa perteneciente al serogrupo O3: K6. Este fue el

primer brote de la gastroenteritis causada por las cepas pandémicas de O3: K6 de *Vibrio parahaemolyticus* en nuestro país.

En México la cultura de consumo de alimentos de origen marino, es diferente a otros países, en donde estos alimentos en su mayoría se consumen crudos, en México solo los crustáceos como el camarón, y los moluscos bivalvos como las almejas, se consumen crudos. Por lo cual la identificación abarco todos aquellos Crustáceos y Moluscos Bivalvos a analizar.

Para el 2009 y en Enero a Julio de 2010 hubo mayor aislamiento en Moluscos Bivalvos, eso refiere un mayor número de muestreos de éstos, ya que pocas jurisdicciones muestrean al igual Crustáceos y Moluscos Bivalvos. Se recomienda la ampliación de muestreo de Moluscos Bivalvos en municipios como Los Reyes y Churumuco, en los cuales se debe de observar que aun que solo se muestreo un alimento, éste fue positivo.

Los aislamientos de *Vibrio parahaemolyticus* muestran un aumento en época cálida y se observa también un incremento en otoño, demostrando su potencial para resistir otras temperaturas.

Los municipios de mayor porcentaje de aislamientos no se relacionan con el número de muestras analizadas de esa jurisdicción, habría que tener mayor vigilancia a esos municipios, ya que de pocas muestras se aislaron cepas positivas, en cambio en municipios como Morelia, Zamora, Uruapan y Buena Vista hubo un mayor aislamiento en relación con el número de muestras totales recibidas.

Otras investigaciones en México se han dedicado a la búsqueda de la tipificación de las cepas aisladas, por lo que han encontrado que el porcentaje de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* con toxinas son más frecuentes, no solo en muestras clínicas sino en las ambientales, las cuales pueden ser potencialmente patógenas para el humano por lo que se esperaría un aumento en los casos de gastroenteritis, y de acuerdo a la combinación de genes del grupo pandémico y que el serotipo identificado mayormente fue O3:K6, al que se atribuye como el responsable de los brotes en México del 2004 y los casos esporádicos tanto en el 2006 y el 2008, también se encontraron otros serogrupos con combinación de genes pandémicos así como que se presentan periódicamente los casos, por lo que es muy importante estudiar las variaciones de esta bacteria para evitar nuevos brotes futuros y poder llevar a cabo mejores medidas de prevención en México.<sup>(67)</sup>

Las infecciones intestinales ocupan las primeras causas de enfermedad en México para principios de 2011 según el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades de la Secretaría de Salud. Y aunado a fenómenos ambientales pueden aumentar los factores de su

prevalencia, como es el caso de Chile y Perú que a partir del fenómeno ambiental El Niño en 1997 se han conocido múltiples casos y brotes de gastroenteritis por *Vibrio parahaemolyticus*, las cuales son evidencias que demuestran el papel trascendental que el clima y las condiciones ambientales cumplen en la dispersión de epidemias causadas por *Vibrio*.

## **XI. CONCLUSIÓN**

Dentro de la vigilancia epidemiológica se presentó un brote de alimentos donde se aisló *Vibrio parahaemolyticus* en muestras clínicas de los cuales todos fueron toxigénicos. Y en los alimentos involucrados *Vibrio parahaemolyticus* no fue toxigénico, sin embargo se tiene una recuperación de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico con un 0.16% de aislamiento durante nuestra investigación, con el cual se hace el cerco sanitario actualmente en México, para evitar la presencia del microorganismo.

La presencia de *Vibrio parahaemolyticus* se localiza en época cálida. No muestra ninguna tendencia significativa por edad o sexo en la población afectada.

En México la forma de consumo de alimentos de origen marino presentaría un riesgo en aquellos que se consumen crudos o parcialmente cocidos, por ello la necesidad de mantener la vigilancia sanitaria en el Estado así como informar a la sociedad de las medidas de prevención.

Es necesario seguir con la vigilancia epidemiológicas para evitar la presencias de algún caso de *Vibrio cholerae* en el estado.

## **SUGERENCIAS**

Se recomienda hacer más amplios los muestreos sobre todo en aquellos municipios donde la única muestra tomada fue positiva.

En los muestreos a los establecimientos, indispensable que mencionen lugar de procedencia de los alimentos donde se surten los de origen marino.

Es necesario tomar las medidas precautorias sobre buenas prácticas de higiene así como un buen proceso de transporte, almacenamiento, y evitar la contaminación en la preparación de dicho alimento.

Ampliar la investigación de los serogrupos de cepas pandémicas de *Vibrio parahaemolyticus* tanto de aislados de muestras clínicas como de muestras de alimentos.

## XII. GLOSARIO

**Acuicultura:** Es el método mediante el cual se cultivan moluscos bivalvos en entornos de agua salada naturales o artificiales, desde la semilla hasta la talla comercial.

**Agar Wagatsuma:** Medio de cultivo adicionado con eritrocitos humanos para la observación de la hemólisis provocada por *Vibrio parahaemolyticus*.

### **Manual Analítico Bacteriológico**

**Wagatsuma Agar** contiene:

Extracto de levadura	3 g
Peptona	10 g
NaCl	70 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5 g
Manitol	10 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 litro
Humano o de conejo glóbulos rojos, fresca (24 h), con anticoagulante	50 ml

Mezclar fresco (a menos de 24 h de dibujo) sangre humana o de conejo con un volumen igual o mayor de solución salina fisiológica. Centrifugar las células a aproximadamente 4000 x g a 4 ° C durante 15 min. Vierta solución salina y se lava 2 veces más. Después del lavado tercero, se vierte células de solución salina y volver a suspender al volumen original con solución salina.

Suspender los ingredientes, excepto la sangre, en agua destilada y hervir para disolver el agar. Ajustar el pH a 8,0 ± 0,2. De vapor de 30 minutos. NO AUTOCLAVE. Enfriar a 45-50 ° C. Añadir 50 ml de glóbulos rojos lavados al medio de refrigeración. Mezclar y verter en placas de Petri estériles. Placas secas a fondo y utilizar rápidamente. Medio puede hacerse en volúmenes más pequeños (que requiere menos sangre) cuando las placas son necesarios unos pocos. Fuente de hi pertexto: Manual Analítico Bacteriológico, 8<sup>a</sup> Edición, Revisión A, 1998.

**β- hemólisis:** Tipo de hemólisis que se observa como un halo claro alrededor de las colonias debido a la destrucción total de eritrocitos en el medio de cultivo.

**Brote:** Son dos o más casos de ETA, en los cuales se cuenta con evidencia de una relación epidemiológica que muestra que tienen un origen común.

**Catalasa:** Enzima (catalizador biológico) que se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromo (componente de la cadena respiratoria).

**Cepa:** Conjunto de microorganismos con las mismas características genotípicas y fenotípicas.

**Colonización:** Es la capacidad de llegar al huésped por una puerta de entrada (piel o mucosas), forzar o establecer una colonia y resistir la acción de los sistemas locales de defensa.

**Contaminación cruzada:** Contaminación adquirida por causas ajenas a las que se relacionan con su hábitat natural, por ejemplo por manipuladores o contacto con superficies de trabajo contaminadas.

**Contenido G + C:** Contenido de las bases guanina y citosina en el material genético de la bacteria.

**Coprocultivo:** Es un estudio ordenado por el médico, se analiza el excremento cuando se sospecha de infección bacteriana.

**Crustáceo:** Artrópodo de respiración branquial, y cuerpo revestido de una capa quitinosa de gran espesor y aspecto de costra.

**Dosis infectiva:** Es la cantidad de microorganismos necesaria para provocar infección. La dosis infectiva puede variar según el agente biológico, la vía de entrada y la resistencia del huésped, es decir, el grado de integridad de sus sistemas defensivos.

**Enteropatógeno:** Causa enfermedad en el tracto digestivo.

**Eritrocitos:** Los eritrocitos o glóbulos rojos son las células sanguíneas que contienen en su interior la hemoglobina. Los glóbulos rojos son los principales portadores de oxígeno a las células y tejidos del cuerpo.

**Estuario:** Entrada de mar en la desembocadura de un río.

**Etiológico:** Agente causante de la enfermedad.

**Factores de adherencia:** Es el factor más importante en el momento de la colonización. Se lleva a cabo mediante la utilización de adhesinas (sustancias que permiten la adhesión) que interactúan con los receptores superficiales de la célula huésped.

**Fenómeno de Kan agawa:** Fenómeno que presentan las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* que poseen la TDH (hemolisina directa termoestable) y que se observa como una β-hemólisis en agar Wagatsuma.

**Fermentativo:** Tipo de metabolismo que degrada anaeróbicamente compuestos orgánicos.

**Flagelo:** Estructura bacteriana encargada de proporcionar movimiento.

**Gastroenteritis:** La gastroenteritis es una enfermedad que afecta al estómago e intestinos. Los síntomas pueden inducir vómito, diarrea, dolores en el estómago, dolor de cabeza, y fiebre.

**Halofílico:** Los microorganismos que requieren concentraciones mínimas de sal u otros cationes y aniones.

**Hemaglutinina:** Sustancia que tiene la habilidad de que los glóbulos rojos se peguen unos a otros.

**Hemolisina:** Toxina capaz de romper eritrocitos.

**Hemolítica:** Cepa capaz de generar la desintegración o disolución de los eritrocitos con liberación de hemoglobina.

**Manitol, arabinosa, manosa, sacarosa, lactosa, inositol, ramnosa:** Carbohidratos (azúcares).

**Medio de cultivo selectivo y diferencial:** Medio de cultivo capaz de permitir el crecimiento de una población microbiana evitando el desarrollo de otras, además de ser capaz de proporcionar marcadores que nos proporcionen una característica como la utilización o no de un sustrato.

**Metabolismo oxidativo:** Metabolismo llevado a cabo en condiciones aerobias.

**Molusco:** Animal invertebrado de simetría bilateral, de cuerpo blando no segmentado y protegido casi siempre por una concha caliza.

**Necrosis:** Muerte celular patológica (a causa de enfermedades).

**Patogénesis:** Factores y mecanismos que favorecen el desarrollo de la enfermedad.

**Periodo de incubación:** Periodo de multiplicación de los microorganismos.

**Pili:** Estructura bacteriana que da motilidad.

**Reservorio:** Cualquier animal vivo que proporcione subsistencia y alojamiento a cualquier agente infeccioso que no le causa daño.

**Septicemia:** La septicemia es la presencia de bacterias en la sangre y suele estar asociada con una enfermedad grave.

**TDH:** Hemolisina directa termoestable (estable a temperaturas altas).

**TRH:** Hemolisina relacionada a la TDH.

**Yodóforo:** Sustancia que libera yodo progresivamente.

### **XIII. ABREVIATURAS**

- CTXØ** Bacteriófago filamentosos que en su genoma tiene los genes para la toxina del cólera
- CT** Toxina del Cólera (por sus siglas en inglés cholera toxin)
- COFEPRIS** Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios
- ETA** Enfermedad transmitida por alimentos
- FAO** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (por sus siglas en inglés Food and Agriculture Organization of the United Nations)
- NMP** Número Más Probable
- OMS** Organización Mundial de la Salud
- PCR** Reacción en cadena de la polimerasa
- Pb** pares de bases
- UFC** Unidad formadora de colonia
- VPI** Isla de patogenicidad de Vibrio

#### **XIV. APENDICE**

### **AISLAMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus* A PARTIR DE MUESTRAS CLINICAS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Tecnica según el LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA “EVA SAMANO DE LOPEZ MATEOS”

#### **EQUIPO Y MATERIAL**

Incubadora 35 °C  
Refrigerador 6 °C  
Incinerador  
Pipetas  
Gradillas  
Tubos  
Cajas petri

#### **MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUIMICAS**

Agar con Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa (TCBS)  
Agar de hierro y triple azúcar (TSI)  
Agar de hierro y lisina (LIA)  
Movilidad-Indol-Ornitina (MIO)  
CALDO ARGININA  
CALDO UREA  
CALDO PEPTONADO

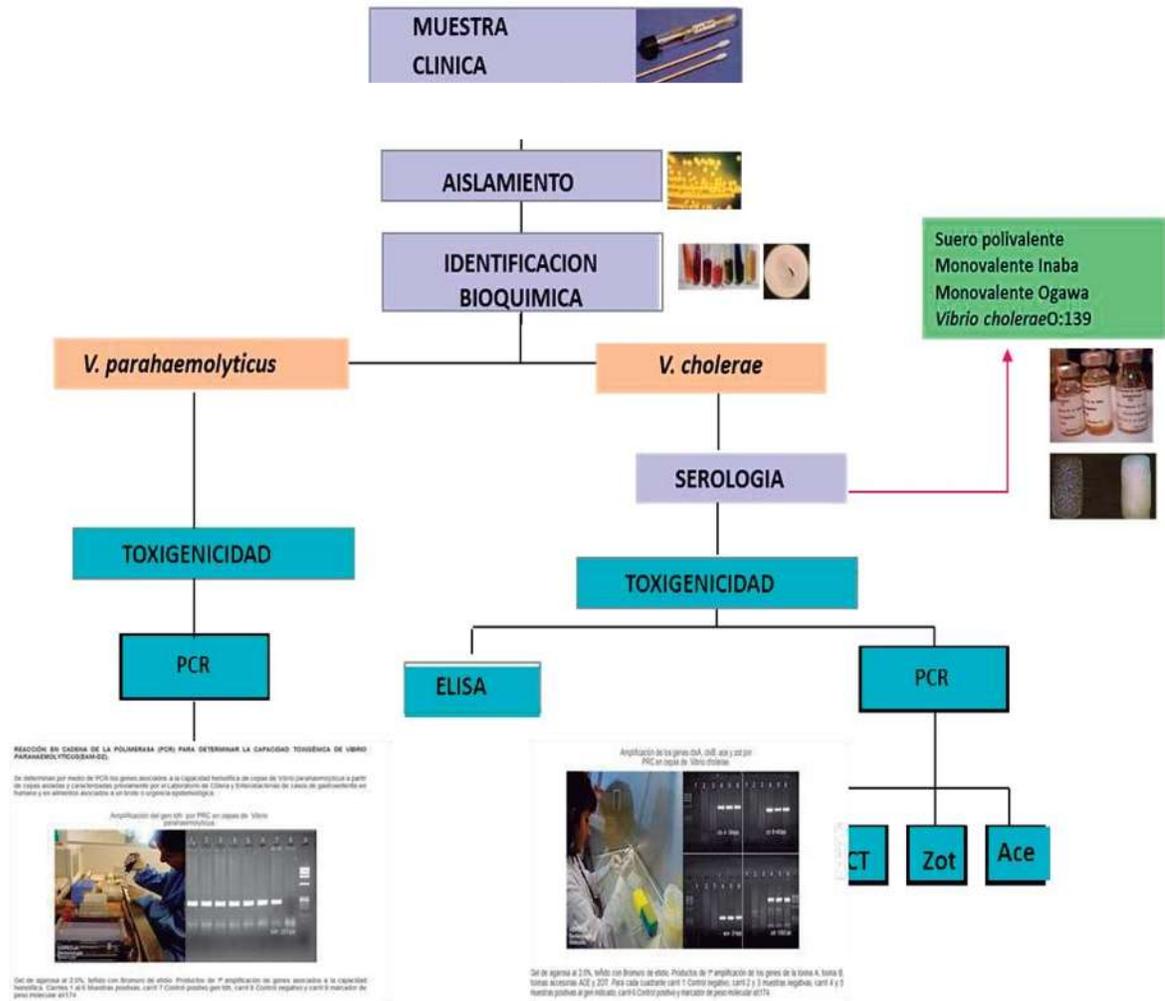
REACTIVOS DE KOVAC O DE EHRLICH.

## METODO

1. -La muestra en Hisopo Rectal o muestra de materia fecal, se incuba en APA (agua peptonada alcalina) a pH 9 por 6-8 horas a 35-37 °C.
2. -Se siembra en TCBS por 24 horas a 37 °C.
3. -Se pican colonias sospechosas y se siembran en pruebas bioquímicas  
TSI: K/A  
LIA: A/A  
CITRATO: (-)  
MALONATO: (-)  
UREA: VARIABLE  
MIO:(+)(+)(+)  
ARGININA: (-)
4. -A partir de LIA se realiza la prueba de oxidasa: POSITIVA.
5. -Se realizan pruebas con sueros poli valentes contra *Vibrio cholerae* NO O1.
6. -Posteriormente se realizan pruebas con sueros monovalentes Ogawa e Inaba.
7. -Las colonias que crecen en TCBS sacarosa negativas, se siembran en diferentes concentraciones de sales, al 0%, 1%, 3%, 6%, 8%, 10% y 12% de NaCl, para Vibrios halofílicos.
8. -Las cepas identificadas como *Vibrio parahaemolyticus* se enviaron al Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE) para control y determinación de toxina por PCR.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

FIGURA 6 .FLUJOGRAMA PARA *Vibrio parahaemolyticus* A PARTIR DE MUESTRAS HUMANAS



PRUEBAS BIOQUIMICAS



**FIGURA 7. FUENTE: LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DEL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA “EVA SAMANO DE LOPEZ MATEOS”.**

## **AISLAMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus* A PARTIR DE ALIMENTOS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Técnicas y procedimientos de identificación según lo establecido en el Manual de procedimientos del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

### **EQUIPO Y MATERIAL**

Homogenizador peristáltico (Stomacher)  
Incubadora 35 °C  
Refrigerador 6 °C  
Incinerador  
Balanza  
Cuchillos y cucharas estériles  
Pipetas  
Gradillas  
Tubos  
Cajas petri

### **MEDIOS DE CULTIVO Y PRUEBAS BIOQUIMICAS**

PBS (Solución fosfato salina)  
APA (Agua peptonada alcalina)  
TCBS (Agar con Tiosulfato, Citrato, Sales Biliares y Sacarosa)  
TSA (Agar Soya Tripticasa con 1 % de lactosa)  
TSI  
LIA  
MIO  
CALDO ARGININA  
CALDO UREA  
(TODAS LAS BIOQUIMICAS ESTAN ADICIONADAS CON 2% DE NaCl)

### **REACTIVOS**

Kovacs  
ONPG (O-nitrofenil-B-D-galactosidasa)  
Aceite mineral

Control de calidad interno: Manual de procedimientos administrativo del laboratorio de investigación en microbiología y parasitología.  
Manual de procedimientos del Laboratorio Estatal de Salud Pública.

Control de calidad externo: Confirmación de resultados y procedimientos por el (INDRE) Y la (CCAyAC).

## METODO

### MOLUSCOS BIVALVOS

1. -Desconchar los moluscos pesar 100g en una bolsa y agregar 100mL de PBS (solución fosfato salina) dilución 1:2. HOMOGENIZAR DURANTE 2 MIN EN STOMACHER.
2. -Tomar 20 g del homogenizado más 80 ml de PBS. (Dilución 1:10).
3. -Realizar las siguientes diluciones decimales con PBS 1:10, 1:100, 1:1000.
4. -Dichas diluciones se transfieren por triplicado c/una, con 1 ml de muestras y se incuban a 35° por 24 horas. En tubo de enriquecimiento con APA (agua peptonada alcalina de 10 ml).

### CAMARONES DESHIDRATADOS Y COCIDOS

1. -Pesar 50 g de la muestra y adicionar 450 ml de PBS. (Dilución 1:10)
2. -Realizar diluciones decimales con 90 ml de PBS: 1:10, 1:100, 1:1000.
3. -Transferir por triplicado c/una, con 1 ml de muestras y se incuban a 35° por 24 horas, en tubos de enriquecimiento con APA.
4. NOTA: cuando se encuentran cocidos los crustáceos la primer dilución decimal se hace con doble concentración de APA, por lo tanto se le colocan 20 ml de muestra.
  - A las 24 h y observar turbidez en las diferentes diluciones.
5. -Inocular cada una de las diluciones de APA en agar TCBS tomando una asada del cultivo a 1 cm de profundidad por debajo del nivel del medio.
6. -Incubar las cajas de agar TCBS 24 hrs./ 35°C.
7. -Para la confirmación de colonias características, realizar las siguientes pruebas, tamiz:
8. -Sembrar cada colonia a probar en agar soya tripticasa (TSA) con 1% de lactosa.
9. -Incubar a 35°C durante 24 h.
10. A partir de lo anterior:
  - Tripton 0, 6, 8 % incubar a 35° por 24 h.
11. -Realizar pruebas bioquímicas:
  - TSI: K/A
  - LIA: A/A
  - CALDO MALONATO: (-)
  - CALDO UREA: VARIABLE
  - MIO:(+)(+)(+)
  - CALDO ARGININA: (-). AGREGAR DOS GOTAS DE ACEITE MINERAL.
  - TODAS ADICIONADAS CON 2% DE NaCl.

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* CON POTENCIAL EPIDEMICO EN MUESTRAS HUMANAS Y EN ALIMENTOS EN EL ESTADO DE MICHOACÁN EN EL PERIODO 2000 AL 2010**

CALDO APA.

12.-PBA. ONPG: NEGATIVA.

13.-PBA OXIDASA: POSITIVA.

14.-Calcular la densidad microbiana con las tablas de NMP con 95% de límite de confianza:

**DETERMINACIÓN DEL NÚMERO MÁS PROBABLE**

<b>Valores de NMP por gramo y los Intervalos de Confianza al 95% para 3 tubos c/u con 0.1, 0.01 y 0.001 g de inóculo</b>											
<b>Tubos Posit.</b>			<b>NMP/g</b>	<b>Lim.conf.</b>		<b>Tubos Posit</b>			<b>NMP/g</b>	<b>Lim. conf.</b>	
<b>0.10</b>	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>		<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>	<b>0.10</b>	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>		<b>Bajo</b>	<b>Alto</b>
0	0	0	<3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4.1
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

FUENTE: Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en especies marinas de consumo en Lima Metropolitana y Cal lao. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Peru, 2008.

**AISLAMIENTO DE *Vibrio parahaemolyticus* A PARTIR DE ALIMENTOS**



**FIGURA 8. PESO DE MUESTRA. FUENTE: LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA, LABORATORIO DE *Vibrio* ssp.**



**FIGURA 9. ADICION DEL PBS (SOLUCION FOSFATO SALINA) Y HOMEGENIZADO POR 2 MINUTOS EN EL STOMACHER.  
FUENTE: LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA, LABORATORIO DE *Vibrio ssp.***



**FIGURA 10. DILUCIONES DEL HOMEGENIZADO PARA POSTERIOR SIEMBRA EN TCBS. FUENTE: LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA, LABORATORIO DE *Vibrio* ssp.**



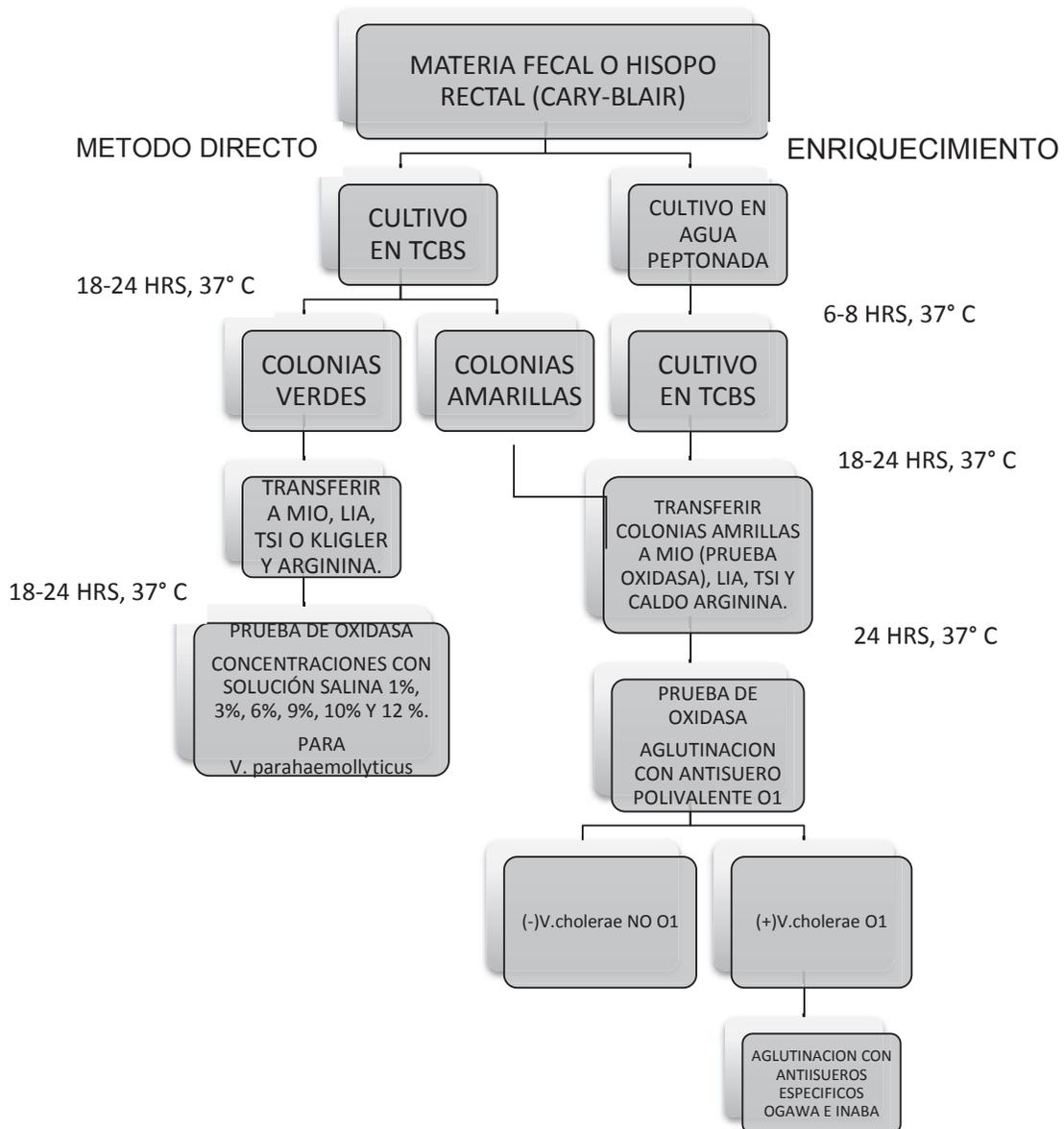
**FIGURA 11. AGAR TCBS CON COLONIAS SOSPECHOSAS DE *Vibrio parahaemolyticus*. FUENTE: LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA, LABORATORIO DE *Vibrio* ssp.**



**FIGURA 12. PRUEBAS BIOQUIMICAS POSITIVAS A *Vibrio parahaemolyticus*. FUENTE: LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA, LABORATORIO DE *Vibrio* ssp.**

**AISLAMIENTO DE *Vibrio cholerae* A PARTIR DE MUESTRAS CLINICAS<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Técnicas y procedimientos de identificación según lo establecido en el Manual de procedimientos para aislamiento y caracterización de *Vibrio cholerae* 01. SECRETARIA DE SALUD. SUBSECRETARIA DE ORGANIZACIÓN Y DESARROLLO. INSTITUTO NACIONAL DE DIAGNOSTICO Y REFERENCIA EPIDEMIOLOGICOS "DR. MANUEL MARTINEZ BAEZ". MEXICO, DF, 1991.



#### **XV. REFERENCIAS**

1. ABBOTT SL, POWERS C, KAYSNER C A, TAKEDA Y, ISHIBASHI M, JOSEPH SW, JANDA JM: EMERGENCE OF A RESTRICTED BIOSEROVAR OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AS THE PREDOMINANT CAUSE OF VIBRIO-ASSOCIATED GASTROENTERITIS ON THE WEST COAST OF THE UNITED STATES AND MEXICO. *J CLIN MICROBIOL* 1989, 27(12):2891-2893.
2. AKEDA, Y., NAGAYAMA K., YAMAMOTO K. AND HO NDA T. (1997). INVASIVE PHENOTYPE OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS. *J. INFECT. DIS.* 176: PP.824-855.
3. ANSARUZZAMAN, M., M. LUCAS, J. L. DEEN, N. A. BHUIYAN, A. SAFA, M. SULTANA, A. CHOWDHURY, G. B. NAIR, D. A. SACK, L. V. SEIDLEIN, C. L. CHAIGNAT, J. D. CLEMENS, AND A. BARRETO. 2005. PANDEMIC SEROVARS (O3:K6 AND O4:K68) OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ASSOCIATED WITH DIARRHEA IN MOZAMBIQUE: SPREAD OF THE PANDEMIC INTO THE AFRICAN CONTINENT. *J. CLIN. MICROBIOL.* 43:2559-2562.
4. BAROSS J, LISTON J: OCCURRENCE OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AND RELATED HEMOLYTIC VIBRIOS IN MARINE ENVIRONMENTS OF WASHINGTON STATE. *APPL MICROBIOL* 1970, 20(2):179-186.
5. BAUMANN, P., FURNISS, A.L. AND LEE, J.V. 1984. GENUS I. VIBRIO. IN *BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, VOL.1, PP. 518-538*. EDITED BY N. R. KREIG & J.G. HOLT. BALTIMORE: WILLIAMS & WILKINS.
6. BRAYTON PR, BODE RB, COLWELL RRET AL. *VIBRIO CINCINNATIENSIS* SP. NOV, A NEW HUMAN PATHOGEN. *J CLIN* 1986; 23:104-108.
7. BRAVO L, MONTE RJ, GÓMEZ M, PIMENTEL T, DUMAS S. IDENTIFICACION DE ESPECIES DE MICROORGANISMOS DEL GÉNERO *VIBRIO*. *REV CUBANA MED TROP* 1991 ABRIL-AGOSTO; 43(2):107-10.
8. BLAKE, P.A. (1994). HISTORICAL PERSPECTIVES ON PANDEMIC CHOLERA. IN *VIBRIO CHOLERAEE AND CHOLERA: MOLECULAR TO GLOBAL PERSPECTIVES*, PP. 293-295. EDITED BY I.K. WACHSMUTH. P.A. BLAKE AND O. OLSVIK. WASHINGTON, DC, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY.
9. BEJ AK, PATTERSON DP, BRASHER CW, VICKERY MC, JONES DD, KAYSNER CA. DETECTION OF TOTAL AND HEMOLYSIN-PRODUCING *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN SHELLFISH USING MULTIPLEX PCR AMPLIFICATION OF *TL*, *TDH* AND *TRH*. *J MICROBIOL METHODS.* 1999;36:215-25. DOI: 10.1016/S0167-7012(99)00037-8

10. BELIVER, P.; GARCIA, M Y PULIAN, M..GASTROENTERITIS AGUDA POR *VIBRIO CHOLERAE*.ENFERM. INFECC. MICROBIOL. CLIN, 1998. 16(7): 346.
11. BHUIYAN N A, ANSARUZZAMAN M, KAMRUZZAMAN M, ALAM K, CHOWDHURY N R, NISHIBUCHI M, ET AL. PREVALENCE OF THE PANDEMIC GENOTYPE OF *VIBRIOPARAHAEMOLYTICUS* IN DHAKA, BANGLADESH, AND SIGNIFICANCE OF ITS DISTRIBUTION ACROSS DIFFERENT SEROTYPES. J CLIN MICROBIOL 2002; 40: 284-6.
12. BHUIYAN, N. A., M. ANSARUZZAMAN, M. KAMRUZZAMAN, K. ALAM, N. R. CHOWDHURY, M. NISHIBUCHI, S. M. FARUQUE, D. A. SACK, Y. TAKEDA, AND G. B. NAIR. 2002. PREVALENCE OF THE PANDEMIC GENOTYPE OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN DHAKA, BANGLADESH. J. CLIN. MICROBIOL. 40:284–286.
13. BIK, E.M., BUNSCHOTEN, A.E., GOUW, R.D. AND M OLLI, F.R. (1995). GENESIS OF THE NOVEL EPIDEMIC *VIBRIO CHOLERAE* O139 STRAIN: EVIDENCE FOR HORIZONTAL TRANSFER OF GENES INVOLVED IN POLYSACCHARIDE SYNTHESIS. EMBO J. 14, 209-216.
14. BORBOLLA-SALA MANUEL, VIDAL-PEREZ MA. DEL ROSARIO, PIÑAGUTIERREZ OLGA. CONTAMINACION DE LOS ALIMENTOS POR *VIBRIO CHOLERAE*, COLIFORMES FECALES, *SALMONELLA*, HONGOS, LEVADURAS Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN TABASCO DURANTE 2003. SALUD EN TABASCO VOL. 10, NO. 1-2, ENERO-ABRIL, MAYO-AGOSTO, 2004.
15. BOYD E. FIDELMA, ANA LUISA V COHEN, LYNN M NAUGHTON, DAVID W USSERY, TIM T BINNEWIES, O COLIN STINE AND MICHELLE A PARENT. MOLECULAR ANALYSIS OF THE EMERGENCE OF PANDEMIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. BMC MICROBIOLOGY 2008, 8:110.
16. CABANILLAS-BELTRAN HECTOR, DRA. GARCIA-GASCA ALEJANDRA, DR. GÓMEZ GIL BRUNO. ESTUDIO DE UN BROTE DE GASTROENTERITIS EN EL SUR DEL ESTADO DE SINALOA, MEXICO 2004. CIAD, A.C. MAR-ABR DE 2005. VOL. 14, NO. 2.
17. CABELLO FC, ESPEJO RT, HERNANDEZ MC, RIOSECO ML, ULLOA J, VERGARA JA. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* O3:K6, EPIDEMIC DIARRHEA, CHILE, 2005. EMERG INFECT DIS. 2007; 13(4): 655-56.
18. CABRERA-RODRÍGUEZ LUIS, BRAVO-FARIÑAS, RAMÍREZ-ÁLVAREZ2, LLOP-HERNÁNDEZ ALINA, FERNÁNDEZ-ABREU ANABEL, MORIER LUIS, BORREGO-HERNÁNDEZ. SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS Y FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *VIBRIO CHOLERAE* NO-O1 AISLADAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA. REV BIOMED 2008; 19:138-144.

19. CHAKNABORTY, S.; NATR, G.; Y SHIMODA, S. PATHOGENIC VIBRIOS IN THE NATURAL AQUATIC ENVIRONMENT. REV. ENVIRON. HEALTH.1997; 12: 63-80.
20. COMISION FEDERAL PARA LA PROTECCION CONTRA RIESGOS SANITARIOS. EVALUACION DE RIESGO Y PLAN DE CONTROL DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EN MOLUSCOS BIVALVOS. JUNIO 2010. <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Documents/VpPlan.pdf>.
21. CHAKNABORTY, S.; NATR, G.; Y SHUMODA, S. PATHOGENIC VIBRIOS IN THE NATURAL AQUATIC ENVIRONMENT.REV. ENVIRON. HEALTH. 1997; 12:63-80.
22. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (US) CDC. OUTBREAK OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* INFECTION ASSOCIATED WITH EATING RAW OYSTERS AND CLAMS HARVESTED FROM LONG ISLAND SOUND- CONNECTICUT, NEW JERSEY AND NEW YORK, 1998. MORB. MORTAL. WKLY. REP.1999; 48(03):48-51.
23. CHOWDHURY N R, STINE O C, MORRIS J G, NAI R GB.ASSESSMENT OF EVOLUTION OF PANDEMIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BY MULTILOCUS SEQUENCING TYPING. J CLIN MICROBIOL 2004; 42: 1280-2.
24. CORDOVA JL, ASTORGA J, SILVA W, RIQUELME C. CHARACTERIZATION BY PCR OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES COLLECTED DURING THE 1997– 1998 CHILEAN OUTBREAK. BIOL RES. 2002;35:433–40.
25. DANIELS N. EVANS M., GRIFFIN P.2002.EMERGING INFECTIONS 4. ASM PRESS 25: 237-247.
26. DAVIS BR, FANNING GR, MADDEN JM ET AL. CHARACTERIZATION OF BIOCHEMICALLY ATYPICAL *VIBRIO CHOLERAE* STRAINS AND DESIGNATION OF A NEW PATHOGENIC SPECIES, *VIBRIO MIMICUS*. J CLIN 1981; 14:631-639.
27. DEEPANJALI, A., H. S. KUMAR, I. KARUNASAGAR, AND I. KARUNASAGAR.2005. SEASONAL VARIATION IN ABUNDANCE OF TOTAL AND PATHOGENIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* BACTERIA IN OYSTERS ALONG THE SOUTHWEST COAST OF INDIA. APPL. ENVI RON. MICROBIOL.71:3575–3580.
28. DEPAOLA, A., C.A. KAYSNER, J.C. BOWERS, AND D. W. COOK. 2000. ENVIRONMENTAL INVESTIGATIONS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN OYSTERS FOLLOWING OUTBREAKS IN WASHINGTON, TEXAS, AND NEW YORK (1997, 1998). *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 66: 4649-4654.

29. DE PAOLA, A., NORDSTROM J.L., BOWERS J.C. AND COOK D.W. (2003). SEASONAL ABUNDANCE OF TOTAL AND PATHOGENIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN ALABAMA OYSTERS. *APP. ENVIRON. MICROBIOL.* 69: PP.1521-1526.
30. DEPOSITO DE DOCUMENTOS DE LA FAO. EVALUACION DE RIESGOS DE *VIBRIO SPP.* EN PESCADOS Y MARISCOS. Disponible en: [WWW.FAO.ORG/DOCREP/008/Y8145S/Y8145S08.HTM](http://WWW.FAO.ORG/DOCREP/008/Y8145S/Y8145S08.HTM).
31. DIAZ, J., VALERIO, M 2002. DIARREA POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. PRIMER CASO REPORTADO EN COSTA RICA. *REV. MED. HOSP. NAC.* 37: 15-17.
32. DUEÑAS PEÑA TERESA CELINA. RECUENTO DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* KANAWA POSITIVO EN ESPECIES MARINAS DE CONSUMO EN LIMA METROPOLITANA Y CALLAO. FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. PERU, 2008.
33. ELLIOT EL, KAYSNER C A, JACKSON L, TAMPLIN M L. *VIBRIO CHOLERA*, *V. PARAHAEMOLYTICUS*, *V. VULNIFICUS*, AND OTHER *VIBRIO SPP.*, 1998. P. 9.01-9.27. US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL. A.O.A.C. INTERNATIONAL, GAITHERSBURG, MD. USA.
34. FARFAN SELLAES MARIBEL. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA GENETICA DE POBLACIONES DE *VIBRIO CHOLERA*. UNIVERSIDAD DE BARCELONA. FACULTAD DE FARMACIA. JULIO 2002.
35. FARUQUE, S.M., AHMED, K.M. Y COL. (1997) MOLECULAR ANALYSIS OF TOXIGENIC *VIBRIO CHOLERA* 0139 BENGAL STRAINS ISOLATED IN BANGLADESH BETWEEN 1993 AND 1996: EVIDENCE FOR EMERGENCE OF A NEW CLONE OF THE BENGAL *VIBRIOS*. *J. CLIN MICROBIOL.* 35, 2299-2306.
36. FARUQUE SM, NACER IB, ISLAM MJ, FARUQUE AS, GHOSH AN, NAIR GB, ET AL. SEASONAL EPIDEMICS OF CHOLERA INVERSELY CORRELATE WITH THE PREVALENCE OF ENVIRONMENTAL CHOLERA PHAGES. *PROC NATL ACAD SCI U S A* 2005; 102(5): 1702-7.
37. FICA ALBERTO. INFECCIONES POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *MEDWAVE*. AÑO VII, NO. 9, OCTUBRE 2007.
38. FLORE A, HAYAL U, WASSERMAN SS, WRIGHT A, BUSH CA, MORRIS JG JR. ANTIBODIES THAT REACT WITH THE CAPSULAR POLYSACCHARIDE OF *VIBRIO VULNIFICUS* ARE DETECTABLE IN INFECTED PATIENTS, AND IN PERSONS WITHOUT KNOWN EXPOSURE TO THE ORGANISM. *DIAGN INFECT DIS* 1996; 24:161-167.

39. FLORES SOSA JACQUELINA ATALA. CARGA DE LA ENFERMEDAD POR VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS, MÉXICO, 2005-2008. REVISTA HIGIENE 2010. MEXICO. Pag.16-18.
40. FOUZ B, TORANZO AE, BIOSCA EG, MAZOY R, AMARO C. ROLE OF IRON IN THE PATHOGENICITY OF *VIBRIO DAMSELA* FOR FISH AND MAMMALS. *FEMS LETT* 1994; 121:181-188.
41. FRANCO MONSREAL JOSE M.S.P., FLORES ABUXAPQUI JAVIER, M. EN C., SUÁREZ MIL GUADALUPE DE JESUS, M.C. PREVALENCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* Y DE SUS ANTICUERPOS EN MANIPULADORES DE ALIMENTOS MARINOS EN MÉRIDA, YUCATÁN. SALUD PÚBLICA MÉX 1991; VOL. 33(2):173-177.
42. FUENTES VALENCIA MARIA ANEL Y COLB. USO DE LA FAGOTERAPIA PARA EL CONTROL DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. 1ER, CONGRESO DEL LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PUBLICA. 2009.
43. FUENZALIDA, L., C. HERNANDEZ, J. TORO, M. L. RIOSECO, J. ROMERO, AND R. T. ESPEJO. 2006. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN SHELLFISH AND CLINICAL SAMPLES DURING TWO LARGE EPIDEMICS OF DIARRHOEA IN 683. SOUTHERN CHILE. *ENVIRON. MICROBIOL.* 8:67
44. GARCÍA BERMEJO ISABEL. SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA, HOSPITAL DE GETAFE. DIAGNÓSTICO DE LAS INFECCIONES HUMANAS CAUSADAS POR ESPECIES HALÓFILAS DEL GÉNERO *VIBRIO*. Disponible en: [HTTP://WWW.SEIMC.ORG/CONTROL/REVI\\_BACTE/VIBRIO.HTM](http://www.seimc.org/control/revi_bacte/vibrio.htm)
45. GARRITY G, WINTERS M, SEARLES D. TAXONOMIC OUTLINE OF THE PROCARYOTIC GENERA; MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY. 2 ED. NUEVA YORK: BERGEY'S MANUAL TRUST; 2001. P.
46. GONZÁLEZ-ESCALONA N, CACHICAS V, ACEVEDO C, RIOSECO M L, VERGARA JA, CABELLO F, ET AL. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* DIARRHEA, CHILE, 1998 AND 2004. *EMERG INFECT DIS* 2005; 11: 129-31.
47. HEITMANN G. INGRID, JOFRÉ M. LEONOR, HORMÁZABAL O J. CARLOS, OLEA N. ANDREA, VALLEBUONA S. CLELIA Y VALDÉS H. CLAUDIO. REVISIÓN Y RECOMENDACIONES PARA EL MANEJO DE DIARREA POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *REV CHIL INFECT* 2005; 22 (2): 131-140.
48. HERNÁNDEZ G. CRISTINA, ULLOA P. JUANITA, VERGARA O. JOSÉ ANTONIO, ESPEJO T. ROMILIO, CABELLO C. FELIPE. INFECCIONES POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* E INTOXICACIONES POR ALGAS: PROBLEMAS EMERGENTES DE SALUD PÚBLICA EN CHILE. *REV MED CHILE* 2005; 133: 1081-1088.
49. KAPER, J.B., MORRIS, J.B. AND LEVINE, M.M. 1995. CHOLERA. *CLIN. MICROBIOL. REV.* 8. 48-8.

50. HENKE JM, BASSLER BL: Q UORUM SENSING REGULATES TYPE III SECRETION IN VIBRIO HARVEYI AND VI BRIO PARAHAEMOLYTICUS. *J BACTERIOL* 2004, 186(12):3794-3805.
51. HODGE, T.; CHARLES, S.; SMITH, L.; Y SMITH, M. DIARRHEA ASSOCIALED WITH *VIBRIO FLUVIALIS* INFECTION IN A PAT IENT WITH AIDS. *CLIN. INFECT. DIS.* 1995; 21: 237-238.
52. HORMOZABAL OPAZO JUAN, MD. THE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PANDEMIC. *REV CHIL INFECT* 2005; 22 (2): 125-130.
53. HONDA, T., ARITA M., AYALA E. AND MIWATANI T. (1988). *PRODUCTION OF PILI EN VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*.CAN. *J. MICROBIOL.* 34: PP.1279-1281.
54. IMPROVED METHOD FOR DETECTION OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN SEA FOO D. YUKIKO HARA-KIDO ET AL. DEC 2001. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*.P5819-5823.
55. JIMMY, DELGADO ALVARO Y ALVARA DO DEVORA.VIBRIOS NO EPIDÉMICOS Y *VIBRIO CHOLERAE* O1 ASOCIADOS A ENFERMEDAD DIARREICA AGUDA. EVENTO CLIMATOLÓGICO. "EL NIÑO" - 1998. HOSPITAL NACIONAL DOS DE M AYO.ANALES DE L A FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOSVOL. 60, N° 4 – 1999.
56. JIRAVANICHPAISAL, P., T. M IYAZAKI & LIMSU WAN. 1994. HISTOPATHOLOGY, BIOCHEMISTRY, AND PATHOGENICITY OF INFECTING BLACK TIGER PRAWN *J. AQUAT. ANIM. HEALTH* 61(1): 27-35
57. JOSEPH, S.W., COLWELL, R.R., AND K APER, J.B. 1982. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND RELATED HALOPHILIC VIBRIOS. *CRIT. REV. MICROBIOL.* 10: 77-124.
58. KARLIN S: DETECTING ANOMALOUS GENE CLUSTERS AND PATHOGENICITY ISLANDS IN DIVERSE BACTERIAL GENOMES. *TRENDS MICROBIOL* 2001, 9(7):335-343.
59. KAUFMAN GE, MYERS ML, PASS CL, BEJ AK, KAYSNER CA: MOLECULAR ANALYSIS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATED FROM HUMAN PATIENTS AND SHELF ISH DURING US PACI FIC NORTH-WEST OUTBREAKS. *LETT APPL MICROBIOL* 2002, 34(3):155-161.
60. KHAMET A L, TABREZ S, LINK R, ROBERTS I. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AS A C AUSE FOR N ECROTIZING FASCIITISIN A PATIENT WITH CIRRHOSIS. *AM J GASTROENTEROL* 2001: S125.
61. KODAMA TOSHIO, HIROTAKA HIYOSHI, KAZUYOSHI GOTOH, YUKIHI RO AKEDA, SHIGEAKI MATSUDA, KWON-SAM PARK, VLADEMIR V. CANTARELLI, TETSUYA IIDA, AND TAKESHI HONDA. IDENTIFICATION OF

- TWO TRANSLOCON PROTEINS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* TYPE III SECRETION SYSTEM 2. *INFECTION AND IMMUNITY*, SEPT. 2008, P. 4282–4289. VOL. 76, NO. 9.
62. KODAMA, T., M. ROKUDA, K. S. PARK, V. V. CANTARELLI, S. MATSUDA, T. IIDA, AND T. HONDA. 2007. IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF VOPT, A NOVEL ADP-RIBOSYLTRANSFERASE EFFECTOR PROTEIN SECRETED VIA THE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* TYPE III SECRETION SYSTEM 2. *CELL MICROBIOL.* 9:2598–2609.
63. LANATA CF. LA ENFERMEDAD DEL CÓCERA: A PROPÓSITO DE LA PRIMERA PANDEMIA EN EL PERÚ Y AMÉRICA EN ESTE SIGLO. *SALUD POPULAR.* 1991;13(1): 7-25
64. LIPP E, RIVERA I, GIL A, ESPELAND E, CHOOPUN N, LOUIS V, ET AL. DIRECT DETECTION OF *VIBRIO CHOLERAE* AND *CTXA* IN PERUVIAN COASTAL WATER AND PLANKTON BY PCR. *APPL ENVIRONM MICROBIOL* 2003; 69(6): 3676-80.
65. IIDA T, PARK K S, SUTHIENKUL O, KOZAWA J, YAMAICHI Y, YAMAMOTO K, ET AL. CLOSE PROXIMITY OF THE *TDH*, *TRH* AND *URE* GENES ON THE CHROMOSOME OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *MICROBIOLOGY* 1998; 144: 2517-23.
66. IJIMA, Y., YAMADA H. AND SHINODA S. (1981). *ADHERENCE OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS AND ITS RELATION TO PATHOGENICITY*. *CAN. J. MICROBIOL.* 27: PP.1252-1259.
67. IZUTSU, K., K. KUROKAWA, K. TASHIRO, S. KUHARA, T. HAYASHI, T. HONDA, AND T. IIDA. 2008. COMPARATIVE GENOMIC ANALYSIS USING MICROARRAY DEMONSTRATES A STRONG CORRELATION BETWEEN THE PRESENCE OF THE KILOBASE PATHOGENICITY ISLAND AND PATHOGENICITY IN KANAGAWA PHENOMENON-POSITIVE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* STRAINS. *INFECT. IMMUN.* 76:1016–1023.
68. MAKINO, K., K. OSHIMA, K. KUROKAWA, K. YOKOYAMA, T. UDA, K. TAGOMORI, Y. IJIMA, M. NAJIMA, M. NAKANO, A. YAMASHITA, Y. KUBOTA, S. KIMURA, T. YASUNAGA, T. HONDA, H. SHINAGAWA, M. HATTORI, AND T. IIDA. 2003. GENOME SEQUENCE OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*: A PATHOGENIC MECHANISM DISTINCT FROM THAT OF *V. CHOLERAE*. *LANCET* 361:743–749.
69. MARTINEZ-URTAZA, J., L. SI MENTAL, D. VELASCO, A. DEPAOLA, M. ISHIBASHI, Y. NAKAGUCHI, M. NISHIBUCHI, D. CARRERA-FLORES, C. REY-ALVAREZ, AND A. POUSA. 2005. PANDEMIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* O3:K6, EUROPE. *EMERG. INFECT. DIS.* 11:1319–1320.

70. MARTINEZ-URTAZA, J., A. LOZANO-LEON, A. DEPAOLA, M. ISHIBASHI, K. SHIMADA, M. NISHIBUCHI, AND E. LIEBANA. 2004. CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES FROM CLINICAL SOURCES IN SPAIN AND COMPARISON WITH ASIAN AND NORTH AMERICAN PANDEMIC ISOLATES. *J. CLIN. MICROBIOL.* 42:4672-4678.
71. MCCARTER LINDA. THE MULTIPLE IDENTITIES OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *J. MOLEC. MICROBIOL. BIOTECHNOL.* (1999) 1(1): 51-57.
72. MEADOR CE, PARSONS MM, BOPP CA, GERNER-SMIDT P, PAINTER JA, VORA G J: VIRULENCE GENE- AND PANDEMIC GROUP-SPECIFIC MARKER PROFILING OF CLINICAL *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES. *J CLIN MICROBIOL* 2007, 45(4):1133-1139.
73. MINISTERIO DE SANIDAD, TRABAJO Y SEGURIDAD SOCIAL, JAPÓN 2000. ESTADÍSTICAS DE INTOXICACIÓN ALIMENTARIA EN EL JAPÓN EN 2000.
74. NAGAYAMA, K., OGUCHI T., ARITA M. AND HONDA T. (1995). *PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A CELL-ASSOCIATED HEMAGGLUTININ OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *INFECT. IMMUN.* 63: PP. 1987-1992.4.
75. NAKOSONE, N. AND INAGAWA M. (1990). *PILI OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS STRAINS AS A POSSIBLE COLONIZATION FACTOR*. *INFECT. IMMUN.* 58: PP.61-69.
76. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-031-SSA1-1993, BIENES Y SERVICIOS. PRODUCTOS DE LA PESCA. MOLUSCOS BIVALVOS FRESCOS-REFRIGERADOS Y CONGELADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS.
77. OKURA M, OSAWA R, IGUCHI A, ARAKAWA E, TERAJIMA J AND WATANABE H. 2003. GENOTYPIC ANALYSIS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND DEVELOPMENT OF A PANDEMIC GROUP-SPECIFIC MULTIPLEX PCR ASSAY. *J. CLIN. MICROBIOL.* 41. 4676-4682.
78. OLIVER, J. D., AND KAPER, J.B. 1997. *VIBRIO SPECIES*. IN M. P. DOYLE, L. R. BEUCHAT, AND T. J. MONTVILLE, EDS. *FOOD MICROBIOLOGY: FUNDAMENTALS AND FRONTIERS*, P228-264. WASHINGTON, D.C., ASM.
79. OLEA AM, GONZÁLEZ C, CHIU M, VALLEBUONA C, LABRAÑA M, MARTINIELLO F. B. ROTE DE GASTROENTERITIS POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EN CHILE. *REVISTA CHILENA SALUD PÚBLICA*. 2005;9:51-3.
80. OSAWA R, IGUCHI A, ARAKAWA E, WATANABE H: GENOTYPING OF PANDEMIC *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* O3:K6 STILL OPEN TO QUESTION. *J CLIN MICROBIOL* 2002, 40(7):2708-2709.

81. PALOMINO P.M., JAIME S.J.L. Y COLB. BROTE DIARREICO POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* LAZARO CARDENAS MICHOACAN. LABORATORIO ESTATAL DE SALUD PÚBLICA DE MICHOACÁN.
82. PARK KS, ONO T, ROKUDA M, JANG MH, OKADA K, IIDA T, HONDA T: FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF TWO TYPE III SECRETION SYSTEMS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *INFECT IMMUN* 2004, 72(11):6659-6665.
83. PARIS MANCILLA ENRIQUE. INTOXICACIÓN POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. *CUAD MÉD SOC (CHILE)* 2005; 45: 43 – 47.
84. PÉREZ JL, CABRÉ M, RIERA L, PRÍU R, BERROCAL CI GASTROENTERITIS POR *VIBRIO PARAHAEOLYTICUS* ASOCIADA A CONSUMO DE OSTRAS. *ENFERM INFECC MICROBIOL CLIN* 1987; 5: 160-163.
85. PÉREZ TRALLERO E, URBIETA EGAÑA M, GASSER LAGUNA I, FERNÁNDEZ PÉREZ F. *VIBRIO ALGINOLYTICUS*. ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE CEPAS DE PROCEDENCIA HUMANA Y AISLADAS DEL MEDIO AMBIENTE. *CLIN* 1983; 1:102-106.
86. PETERSON K M , ZUPPARDO A. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AND *VIBRIO VULNIFICUS*. EN SUSSMAN M, ED. *MOLECULAR MEDICAL MICROBIOLOGY*. 2002. ACADEMIC PRESS. 1ST ED 2002, LONDON, U.K. P: 1291-1309.
87. QUEVEDO F. GO NZÁLEZ S. EL CÓ LERA EN LAT INOAMERICANA. *REVISIONES EN SALUD PUB* 1995; 4: 35-56.
88. RALPH A, CURRIE BJ: *VIBRIO VULNIFICUS* AND *V. PARAHAEMOLYTICUS* NECROTISING FASCIITIS IN FISHERMEN VISITING AN ESTUARINE TROPICAL NORTHERN AUSTRALIAN LOCATION. *J INFECT* 2007, 54(3):E111-4.
89. REVILLO MJ, RUIZ MA, URIEL B, GARCÍA-ZUECOA JC, GARCÍA-MOYA JB. GASTROENTERITIS AGUDA POR *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* UREASA POSITIVO EN UNA PACIENTE INMUNOCOMPROMETIDA. *HOSPITAL UNIVERSITARIO MIGUEL SERVET. ZARAGOZA*.
90. ROSAS I, CRAVIOTO, A, EZCURRA E, E DITORES. *MICROBIOLOGIA AMBIENTAL*. INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGIA (MX), UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, 134 P., 2004 MÉXICO.
91. ROBERT-PILLOT, A., A. GUENOLE, J. LESNE, R. DELESMONT, J. M. FOURNIER, AND M. L. QUILICI. 2004. OCCURRENCE OF THE *TDH* AND *TRH* GENES IN *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLATES FROM WATERS AND RAW SHELLFISH COLLECTED IN TWO FRENCH COASTAL AREAS AND FROM SEAFOOD IMPORTED INTO FRANCE. *INT. J. FOOD MICROBIOL.* 91:319–325.

92. SEAS C, GOTUZZO E. CHOLERA: OVERVIEW OF EPIDEMIOLOGIC, THERAPEUTIC, AND PREVENTIVE ISSUES LEARNED FROM RECENT EPIDEMICS. INT J INFEC DIS 1996; 1: 38-46.
93. SÁNCHEZ ZÁRATE JORGE, M. S. P.INTOXICACION ALIMENTARIA. CENTRO ESTATAL DE INFORMACIÓN EN SALUD. MÉXICO. JULIO, 2004.
94. SHANKAR V K, ZILVETTI M, HANDA A, BOWLER I C, GRAY D W. CHRONIC DIARRHEA AND WEIGHT LOSS DUE TO *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* INFECTION IN A RENAL T RANSPLANT RECIPIENT. TRANSPLANTATION 2004; 78: 487.
95. SATO MI, MONTEIRO CK, STOPPE NC, SANCHEZ PS. SHELLFISH AND MARINE WATER MICROBIOLOGICAL QUALITY. ENV TOX AND WATER QUALITY; 1992 FEB; 7(1):95-105.
96. SHIRAI H, ITO H, HIRAYAMA T, NAKAMOTO Y, NAKABAYASHI N, KUMAGAI K, ET AL. MOLECULAR EPIDEMIOLOGIC EVIDENCE FOR ASSOCIATION OF THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN (TDH) AND T DH-RELATED HEMOLYSIN OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* WITH GASTROENTERITIS. INFECT IMMUN 1990; 58: 3568-73.
97. SILVA SAN CRISTÓBAL WALLY, ET AL. AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS. DEPARTAMENTO LABORATORIOS BIOMÉDICOS. MINISTERIO DE SALUD- INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA. CHILE. 2008.
98. SINGLETON FL, ATTWELL RW, JANGI MS, COLWELL RR.EFFECTS OF TEMPERATURE AND SALINITY ON *VIBRIO CHOLERA* GROWTH. APPL ENVIRON MICROBIOL 1982; 44(5): 1047-58.
99. SW. JOSEPH. COLWELL RR, KAPER JB VI BRIO PARAHAEMOLYTICUS AND RELATED HALOPHILIC VIBRIOS. CRIT REV MICROBIOL 1982; 10(1): 77-124.
100. TACKET, C; HICKMAN, G.; PIERCE, V. Y MENDOZA, F. DIARRHEA ASSOCIATED WITH *VIBRIO FLUVIALIS* IN THE UNITED STATES. J. CLIN. MICROBIOL.1982; 16:991-992.
101. TAKAHASHI, A., KENJYO N., IMURA K., MYONSUN Y., AND HONDA T. (2000).CL SECRETION IN COLONIC EPITHELIAL CELLS INDUCED BY THE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* HEMOLYTIC TOXIN RELATED TO THERMOSTABLE DIRECT HEMOLYSIN. INFECT. IMMUN. 68: PP. 5435-5438.
102. TERCERO ALBURO JOSÉ JULIO, Q.B.P. DETECCIÓN DE POSIBLES FACTORES DE VIRULENCIA DE *VIBRIO MIMICUS* AISLADO DE A GUA Y

ALIMENTOS. ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. MÉXICO, DF. 2008.

103. TWEDT, R. M. 1989. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS. IN M. P. DOYLE, ED. *FOODBORNE BACTERIAL PATHOGENS*, P543-568. NEW YORK, MARCEL DECKER, INC.
104. WALDOR, M. AND MEKALANOS, J.J. (1996). LYSOGENIC CONVERSION BY A FILAMENTOUS PHAGE ENCODING CHOLERA TOXIN. *SCIENCE* 272, 1910-1914.
105. WATNICK, P.I., FULLNER, K.J. AND KOLTER, R. (1999). A ROLE FOR THE MANNOSE-SENSITIVE HEMAGGLUTININ IN BIOFILM FORMATION BY VIBRIO CHOLERAEL TOR. *J. BACTERIOL.* 181, 3606-3609.
106. WHITAKER WB, PARENT MA, NAUGHTON LM, RICHARDS GP, BLUMERMAN SL, BOYD EF. GROWTH OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS O3:K6 AT DIFFERENT SALT CONCENTRATIONS MODULATES RESPONSES TO PH AND TEMPERATURE STRESSES. *APPL ENVIRON MICROBIOL.* 2010 MAY 14. DISPONIBLE EN PUB MED: [HTTP://WWW.NCBI.NLM.NIH.GOV/PUBMED/20472729](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20472729).
107. WILLIAMS TL, MUSSER SM, NORDSTROM JL, DE PAOLA A, MONDAY SR: IDENTIFICATION OF A PROTEIN BIOMARKER UNIQUE TO THE PANDEMICO3:K6 CLONE OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS. *J CLIN MICROBIOL* 2004, 42(4):1657-1665.
108. WONG HC, CHEN CH, CHUNG YJ, LIU SH, WANG TK, LEE CL, CHIOU CS, NISHIBUCHI M, LEE BK: CHARACTERIZATION OF NEW O3:K6 STRAINS AND PHYLOGENETICALLY RELATED STRAINS OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS ISOLATED IN TAIWAN AND OTHER COUNTRIES. *J APPL MICROBIOL* 2005, 98(3):572-580.
109. WONG H C, LIU S H, WANG T K, LEE C L, CHIOU C S, LIU D P, ET AL. CHARACTERISTIC OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS O3:K6 FROM ASIA. *APPL ENVIRON MICROBIOL* 2000; 66: 3981-6.
110. WORSNIP PATRICK. EL CÓLERA EN HAITÍ SE PROPAGA MÁS RÁPIDO DE LO ESPERADO: ONU. Disponible en: [HTTP://WWW.NLM.NIH.GOV/MEDLINEPLUS/SPANISH/NEWS/FULLSTORY\\_105983.HTM](http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/news/fullstory_105983.htm)
111. YEUNG PS, BOOR KJ: EPIDEMIOLOGY, PATHOGENESIS, AND PREVENTION OF FOODBORNE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS INFECTIONS. *FOODBORNE PATHOG DIS* 2004, 1(2):74-88.
112. ZAMORA PANTOJA DIANA RUT H. QUIRÓZ SANTIAGO CAROLINA. UN ENEMIGO MARINO SILENCIOSO VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS. *REVISTA DIGITAL UNIVERSITARIA* 10 DE ABRIL 2005 • VOLUMEN 6

NÚMERO 4 • ISSN: 1067-6079. Disponible en: [HTTP://WWW.REVISTA.UNAM.MX/VOL.6/NUM4/ART33/ART33.HTM](http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art33/art33.htm).

113. ZAZUETA-BELTRÁN JORGE, VELÁZQUEZ-ROMÁN JORGE A, LEÓN-SICAÍROS NIDIA, CANIZALEZ-ROMÁN ADRIÁN. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES, SEROLÓGICAS Y FACTORES DE VIRULENCIA DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS EN A ISLADOS DE O RIGEN CLÍNICO Y AMBIENTAL EN S INALOA 2004 - 2009. DISPONIBLE EN: [HTTP://WWW.DCB.RSIP.IPN.MX](http://www.dcb.rsip.ipn.mx).
114. ZAKAZAKI RIICHI, CHARLES KAYSNER, Y CARLOS ABEYTA, JR. VIBRIO INFECTIONS. *FOODBORNE INFECTIONS AND INTOXICATIONS* 3E. 2006 ELSEVIER IN. ISBN-10: 0-12-588365-X .ISBN-13: 978-012-588365-8.