

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y TECNOLOGÍA

TRABAJO DE TESIS

Detección molecular de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* en almejas de importancia comercial de tres zonas de producción en Panamá.

Por:
Wilmaira Palacio Arboleda

DIRECTORES DE TESIS:
Dr. ALEX O. MARTÍNEZ TORRES
DRA. SARA AHUMADA RUIZ

**Tesis presentada como uno de
los requisitos para optar al grado
de Maestría en Microbiología
Ambiental**

PANAMÁ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2022

ALEX O. MARTÍNEZ TORRES, Profesor Titular II del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Panamá.

CERTIFICA QUE: WILMAIRA PALACIO ARBOLEDA

Ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación correspondiente a su Tesis de Maestría, con el título: Detección molecular de *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*, en almejas de importancia comercial de tres zonas de producción en Panamá

Revisado este trabajo, autorizan su presentación para ser juzgado y para que así conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Panamá el ____ de _____ de _____

DEDICATORIA

Primero que todo doy gracias a Dios por darme la fuerza y ser el motor que impulsa mis sueños y permitirme alcanzar una nueva meta en mi vida.

A mis padres Mercedes Arboleda y William Palacio, por ser el apoyo incondicional durante toda mi vida y por siempre confiar en mi.

A mis hermanas (Wilmeira, Wilmercys y Liliana), a mis sobrinos (Alexa, Luz, Jahir y Santiago), por su incondicional amor y cariño.

A todos mis amigos que de una u otra manera me brindaron su apoyo incondicional para culminar esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar una meta más en mi vida.

Al Ministerio de Mi Ambiente por el financiamiento del proyecto: **“Caracterización genética de virus, bacteriófagos, bacterias y parásitos en tres almejas contaminadas naturalmente en Panamá”**, mediante el convenio N° 041-53-2019 del Fondo de Agua, Área Protegida y Vida Silvestre, en el cual el Dr. Alex O. Martínez Torres es el Investigador Principal.

A mis directores de tesis: Dr. Alex O. Martínez Torres y a la Dra. Sara Ahumada Ruiz, por su apoyo incondicional, tiempo y motivación en la asesoría de este trabajo.

A mis Coasesores: El Prof. Fermín Mejía, Dr. Jordi Querol-Audi, Prof. Humberto Cornejo y Prof. Maricela Castillo por su dedicación y su tiempo.

A la Ing. Patricia Jaar, Directora del laboratorio FOOD SAFETY S.A, por apoyarme en este proyecto.

A la profesora Nivia Ríos, por siempre apoyarme cuando la necesite.

A la Dra. Gesabel Navarro, por haber sacado tiempo para ayudarme a cuantificar la concentración y pureza del ADN de mis muestras, mediante el Nanodrop en el laboratorio de CIIMET.

Al Laboratorio de Microbiología Experimental y Aplicada (LAMEXA) y al Laboratorio de Microbiología de Aguas (LAMA) de la Vicerrectoría de Investigación y posgrado.

A las instituciones públicas: ARAP, al Departamento de Epidemiología del MINSA y ETESA.

A mis compañeros de trabajo: Jennifer, Pablo, Fani y Rosa por su gran apoyo.

A mis amigas y colegas: Digna, Zuki, Iris, Yeimizol gracias por siempre estar cuando las necesité.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN-----	17
Antecedentes Históricos-----	20
Casos de <i>vibrios</i> asociados al consumo de alimentos -----	23
Características Taxonómicas de los <i>vibrios</i> -----	26
Vibriosis -----	26
Patogenicidad -----	26
<i>V. cholerae</i> -----	27
Clasificación Serológica -----	27
<i>V. cholerae</i> Serogrupo O:1 -----	28
Seroconversión -----	29
Biotipos -----	29
<i>V. cholerae</i> SEROGRUPO O:139 – BENGAL -----	30
<i>V. cholerae</i> no O:1 y no O:139 -----	31
<i>V. vulnificus</i> -----	32
Genotipos de <i>V. vulnificus</i> -----	33
Patogenicidad -----	33
Gen <i>rtxA1</i> , como factor de patogenicidad en <i>V. vulnificus</i> -----	34
Infección por <i>V. vulnificus</i> -----	35
<i>V. parahemolyticus</i> -----	36
Patogenicidad -----	36
Infección por <i>V. parahaemolyticus</i> -----	37
Métodos de aislamiento en medios de cultivos -----	38
Condiciones ecológicas y factores ambientales asociados con la distribución de <i>Vibrios</i> -----	39
Temperatura del Agua -----	39
Salinidad-----	40
Relación con el zooplancton -----	40
Otros Factores Ambientales-----	41
Indicadores de contaminación fecal, coliformes termotolerantes y <i>E. coli.</i> -----	42
Moluscos de importancia comercial en Panamá -----	43
<i>Leukoma asperima</i> -----	43
<i>Donax punctatostratus</i> -----	44
<i>Anadara tuberculosa</i> -----	45
La acuicultura en Panamá-----	46

La acuicultura a nivel mundial -----	47
La regulación ambiental -----	48
Normativas vigentes en materia de sanidad e inocuidad acuícola-pesquera en Panamá -----	49
Clasificación de la zona de producción según SERNAPESCA (2018) -----	49
Prevención en el manejo y consumo de bivalvos -----	52
Técnicas de detección -----	53
Importancia de la PCR -----	53
Objetivos -----	55
Objetivo general -----	55
Objetivos Específicos -----	55
Hipótesis de trabajo -----	55
Ha: -----	55
Ho: -----	55
Metodología -----	57
Toma y procesamiento de la muestra -----	58
Aislamiento de <i>Vibrios</i> y bacterias indicadoras (Coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i>). -----	58
Análisis microbiológico -----	58
Bacterias Fermentadoras de Lactosa -----	58
Aislamientos de Coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> -----	59
Caracterización de Cepas silvestres de <i>V.cholerae</i> y <i>V.vulnificus</i> en el Sistema de secuenciación por RiboPrinter (Ribotipificación). -----	59
Identificación mediante técnica de PCR múltiple en tiempo real -----	60
Estandarización de PCR múltiple en tiempo final -----	60
Protocolo para la extracción del ADN de cepas ATCC -----	60
Amplificación por PCR -----	61
Análisis estadístico -----	62
Resultados -----	64
Amplificación de PCR-TF MÚLTIPLE -----	74
Detección de <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> a partir de muestras ambientales de moluscos (almejas) -----	74
DISCUSIÓN -----	76

CONCLUSIONES-----	89
RECOMENDACIONES-----	90
BIBLIOGRAFÍA -----	92
Procesamiento de las muestras en los laboratorios LAMEXA Y LAMA-----	120

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Determinantes antigénicos de <i>V. cholerae</i> .-----	28
Cuadro 2. Diferenciación de los Biotipos Clásico y El Tor de <i>V. cholerae</i> O:1.30	
Cuadro 3. Principales productores acuícolas mundiales y regionales. -----	47
Cuadro 4. Criterio para la clasificación de áreas de extracción de moluscos bivalvos, según las zonas de producción en función del número de coliformes termotolerantes y <i>E. coli</i> . SERNAPESCA (2018).-----	51
Cuadro 5. Coordenadas geográficas de las zonas de Colectas. -----	57
Cuadro 6. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de los <i>Vibrios</i> en la PCR- Multiple en tiempo final.-----	61
Cuadro 7. Categorización de las zonas de producción mediante los indicadores de contaminación fecal.-----	65
Cuadro 8. Recuento de indicadores de contaminación fecal: Coliformes totales, coliformes termotoleantes y <i>E. coli</i> en bivalvos (Almejas), en los meses de temporada seca y lluviosa. -----	66
Cuadro 9. Asociación de <i>Vibrios</i> con indicadores de contaminación fecal. --	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y organización de la toxina MARTXVv de <i>V. vulnificus</i> codificada por el gen rtxA1. Tomado de Kwak et al. (2011). -----	35
Figura 2. <i>L. asperrima</i> , foto de GB Sembrador (1835). -----	44
Figura 3. <i>D. punctatostriatus</i> , foto de Femorale (2011).-----	45
Figura 4. <i>A. tuberculosa</i> , Foto de Ángel Vega (1995). -----	46
Figura 5. Diagrama de flujo del muestreo. -----	57
Figura 6. Valores promedio de los indicadores de contaminación fecal-----	65
(CT, CTT, EC) por zonas de producción. -----	65

Figura 7. Valores promedio de los indicadores de contaminación fecal (CT, CTT,EC) en los distintos meses de muestreo. -----	67
Figura 8. Diagrama de cajas de los microorganismos: coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT) y la <i>E. coli</i> (EC) en NMP/ 100 g en los sitios Bique, Chame y Chepo durante la estación seca y lluviosa.-----	67
Figura 9. En la secuenciación de las cepas silvestres se obtuvo un porcentaje de similitud por encima de 0.85 considera una identificación certera. Obteniendo en nuestros resultados en <i>V.cholerae</i> un porcentaje de similitud 0,99% y para <i>V.vulnificus</i> , 0.93%.-----	68
Figura 10. Aislamientos de <i>Vibrios</i> , por zonas de producción, en la temporada seca y lluviosa.-----	69
Figura 11. Detección de <i>V. cholerae</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V. vulnificus</i> , mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, en temporada seca y lluviosa.----	70
Figura 12. Presencia de <i>V. parahaemolytticus</i> , <i>V. cholerae</i> y <i>V. vulnificus</i> .---	70
Figura 13. Detección de <i>Vibrios</i> mediante la técnica de PCR-TF, durante la época seca y lluviosa. -----	70
Figura 14. Prueba de Kruskal-Wallis entre los <i>Vibrios</i> y las zonas de producción. -----	71
Figura 15. Comparación de las tres técnicas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis. -----	72
Figura 16. Diagrama de cajas de los microorganismos de la presencia de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. cholerae</i> , en los sitios de Bique, Chame y Chepo durante la estación seca y lluviosa-----	72
Figura 17. Bandas amplificadas de la PCR- Múltiple para la detección de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. cholerae</i> . -----	74
Figura 18. Corrida en gel de agarosa a 1.5% de muestras ambientales y controles positivos. -----	75
Figura 19. 1) Lavado y cepillado de almejas con agua, 2) Apertura de los bivalvos para extracción del cuerpo y líquido intervalvar, 3) Licuado de la muestra, 4) Pesaje de las muestra para su fraccionamiento, 5), Movilización de las muestras en cadena de frío, 6) Transporte de la muestra para su procesamiento en el laboratorio Food Fafety S.A. -----	120
Figura 20. 1) Pesaje de las muestras, 2) Enriquecimiento de la muestra, 3) Incubación de las muestras a 35°C, 4) Pase de muestras en buffer, 5) Lisados en bloque térmico, 6) Hidratación de las muestras. -----	120
Figura 21. 1) Aislamiento de de <i>Vibrios</i> en agar TCBS, 2) Cepas puras, de 3) lisados de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>V. cholerae</i> e PCR- Multiple , 4) Corrida de PCR-Multiple en gel de agarosa 1.5%. -----	121

RESUMEN

Los moluscos en general poseen una alimentación por filtración. Este sistema de nutrición favorece que se acumule una gran cantidad de microorganismos y otros elementos presentes en el ambiente donde los bivalvos se desarrollan. El consumo de bivalvos bajo estas condiciones, ha sido la causa de un gran número de casos de enfermedades entéricas. En los últimos años, se ha incrementado el interés sobre la investigación de *vibrios* en los sistemas marinos costeros. En este estudio, se analizaron 90 muestras de moluscos bivalvos, distribuidos en 45 muestras en los meses de la temporada lluviosa de septiembre, octubre y noviembre (2020), y 45 muestras en la temporada seca correspondientes a los meses de febrero, marzo y abril (2021). El muestreo se llevó a cabo en tres zonas de alta producción de almejas en Panamá, Bique provincia de Panamá Oeste (*Leukoma asperrima*), Espavé, provincia de Panamá Oeste (*Anadara tuberculosa*) y Chinina, provincia de Panamá (*Donax punctatostriatus*). Para evaluar la calidad sanitaria de las zonas de producción, se midieron los indicadores de contaminación fecal. Los valores promedio del recuento de coliformes totales se reportaron entre 2.62×10^3 a 7.45×10^5 , encontrándose que la zona de Chepo, representó la mayor concentración de coliformes termotolerantes con 1.70×10^4 en la temporada seca y, en la temporada lluviosa, se reporta Bique 1.89×10^3 y Chepo 7.90×10^2 NMP/100g en cuanto a *E.coli*. Por encima de los niveles permitidos se ubica, en la temporada seca, la zona de Chepo con 3.90×10^3 y Bique en la temporada lluviosa con 6.97×10^2 . Para la evaluación de la calidad microbiológica de los moluscos, se utilizaron tres técnicas, para la detección de los Vibrios presentes en las tres especies de almejas (Aislamientos en medios de cultivo tradicional, PCR–Tiempo Real y PCR-Tiempo Final). Los resultados mostraron que *V. parahaemolyticus* fue el patógeno de más prevalencia tanto en la estación seca, como en la lluviosa, representando un 47%, seguido de *V. vulnificus* con 34% y *V. cholerae* con 19% en las tres zonas de producción de Panamá. De las tres técnicas evaluadas, la PCR–TR resultó ser la más sensible en cuanto a los resultados encontrados.

Palabras claves: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, PCR–Tiempo Real, PCR–Tiempo Final, Aislamiento bacteriano.

ABSTRACT

Molluscs in general have a filter feed. This nutrition system allows the accumulation of a large number of microorganisms and other elements present in the environment where the bivalves develop. The consumption of bivalves under these conditions has been the cause of a large number of cases of enteric diseases. In recent years, interest in vibrios research in coastal marine systems has increased. In this study, 90 samples of bivalve molluscs were analyzed, distributed in 45 samples in the rainy season months of september, october and november (2020), and 45 samples in the dry season corresponding to the months of february, march and april (2021). The sampling was carried out in three areas of high production of bivalves in Panama, Bique, province of West Panama (*Leukoma asperrima*), Espave, province of West Panama (*Anadara tuberculosa*) and Chinina, Panama province (*Donax punctatostriatus*). The average values of the total coliform count were reported between 2.62×10^3 to 7.45×10^5 , finding that the Chepo area represented the highest concentration of thermotolerant coliforms with 1.70×10^4 , in the dry season and in the rainy season Bique 1.89×10^3 and Chepo 7.90×10^2 NMP/100g in relation to E.coli, above the levels is located, in the dry season, the Chepo zone with 3.90×10^3 , and Bique in the rainy season 6.97×10^2 . For the evaluation of the microbiological quality of the molluscs, three techniques were evaluated for the isolation and detection of *Vibrios* present in the bivalves (Isolations in traditional culture media, qPCR, and PCR-Final Time). Our results indicate that *V. parahaemolyticus* was the most prevalent pathogen in both, dry and rainy seasons, representing a 47%, followed by *V. vulnificus* with 34% and *V. cholerae* with 19% in three production areas of Panama. Among the three methods evaluated, the qPCR was found to be the most sensitive.

Keywords: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, qPCR, PCR-Final Time, Bacterial Isolates.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN Y MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

Desde principios del siglo pasado, se han reportado numerosas investigaciones y publicaciones alrededor del mundo sobre los microorganismos asociados a los bivalvos, debido a que algunos de éstos pueden ser patógenos. La mayoría de los estudios publicados se enfocan en miembros de la familia *Vibrionaceae* (Ramírez 2000; Botero 2005; Hidalgo 2009).

En los últimos años se ha incrementado el interés sobre la investigación de *vibrios* en los sistemas marinos costeros. Los *vibrios* se encuentran en altas densidades en el ecosistema marino y han sido extensamente estudiados en los sistemas costeros por su importancia medioambiental e incidencia en la extracción de moluscos (Leyton y Riquelme 2008; Thompson 2008). La distribución y dinámica de estas poblaciones están influenciadas por gradientes medioambientales como temperatura, salinidad, pH, disponibilidad y concentración de nutrientes, así como abundancia de hospederos (Quiñon *et al.*, 2000; Muños *et al.*, 2008). Los moluscos en general poseen una alimentación por filtración. Este sistema de nutrición favorece que se acumule una gran cantidad de microorganismos y otros elementos presentes en el ambiente donde los bivalvos se desarrollan. El consumo de bivalvos bajo estas condiciones ha sido la causa de un gran número de casos de enfermedades entéricas y, por supuesto, este riesgo se potencializa durante la comercialización y las operaciones de manejo (Fontáñez, 2005). Estos pueden estar implicados en la transmisión del cólera y otras enfermedades gastrointestinales, relacionado con el consumo directo en su concha, crudos o ligeramente cocidos (Dileep *et al.*, 2003).

Los *vibrios*, en la naturaleza, pueden estar en un estado inactivo o no ser capaces de crecer en los medios selectivos empleados. No obstante, se ha evidenciado que las bacterias en estado de viables no cultivables, pueden también causar enfermedades (Cowell, 2000; Fontáñez, 2005). A la fecha se han descrito más de 72 especies en el género *Vibrio* (Tarr *et al.*, 2007). Las especies de *Vibrios* patógenos para humanos en la actualidad está limitada sólo a 12, que son clínicamente significativas: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. metschnikovii*, *V. cincinnatiensis* y *V. harveyi* (Nishibuchi, 2006; Dabanch, 2009; Miranda *et al.*, 2010). Las infecciones causadas por estos

organismos están usualmente asociadas a la ingestión de moluscos contaminados y los síntomas que presentan los pacientes van desde gastroenteritis, infección en la piel, septicemia, llegando a la mortalidad en el caso de pacientes inmunocomprometidos o con bajas defensas (Dabanch, 2009).

La mayoría de estudios sobre prevalencia de *Vibrios* en agua y moluscos han sido realizados en EE.UU. y países asiáticos, países en los que este microorganismo causa el mayor número de infecciones en humanos. Esta falta de información se justifica porque en Panamá no hay una comisión que se encargue del seguimiento anual de las infecciones gastrointestinales que hayan sido causadas por especies patógenas de *Vibrios*. De hecho, muchos de los casos ni siquiera se investigan, desconociéndose si tales infecciones son de origen vírico o bacteriano. La carencia de datos epidemiológicos fiables es la que determina que no haya una legislación panameña que establezca el número máximo de células del género *Vibrio* o que debe contener el alimento para que sea apto para consumo humano. Para 2020, el Ministerio de Salud de Panamá, reportó 717 casos de intoxicación alimentaria y para el 2021, 105,845 casos de gastroenteritis y colitis no especificado.

En Panamá no se conocen estudios de investigación sobre el género *Vibrio*, en contraste con otros agentes infecciosos causantes de diarrea. Por la importancia que revisten los *Vibrios* patógenos en alimentos que se consumen crudos o ligeramente cocidos, se realizó el presente trabajo para conocer la presencia de bacterias de este género en muestras de almejas, que son de importancia en Panamá y valorar la posible relación con su calidad sanitaria. Aportando así, una introducción básica a los problemas de salud pública que puedan estar asociados al consumo de moluscos bivalvos, para que se emitan los controles de vigilancia y así, evitar el avance de la contaminación de ecosistemas acuáticos, y garantizar la inocuidad de los bivalvos que se comercializan en Panamá.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes Históricos

El cólera es una de las enfermedades infecciosas que se conocen de más larga data, existiendo reportes de esta patología desde 1817 (Colwell *et al.*, 1996). En 1854, el médico italiano Filippo Pacini describió el primer *Vibrio*, *V. cholerae* (agente causante del cólera), mientras estudiaba los brotes de esta enfermedad en Florencia. No obstante, el reconocimiento por el descubrimiento de esta bacteria se otorgó a Robert Koch, quien 30 años después, logró aislar el microorganismo manteniendo el nombre dado por Pacini, aislando este organismo a partir de enfermos de cólera en Egipto. Este organismo ha sido responsable de epidemias y pandemias en todas las épocas, especialmente en Grecia, China y la India. En 1817, se produjo la primera pandemia de cólera fuera de Asia y desde entonces, se han producido siete pandemias nuevas. La última se inició en Indonesia en 1961 y desde allí se propagó a África (1970) y América Latina (1991), extendiéndose después a los Estados Unidos de América (EEUU) (Fernández, 2000). El *V. cholerae* O1 y O139 toxigénicos son los agentes causantes del cólera, una enfermedad transmitida por alimentos y aguas contaminadas, con potencial epidémico y pandémico. Las cepas no-O1/no-O139, también pueden ser patogénicas, pero no están asociadas con enfermedad epidémica. Las cepas no-O1 generalmente no son toxigénicas, comúnmente causan una forma más leve de gastroenteritis que las cepas O1 y O139, y generalmente, se las asocia con casos esporádicos y pequeños brotes más que una epidemia (Desmarchelier, 1997).

V. vulnificus se reportó por primera vez en la década de 1970 y ha sido objeto de numerosas investigaciones y artículos de revisión (Oliver, 1989; Strom y Paranjpye, 2000). *V. vulnificus* fue definido como una nueva especie bacteriana dentro del género *Vibrio* por Farmer en 1979. La especie incluía una serie de *vibrios* fenotípicamente inusuales (lactosa e indol positivos) que habían sido aislados de muestras clínicas humanas y ambientales (agua de mar y bivalvos) en EEUU (Farmer, 1979). Aproximadamente al mismo tiempo, en Japón, se aislaron bacterias de la misma especie pero de anguilas de cría (Muroga *et al.*, 1976). Las cepas japonesas constituyeron un nuevo grupo serológico dentro de la especie (posteriormente designado como serovar E (Bt2-SerE) por Biosca *et al.*, 1996) y se diferenciaron de

las cepas americanas en algunas pruebas bioquímicas (Tison *et al.*, 1982). En consecuencia, la especie se dividió en dos biotipos, uno para agrupar los aislados originales, que eran serológicamente heterogéneos (Bt1) y otro para agrupar los aislados de anguila (Bt2) (Tison *et al.*, 1982). Posteriormente, ambos biotipos fueron aislados en todo el mundo y al mismo tiempo, varios laboratorios informaron de la variabilidad serológica de Bt2 (Høi *et al.*, 1998; Biosca *et al.*, 1999; Fouz y Amaro, 2002; Fouz *et al.*, 2006).

Actualmente, basados en análisis serológicos, bioquímicos y genéticos, se conocen tres biotipos de *V. vulnificus* (Arias *et al.*, 1997; Bisharat *et al.*, 20005 y 2007). La mayoría de las cepas aisladas de casos de infección en humanos pertenecen al (Bt1) y es reconocido como el principal responsable de infección en humanos. Se ha descrito una isla de patogenicidad de 33 kb que incluye varios genes que aparentemente se relacionan con la patogenicidad en otros patógenos, por lo que se ha sugerido que las cepas que la poseen son potencialmente virulentas. La mayoría de los estudios del biotipo 1 de *V. vulnificus* se han reportado en los EEUU y fuera de este país, actualmente hay muy poca información epidemiológica, debido a que no es una enfermedad de notificación obligatoria en la mayoría de los países, y por ende, la vigilancia es limitada (Oliver, 1989; Strom y Paranjpye, 2000).

El biotipo 2 está comúnmente asociado a infecciones en organismos acuáticos, principalmente en peces y ocasionalmente a casos de infección en humanos (Tison y Kelly, 1986; Amaro *et al.*, 1992). Ambos biotipos presentan una distribución mundial, principalmente en zonas tropicales (Zaidenstein *et al.*, 2008). El Bt2 es heterogéneo y puede subdividirse en diferentes serovares. El primero descrito fue el serovar E (equivalente al serovar O4 del sistema de clasificación de Martin y Siebelin, 1991) que parece ser genéticamente homogéneo, independientemente de su origen (peces o humano), porque constituye una excepción en el sentido de que se han descrito casos humanos producidos por él. El serovar A apareció en el año 2000 en anguilas, en España. Los serovares O3 y O3/4 solamente se han aislado en una ocasión a partir de anguilas, en Dinamarca (Fouz *et al.*, 2007). El biotipo 3 se ha asociado a 62 casos de infección en humanos, señalándolo como un clon recombinante de dos poblaciones de *V. vulnificus*, sin embargo, solo ha sido reportado en Israel (Bisharat *et al.*, 2005 y

2007). El Bt3 fue el último grupo descrito y agrupa las únicas cepas de las especies asociadas con brotes de septicemia vinculados a piscifactorías (Bisharat *et al.*, 1999). Curiosamente, no hay informes de infecciones humanas causadas por cepas de Bt3 fuera de Israel. Una de las razones podría ser que la biotipificación falla como consecuencia de las numerosas excepciones a las descripciones de biotipos originales que se han encontrado (Sanjuán *et al.*, 2009). De hecho, los únicos métodos que pueden distinguir claramente estas cepas del resto de las especies y de otros vibrios patógenos, son los métodos de base genómica, como la secuenciación del genoma, la electroforesis en gel de campo pulsado o la tipificación de secuencias de múltiples locus (MLST), que son costosos y consumen mucho tiempo (Bisharat *et al.*, 2005).

Recientemente, se ha propuesto un nuevo sistema de clasificación biológicamente significativo para *V. vulnificus* (Roig *et al.*, 2018). Este nuevo sistema se basa en un análisis filogenético de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) presentes en el genoma central de la especie y divide *V. vulnificus* en cinco linajes filogenéticos (L) bien respaldados. Según este nuevo sistema, los aislados de Bt3 pertenecen a L3 y constituyen un grupo genéticamente homogéneo, claramente diferenciable del resto (Bisharat *et al.*, 2005; Roig *et al.*, 2018).

En el año 1951, investigadores japoneses encabezados por Fujino identificaron por primera vez a *V. parahaemolyticus* como el causante de intoxicación alimentaria. Esto ocurrió durante la aparición de un brote epidémico en la provincia de Isaka, en el cual hubo 272 personas afectadas, con 20 fallecidos. El brote se asoció al consumo de sardinas crudas (Fujino *et al.*, 1953).

Numerosos brotes de intoxicaciones alimentarias y casos esporádicos de *V. parahaemolyticus* se fueron sucediendo en EEUU, Europa y Asia, pero no fue hasta 1969 en que este microorganismo se consideró un problema de salud pública. Desde entonces, ha adquirido un papel cada vez más importante como agente causal de infección gastrointestinal relacionada con el consumo de mariscos crudos o insuficientemente cocidos (Kaysner, 1998; De Paola, 2000). Los *vibrios* se concentran en el intestino de los moluscos que se alimentan por filtración, como las ostras, las almejas y los mejillones, donde se multiplican y se unen (Hlady, 1997). Los primeros estudios en Japón demostraron que el 96% de las cepas clínicas producen una

hemolisina directa termoestable (TDH), mientras que solo el 1% de las cepas ambientales producen esta hemolisina (Sakazaki, Iwanami y Tamura, 1968). Posteriormente, se descubrió que las cepas TDH negativas de casos clínicos producían una hemolisina relacionada con TDH, (TRH). (Honda *et al.*, 1988). En la actualidad, las cepas que producen TDH y TRH se consideran patógenas para el hombre. Diversos serotipos pueden estar asociados con infecciones humanas, pero, recientemente, se ha descubierto que cepas pertenecientes al serotipo O3:K6 son el agente causal de varios brotes en diferentes países (Nair *et al.*, 2007).

Casos de *vibrios* asociados al consumo de alimentos

V. vulnificus ha sido asociado con septicemia primaria en individuos con enfermedades crónicas preexistentes después del consumo de bivalvos crudos. Ésta es una enfermedad grave y por lo general, mortal. Hasta la fecha, la enfermedad causada por *V. vulnificus* se ha asociado casi exclusivamente con ostras (Oliver, 1989; Oliver y Kaper, 1997). En Japón, las ostras no son la fuente principal de *V. vulnificus*, ya que las ostras crudas se consumen en invierno (diciembre-febrero) y la mayoría de las infecciones ocurren durante junio-noviembre con un pico en julio. Se ha informado que el camarón de barro (*Upogebia*) es el agente asociado a los casos de *V. vulnificus* (Inoue *et al.*, 2008).

Se considera una de las especies más patógenas del género *Vibrio*, después de *V. cholera*. En EEUU, desde 1989 hasta el 2000, fue responsable de 147 muertes asociadas al consumo de ostras y almejas crudas infectadas, representando así, el 95% de las muertes asociadas al consumo de productos de mar (FDA, 2000; Red Mundial, 2005). En un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil, se reportó una mayor contaminación por *V. vulnificus* en ostras (65.4%), en mariscos (42.1%) y por último, en camarones (14,3%) (Moreno y Landgraf, 1997).

Los *V. cholerae* O1 y O139 toxigénicos son los agentes causantes del cólera, una enfermedad transmitida por alimentos y por el agua con potencial epidémico, y pandémico. También, las cepas no-O1/no-O139 pueden ser patogénicas, pero no están asociadas con enfermedad epidémica. Las cepas no-O1 generalmente son no toxigénicas, comúnmente causan una forma más leve de gastroenteritis que las cepas

O1 y O139 y generalmente se las asocia con casos esporádicos y pequeños brotes más que con epidemias (Desmarchelier, 1997).

Los brotes de cólera han sido asociados con el consumo de mariscos y pescados crudos incluyendo ostras, cangrejos y camarones (Oliver y Kaper, 1997). El mayor brote fue una pandemia en América del Sur a comienzos de 1990, cuando el *V. cholerae* O1 causó más de 400.000 casos y 4.000 muertes en Perú (Wolfe, 1992). El agua contaminada usada para preparar alimentos, incluyendo el popular pescado levemente marinado *ceviche*, fue la causa del brote.

V. parahaemolyticus se identificó por primera vez como causante de enfermedades transmitidas por alimentos durante el otoño de 1950 en los suburbios del sur de Osaka, Japón, donde un brote de gastroenteritis aguda después del consumo de sardinas juveniles semisecas enfermó a 272 personas y con 20 defunciones (Fujino *et al.*, 1953).

En Asia, *V. parahaemolyticus* es una causa común de enfermedades transmitidas por los alimentos. Antes de 1994, la incidencia en Japón había ido disminuyendo; sin embargo, en 1994-1995 se reportaron 1280 informes de infección debida al organismo (Anon, 1999). Durante este período, las intoxicaciones alimentarias por *V. parahaemolyticus* superaron en número a los alimentos contaminados por *Salmonella*. Entre 1996 a 1998 se registraron 496 brotes y 24,373 casos de *V. parahaemolyticus* informados, mientras que se notificaron 25,211 casos entre 1999 y 2005 (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón 2010). En general, los brotes fueron más frecuentes en el verano. En Taiwán, entre 1986 y 1995, se registraron unos 197 brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, causados por *V. parahaemolyticus* (Pan *et al.*, 1997). Mientras que en 1997 se notificaron más de 200 brotes, incluido un brote de 146 casos adquiridos en almuerzos en cajas (Anon *et al.*, 1999). Durante 1997 y 1998, hubo más de 700 casos de enfermedad debido a *V. parahaemolyticus* en los EEUU, la mayoría asociados con el consumo de ostras crudas. En dos de los brotes de 1998, un serotipo de *V. parahaemolyticus* (O3: K6), reportado anteriormente solo en Asia, surgió por primera vez como causa principal de enfermedad. En la ciudad de Hat Yi, Tailandia, 38 de 80 residentes informaron haber experimentado diarreas sanguinolentas, después del consumo de almejas. En Japón

se notificaron a unas 10,000 personas, debido al consumo de sashimi (trozos de filete de pescado crudo) y *sushi* (bola de arroz avinagrado con filete de pescado crudo), los cuales fueron responsables del 26% y 23% de los brotes, respectivamente. Los mariscos implicados rara vez se identifican, pero tres brotes en 1999 se asociaron con el jurel. En los últimos años también se han producido importantes brotes e infecciones en América del Sur de *V. parahaemolyticus*. En países del continente americano se han notificado casos de gastroenteritis por la cepa pandémica O3:K6 y sus serovariantes, donde la cepa pandémica se detectó por primera vez en Perú con más de 100 casos aproximadamente al mismo tiempo que provocó un brote. Posteriormente, la cepa O3: K6 se propagó a Chile en 1998 con más de 16,804 casos en humanos, en Brasil en 2001 se reportaron más de 18 casos y en México en 2004 más de 1,200 casos (Gil *et al.*, 2007).

En 1974, se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en agua de mar frente a la costa del Pacífico de Panamá (Kourany *et al.*, 1974) y en 1975 se reportó el primer caso confirmado de gastroenteritis atribuido a la infección por *V. parahaemolyticus* en Panamá, recuperados en camarones frescos utilizados en la preparación de platos de marisco (Kourany y Vasquez, 1975) .

En Chile, desde el año 2000, *V. parahaemolyticus* es objeto de vigilancia de laboratorio, por lo cual, los laboratorios clínicos públicos y privados que identifiquen este agente están obligados a notificarlo al Instituto de Salud Pública de Chile (Heitmann *et al.*, 2005). Así, durante el año 2005, se reportaron más de 10,000 casos de infecciones por *V. parahaemolyticus*, en Chile central y el sur de Chile. Los primeros brotes causados por la cepa pandémica se dieron en la ciudad de Antofagasta, entre noviembre de 1997 y marzo de 1998, y otro brote que afectó a aproximadamente 1,500 personas fue entre enero y marzo del 2004, principalmente en Puerto Montt (Nair y Opazo, 2005). Los brotes de la enfermedad en Puerto Montt comenzaron en 2004 y alcanzaron un pico en 2005 con 3,651 casos. Hasta 2006, cada caso analizado fue causado por la cepa pandémica serovar O3:K6 (Harth *et al.*, 2009). Existen muy pocos datos en Europa sobre infecciones asociadas a *V. Parahaemolyticus*. Los datos más recientes de brotes fueron comunicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), donde se reportan cuatro brotes en Francia en el año 2015, con

29 casos. Ninguno de estos brotes fue apoyado por evidencia fuerte. En dos brotes se sospechó el consumo de crustáceos, moluscos y sus productos, mientras que los demás brotes se asociaron a otros alimentos sin detalles adicionales (EFSA, 2016).

Características Taxonómicas de los *vibrios*

Los *vibrios* fueron uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descritos taxonómicamente durante los estudios sobre el cólera (Pacini, 1854). Las especies del género *Vibrio* presentan una morfología bacilar recta o curvada, son Gram-negativas y miden entre 0.5-0.8 μm de diámetro y 1.4-2.6 μm de largo (McLaughlin, 1995; Farmer *et al.*, 2005). Cuando crecen en condiciones de laboratorio, frecuentemente revierten su morfología a bacilos rectos (Atlas, 1997). Toleran un amplio rango de salinidades, con un óptimo requerimiento de NaCl que va entre 2.0 a 2.5% (peso/volumen). Algunas especies halófilas, requieren una concentración de 0.5% de NaCl en el medio para poder crecer, mientras que especies no halófilas como *V. cholerae*, *V. mimicus* o *V. hispanicus*, pueden crecer con concentraciones mínimas de sal (Gómez-Gil *et al.*, 2004).

Vibriosis

Si bien, existen varios tipos de *Vibrio*, todos se caracterizan comúnmente, por causar diarrea acuosa, acompañada de cólicos abdominales, náuseas, vómitos y fiebre. También, los *Vibrios* pueden causar infecciones en las heridas o los tejidos blandos. En las personas con afecciones subyacentes, especialmente enfermedad hepática, las bacterias *Vibrio* pueden causar infecciones del torrente sanguíneo, caracterizadas por fiebre, escalofríos, presión arterial peligrosamente baja, lesiones en la piel con ampollas y a veces, hasta la muerte (Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU, 2011).

Patogenicidad

Las especies de *Vibrio* varían considerablemente en su patogenicidad y aún no se han definido las causas de su aparición y epidemiología. Esto es relevante debido a que ocasionan numerosos episodios patológicos, casos de mortalidad y grandes pérdidas

económicas, y también, alteraciones sociales en la población dedicada a industrias extractivas y procesadoras de productos del mar (Beaz, 2009; Hernández, 2005).

V. cholerae

El cólera se ha manifestado como una enfermedad epidémica desde la antigüedad y las manifestaciones clínicas de la infección varían desde una infección asintomática hasta una diarrea severa. La patología en su forma más severa, se caracteriza por una profusa diarrea acuosa (deposiciones como “agua de arroz”), vómitos y deshidratación con gran pérdida de sales y agua. Si no es tratada adecuadamente, puede desencadenarse un shock hipovolémico, acidosis metabólica, falla renal y la muerte. Estas manifestaciones clínicas fueron atribuidas a la presencia de la toxina de cólera (CT) en *V. cholerae*, que fue demostrada en 1959 por científicos de la India (De SN, 1959). En 1987, se identificó un factor de virulencia adicional, implicado en la adherencia de *V. cholerae* a células intestinales que se denominó “*toxin coregulated pilus*” (TCP) (Taylor *et al.*, 1987). En base a diferencias en el antígeno somático “O”, *V. cholerae* ha sido clasificado en numerosos serogrupos, siendo reconocidos al menos 200 hasta el año 1997 (Yamai *et al.*, 1997). De estos serogrupos, sólo el O1 y más recientemente, el O:139 (Kaper, 1995) han causado epidemias de cólera. Sin embargo, cepas pertenecientes a serogrupos no-O1 y no-O139, han sido aisladas de pacientes con síntomas que van desde diarrea leve hasta deshidratación severa semejante a cólera (Levine, 1988). Por otra parte, *V. cholerae* no-O1 puede causar infecciones tales como: apendicitis aguda, colecistitis aguda, otitis media, celulitis, neumonía, meningoencefalitis y septicemia (Sanyal *et al.*, 1992). Estas lesiones indicarían que estas cepas podrían tener propiedades invasivas en adición a su enterotoxicidad. Actualmente, la clasificación más aceptada de *V. cholerae* consta del serogrupo O: 1 que se clasifica en 2 biotipos: Clásico y El Tor, el serogrupo O: 139 y el grupo de *V. cholerae* no O: 1 y no O:139 (Farfán, 2002; Sánchez, 2005).

Clasificación Serológica

La clasificación de *V. cholerae* en serogrupos o serovares se realiza en función de la composición del antígeno “O” o antígeno de la pared celular (somático) (Faruque *et*

al., 1998), este antígeno es termoestable y está compuesto por un homopolímero que contiene el aminoácido D-perosamina en el que los grupos amino están acilados por el ácido 3-deoxi-L-glicero-tetronico. El antígeno O de *V. cholerae* consta de tres factores designados como A, B y C, donde el factor A posiblemente es el homopolímero D-perosamina, pero la naturaleza de los otros dos factores aún no se conoce (Koper *et al.*, 1995).

***V. cholerae* Serogrupo O:1**

A este serogrupo pertenecen las cepas que poseen el antígeno de superficie O, productoras de la toxina del cólera (TC) y asociadas con las epidemias y pandemias de cólera en el mundo. También se han encontrado cepas del serogrupo O:1 que no producen TC y no poseen los genes que la codifican. Entre estas se encuentran cepas de origen ambiental que se han considerado no patógenas y otras que se han recuperado de casos ocasionales de diarrea o de pacientes con infecciones extraintestinales. Este serogrupo a su vez se puede subdividir en tres serotipos o subtipos que se diferencian por la expresión de los factores del antígeno O y se han denominado Ogawa, Inaba e Hikojima, aunque ésta última forma antigénica no se aísla con mucha frecuencia y es inestable (Koper *et al.*, 1995) (cuadro 1). Así mismo, cada serotipo se puede dividir en dos biotipos, el biotipo Clásico y el biotipo El Tor. Esta distinción se basa en características bioquímicas y en la susceptibilidad a bacteriófagos (Foruque *et al.*, 1998).

Cuadro 1. Determinantes antigénicos de *V. cholerae*.

Serotipo	Antígenos O
Ogawa*	A, B
Inaba	A, C
Hikojima	A, B, C

* También produce pequeñas cantidades del factor C

Tomado de: Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology [UWDB]. 2005.

Seroconversión

Con el avance significativo en el estudio genético de *V. cholerae* y la secuenciación, se ha confirmado la gran versatilidad de este microorganismo y se ha estudiado un fenómeno reportado por algunos autores llamado la seroconversión (Anwarul, 1996). Se ha establecido que existen mecanismos como la transferencia horizontal de material genético para producir la conversión de un serotipo a otro, lo que ayudaría a comprender la complejidad de la enfermedad (Colwell, 2004). Esta conversión ha sido estudiada en el caso de *V. cholerae* O: 1 y *V. cholerae* no O: 1 donde la seroconversión de una cepa a otra ha sido demostrada bajo condiciones de laboratorio, en condiciones de salinidad y temperaturas cercanas a las de un estuario de agua de mar, por lo que se sugiere que es un fenómeno que ocurre comúnmente en la naturaleza (Anwarul, 1996). A nivel molecular, las cepas que han presentado esta conversión de un serotipo a otro, presentan una región *wb* que es una región altamente conservada, la cual codifica para la biosíntesis del antígeno O1. Por lo cual, esta región con un cambio en un nucleótido del gen (*wbeT*). El producto del gen *wbeT* de *V. cholerae* O1, no es esencial para la biosíntesis del antígeno O, pero se requiere para la determinar la especificidad del serotipo Ogawa. Esto se ha podido estudiar en cepas de los serotipos Inaba las cuales presentan la mutación *wbeT* y presumiblemente, adquirieron la mutación por una presión inmune en la población (Taneja, 2005) (Taneja, 2005). Las cepas de *V. cholerae* O1 son conocidas también por su interconversión entre los serotipos Ogawa e Inaba. La frecuencia de conversión de Ogawa a Inaba es aproximadamente de 10^{-5} mientras que la conversión de Inaba a Ogawa es muy rara (Pallavi *et al.*, 2000). Pallavi *et al.* (2000) determinaron a través de RFLP, que las cepas de *V. cholerae* O1 serotipo Inaba emergentes en los brotes de 1998 y 1999 en la India, pertenecen a cepas de *V. cholerae* O1 Ogawa biotipo El Tor seroconvertidas al serotipo Inaba, porque solo presentaron la mutación *wbeT*.

Biotipos

El biotipo predominante hasta la séptima pandemia fue el Clásico, mientras que el biotipo El Tor solo se ha asociado a casos de diarrea muy esporádicos. Pero en la séptima pandemia la mayoría de aislamientos fueron del biotipo El Tor. Bangladesh es

el único país donde se ha aislado el biotipo Clásico (Koper *et al.*, 1995). La diferenciación de los biotipos se realiza mediante las pruebas fenotípicas mencionadas en el cuadro 2, de las cuales la reacción de Voges-Proskauer, la susceptibilidad a la polimixina B y la hemaglutinación de eritrocitos de pollo, son las más útiles. A través del estudio con bacteriófagos, se determinó que la lisogénesis ocurre más frecuentemente en el biotipo El Tor que en el biotipo Clásico, lo que explicaría entonces la mayor resistencia a antibióticos (Colwell, 2004). Genéticamente, el biotipo Clásico presenta la ausencia de 7 genes estructurales en comparación con el biotipo El Tor, el cual es actualmente el biotipo predominante a nivel mundial. Estudios recientes han demostrado que el biotipo Clásico se encuentra en extinción. Sin embargo, se ha determinado la presencia de nuevas cepas híbridas naturales entre los biotipos Clásico y El Tor. Los estudios de estas cepas presentan una cercana relación evolutiva con el biotipo Clásico, pero también presentan rasgos típicos del biotipo El Tor. Estos nuevos híbridos fueron aislados en pacientes con cólera en Mozambique en el 2004 y su aparición genera incertidumbre sobre si estos tipos de cepas generan un peligro para próximas pandemias (Ashrafus *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Diferenciación de los Biotipos Clásico y El Tor de *V. cholerae* O:1.

Prueba	Resultado para cada biotipo	
	Clásico	El Tor
Hemólisis	-	+
Aglutinación de Eritrocitos de Pollo	-	+
Voges-Proskauer	-	+
Inhibición por Polimixina B (Disco de 50 U)	+	-
Lisis por Bacteriófago Clásico IV	+	-
Lisis por Bacteriófago FK	+	-

(Koper et al 1995)

***V. cholerae* SEROGRUPO O:139 – BENGAL**

Con la epidemia de 1993 en India y Bangladesh, la clasificación de *V. cholerae* quedó obsoleta ya que el agente causal, que inicialmente fue considerado parte del grupo de cepas *V. cholerae* no O:1, no aglutinaba en presencia del antisuero O y en realidad no pertenecía a ninguno de los 138 serogrupos O ya existentes. Por tanto, era un nuevo

serogrupo, que posteriormente fue denominado O:139 o Bengal debido al lugar de origen de esta cepa (Foruque *et al.*, 1998; Koper *et al.*, 1995). Las cepas O:139 son idénticas en cuanto a los factores de virulencia como la toxina y el TCP (toxin-coregulated pilis), a las cepas de *V. cholerae* O:1 El Tor (Koper *et al.*, 1995), y además, causa la enfermedad con similar severidad clínica. Sin embargo, a diferencia de las cepas O:1, las O:139 están encapsuladas y el antígeno incluye un antígeno O de cápsula y un lipopolisacárido bacteriano sin antígeno O que le confiere mayor resistencia al ambiente y permite mayor virulencia (Foruque *et al.*, 2003). Actualmente, basados en los análisis de las regiones genéticas implicadas en la biosíntesis del antígeno O en cepas O:1 y O:139, se cree que el origen del serogrupo O:139 se debe a un evento de recombinación homóloga que produjo el reemplazo completo de la región *wbe* donde se encuentran los genes codificantes del antígeno O para el serogrupo O:1, por la región *wbf* propia del serogrupo O:139. Por otra parte, debido al interés por identificar la cepa progenitora y la cepa donante de la región *wbf*, se han realizado diferentes estudios comparativos tanto químicos como moleculares de cepas de varios serogrupos que han conducido a pensar que una cepa del serogrupo O:22 fue la donadora de la región mencionada, pero para el caso de la cepa progenitora, debido a la gran diversidad encontrada dentro del serogrupo O:139, se cree que existen múltiples posibles progenitores (Foruque *et al.*, 2003).

***V. cholerae* no O:1 y no O:139**

Antes del surgimiento del serogrupo O:139, en este grupo se clasificaban todas las cepas identificadas mediante pruebas bioquímicas como *V. cholerae* pero que no fueran del serogrupo O:1. Actualmente, las cepas no O:1 y no O:139 se han dividido en los serogrupos O:2 hasta O:138, basados nuevamente en el antígeno O. La mayoría de estas cepas no tienen los genes que codifican para la toxina CT, Zot, pero un 6.8% de las cepas producen una proteína citotóxica parecida a las hemolisinas presentes en el biotipo El Tor, lo que sugiere que el gen de esta toxina viene por transferencia de otras especies (Oliver Kaper, 1999). Actualmente, no se han determinado los posibles genes de virulencia para estas cepas no-toxigénicas (Carsten, 2005). Aunque estas cepas no se han asociado con epidemias de diarrea,

son aisladas ocasionalmente de casos de diarrea (Nair, 2000; Red mundial, 2005), y se asocian con frecuencia al consumo de moluscos (Koper *et al.*, 1995). Además, han sido aisladas de una variedad de infecciones extraintestinales, de heridas, del oído, esputo y orina (Koper *et al.*, 1995). También son cepas ubicuas en ambientes de estuario y sus infecciones son de origen ambiental (Nair, 2000; Red Mundial, 2005). También, hay reportes de estas cepas no O:1 y no O:139 como agentes causales de gastroenteritis, septicemia y meningitis, en pacientes pediátricos y con insuficiencia renal crónica (Dhar, 2004). Actualmente, se está estudiando la importancia de estas cepas en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos a cepas *V. cholerae* O:1 y O:139 (Krishna *et al.*, 2005).

V. vulnificus

V. vulnificus es parte de la microbiota normal de las aguas de los estuarios y se encuentra en grandes cantidades en los moluscos de todo el mundo, particularmente en los meses más cálidos. Este patógeno oportunista ha sido aislado de diferentes fuentes ambientales, que incluyen agua, sedimentos y productos del mar (O'Neill *et al.*, 1992; DePaola *et al.*, 1994; Høi *et al.*, 1998; Bisharat *et al.*, 1999; do Nascimento *et al.*, 2001; Baffone *et al.*, 2006; Baker-Austin *et al.*, 2010). Las infecciones humanas asociadas con esta bacteria se originan de dos fuentes distintas: el consumo de mariscos (septicemias primarias) o la exposición al agua de mar o productos del mar (infecciones de heridas). Las infecciones por septicemia suelen aparecer después de la ingestión de moluscos crudos o poco cocidos, principalmente ostras, donde ocurre en grandes cantidades (10^5 x g o más). *V. vulnificus* es un patógeno humano grave, responsable de más del 95% de las muertes relacionadas con los mariscos en los EEUU (Jones y Oliver, 2009) y tiene la tasa de mortalidad más alta de cualquier patógeno transmitido por los alimentos (Rippey, 1994). Una revisión de 459 casos estadounidenses notificados a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) entre 1992 y 2007 reveló que el 51.6% de los pacientes infectados con *V. vulnificus* murieron (Jones y Oliver, 2009). Esta sorprendente tasa de letalidad es similar a un rango de patógenos de categoría de nivel de bioseguridad (BSL) 3 y 4, como el ántrax, la peste bubónica, el ébola y la fiebre de Marburgo. Las

infecciones de heridas asociadas con *V. vulnificus* generalmente se contraen durante actividades recreativas como nadar, pescar y manipular mariscos (Oliver, 2005; Baker-Austin *et al.*, 2012b). Las infecciones de heridas por contacto directo con agua contaminada pueden causar gastroenteritis y septicemia primaria, además de infección de tejidos blandos con inflamación y necrosis de fascia y músculo. Se han reportado casos de neumonía, meningitis, osteomielitis y peritonitis primaria (Hlady y Klontz, 1996; Porras y Viana, 1994). El principal factor de riesgo de infección es la enfermedad hepática crónica y con menor peso, el uso crónico de esteroides, la insuficiencia renal, la artritis gotosa, el alcoholismo y la diabetes mellitus. (Hlady y Klontz, 1996; Eastaugh y Shepherd, 1989).

Genotipos de *V. vulnificus*

En la actualidad se han descrito dos genotipos en *V. vulnificus*, uno asociado a muestras ambientales (genotipo-E) y otro asociado a muestras clínicas (genotipo-C) (Rosche *et al.*, 2010; Morrison *et al.*, 2012). La divergencia genética entre los genotipos incluye análisis basados en ARN ribosomal (ARNr) 16S (Aznar *et al.*, 1994; Kim y Jeong, 2001; Nilsson *et al.*, 2003; Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2006), dimorfismo del gen de correlación a la virulencia (vcg) (Rosche *et al.*, 2005 y 2010), análisis de secuencias multilocus (MLST) (Bisharat *et al.*, 2005 y 2007; Cohen *et al.*, 2007; Bier *et al.*, 2013) y análisis comparativo del genoma (Morrison *et al.*, 2012). Se han utilizado diferentes marcadores moleculares para identificar cepas asociadas a casos clínicos o potencialmente patógenas al humano (Roig *et al.*, 2010; Yongjun *et al.*, 2010), siendo el más común el uso del gen vcg propuesto por Rosche *et al.* (2005).

Patogenicidad

Se han descrito diversos mecanismos de patogenicidad tales como: hemolisinas, colagenasa, elastasa, factor de permeabilidad vascular, fosfolipasa A2, lipofosfolipasa, sideróforos y polisacáridos capsulares, y además, toxinas que causan la lisis en los eritrocitos y lesiones tisulares. Esta especie presenta una particular resistencia a la actividad bactericida del suero y a la fagocitosis por polimorfonucleares y macrófagos,

atribuida a la presencia de un antígeno capsular de superficie, con propiedad antifagocitaria (Gutiérrez y Martos, 1997).

Gen rtxA1, como factor de patogenicidad en *V. vulnificus*

Al igual que en la gran mayoría de los *vibrios*, en esta especie los principales factores de patogenicidad están localizados en el cromosoma-II, cuyos genes codifican para polisacáridos capsulares, sistemas de asimilación de hierro, citolisina-hemolisina (VvhA), metaloproteasa (Vvp), fosfolipasa (Vpl) y la toxina “*Multifunctional Autoprocessing Repeats-in-Toxin*” o denominada simplemente como MARTXVv (Boyd *et al.*, 2008; Roig *et al.*, 2011; Kwak *et al.*, 2011). Debido a que estos factores también se detectan en cepas aisladas del ambiente, se asume que todas las cepas de *V. vulnificus* son capaces de causar infección o ser potencialmente patógenas (Thiaville *et al.*, 2011). La Toxina MARTXVv es uno de los factores de patogenicidad de *V. vulnificus* (Kim *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010). Esta toxina puede inducir apoptosis afectando diversas vías metabólicas (Lee *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010), también tiene actividad hemolítica y puede inducir un rearrreglo en el citoesqueleto o la formación de protuberancias, lo cual induce a la necrosis, por lo que ha sido considerado el principal factor de patogenicidad en *V. vulnificus* (Kim *et al.*, 2008; Kwak *et al.*, 2011). Las cepas a las cuales se les ha eliminado el gen rtxA1, que codifica para MARTXVv, disminuyen considerablemente su virulencia (Kwak *et al.*, 2011), así como su capacidad de supervivencia, por lo cual se considera que esta proteína puede estar implicada en la defensa de la bacteria evitando la fagocitosis (Lo *et al.*, 2011). Recientemente, Jeong y Satchell (2012) demostraron que la presencia del gen rtxA1 es esencial durante los primeros momentos de la infección promoviendo la diseminación de la bacteria. El gen rtxA1 presenta dos zonas conservadas las cuales se encuentran en los extremos (región N y C de MARTXVv, Figura 1). Estas regiones pueden presentar hasta un 97% de similitud entre las diferentes especies (Satchell, 2007). Actualmente, se han descrito 7 dominios para rtxA1 en *V. vulnificus*; estos dominios presentan diferentes funciones y han sido denominados como DUF (“*Domain of unknown function*”), RID (“*Rho GTPase*”), α/β (“ α/β -Hydrolase”), Mcf (“*Makes Caterpillar Floppy*”), CPD (“*Conserved cysteine protease domain*”), ACD (“*Actin Cross-*

linking domain”) y el dominio PMT C1/C2, el cual tiene similitud con los dominios C1 y C2 de la toxina de *Pasteurella multocida* (Kwak *et al.*, 20011; Roig *et al.*, 2011).

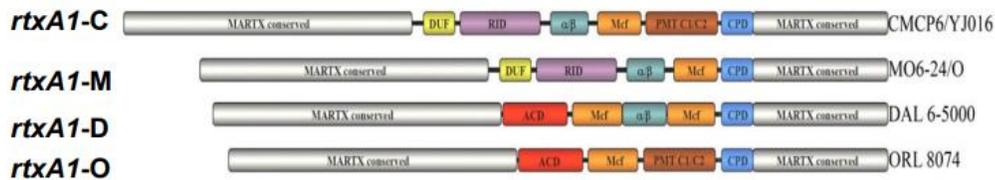


Figura 1. Estructura y organización de la toxina MARTXVv de *V. vulnificus* codificada por el gen rtxA1. Tomado de Kwak *et al.* (2011).

Infección por *V. vulnificus*

El periodo de incubación de la enfermedad es de 3 h a 2 días, y afecta principalmente a los enfermos hepáticos con elevados niveles de hierro sérico, produciendo hidroxilatos, fenolatos y lactoferrina, que en el suero compiten con la transferrina por el hierro, representado el mayor factor para el inicio de la infección. Otros factores de riesgo son: desórdenes hematopoyéticos, enfermedad renal crónica, enfermedad gástrica, diabetes y el uso de inmunosupresivos, por lo que se considera un patógeno humano oportunista. La mayoría de los pacientes se recuperan de la septicemia, pero depende directamente de la administración de los antibióticos donde las tetraciclinas son las más efectivas (Oliver y Kaper, 1999). La dosis infecciosa por la ingestión de *V. vulnificus* es en gran parte desconocida, ya que los estudios de alimentación humana que involucren a este organismo no son éticos. La Evaluación de Riesgo de *V. vulnificus* por la FAO/OMS, basada en los datos epidemiológicos y estimaciones de EEUU, indica que una dosis de 1000 organismos pueden causar la enfermedad (CDC, 2013). Las infecciones de heridas causadas por *V. vulnificus* se caracterizan por inflamación en el sitio de la herida, que puede progresar a celulitis, lesiones ampollas y necrosis. Los síntomas que pueden desarrollar son fiebre, escalofríos, alteración del estado mental e hipotensión y algunos casos requieren intervención quirúrgica o amputación. La gastroenteritis causada por *V. vulnificus* se caracteriza por fiebre, diarrea, calambres abdominales, náuseas y vómitos (Chuang *et al.*, 1992; Strom y

Paranjpye, 2000). El diagnóstico se da a partir del cultivo del organismo presente en heridas, heces diarreicas o sangre (CDC, 2013).

V. parahemolyticus

Patogenicidad

A pesar de la amplia distribución de *V. parahaemolyticus* en el medio marino, solo algunas cepas son señaladas como agentes causantes de problemas de salud en el humano, siendo aquellas que presentan las hemolisinas TDH y TRH (Sakurai *et al.*, 1973; Osawa *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 2000). Algunos autores señalan que >99% de las cepas de *V. parahaemolyticus* obtenidas de medio ambiente carecen de los genes *tdh* y *trh* que codifican para estas toxinas (Thompson y Vanderzant, 1976; DePaola *et al.*, 2000; Cook *et al.*, 2002; Bilung *et al.*, 2005; Deepanjali *et al.*, 2005). La cepa que produce la hemolisina TDH o Kanagawa, es termoestable pero sensible a la tripsina, es letal, citotóxica, cardiopática, produce edemas, eritemas, aumenta la permeabilidad capilar y presenta una actividad biológica que puede mantener bajo condiciones ordinarias de cocción de los alimentos, lo que representa un alto riesgo a la salud humana. Estudios demuestran que la toxina está codificada por los genes *tdh* y que también se puede detectar en otras cepas como *V. cholerae* no O1, *V. hollisae* y *V. mimicus*. Sin embargo, se requieren alrededor de 10^6 a 10^7 células viables para provocar una respuesta clínica (Kaper, 1995). Algunas cepas cultivadas a partir de aislamientos humanos producen otra hemolisina llamada TRH, la cual es termolábil y esta codificada por el gen *trh*. Esta hemolisina presenta características fisicoquímicas e inmunológicas muy similares con la TDH y se asocia a la gastroenteritis humana. Es importante tener en cuenta que de los aislamientos clínicos, solo en pocas ocasiones se observa la presencia de solo una de las dos hemolisinas, lo que sugiere una regulación y expresión de genes dependientes del medio. Otro factor importante en su patogénesis es su actividad como sideróforo, es decir que tiene la capacidad de secuestrar el 30% del hierro saturado en la sangre, a través de la producción de la vibrioferrina, aumentando así su supervivencia y proliferación *in vivo* (Oliver y Koper, 1997). Chiang *et al.*, (2005), encontraron que el choque térmico a 42°C por 45 min, logra generar daño en la membrana celular y aumenta el radio de susceptibilidad a los

ácidos tartárico, cítrico, láctico y acético, su temperatura óptima de desarrollo es de 37 - 44°C y la mínima en los medios de laboratorio es a 5°C, su pH de crecimiento es 7.48, con una concentración óptima de NaCl del 3%, su tiempo de generación más corto es de 16.4 min, con una concentración salina de 2.9%, el 90% de la población se destruye con temperaturas superiores a 48°C y se inactiva rápidamente por el efecto de la desecación (Fernández, 2000). Actualmente, se han descrito al menos 65 genes asociados a las cepas pandémicas de *V. parahaemolyticus*, que forman parte de una isla de patogenicidad VPal (80 kb), la cual contiene los genes *tdh*, *trh* y un conjunto de genes para el sistema de secreción del tipo III (Hida e Yamamoto, 1990; Izutsu *et al.*, 2008). Las VPal son elementos móviles que presentan genes asociados a patogenicidad como toxinas, así como elementos que pueden conferir resistencia a antibióticos, los cuales son adquiridos por transferencia horizontal. Se ha observado que *V. parahaemolyticus* presenta 7 islas de patogenicidad (VPal) que están principalmente asociadas a cepas patógenas, entre ellas el serotipo pandémico O3:K6 y sus serovariantes (O1:K25, O1:K56, O4:K68 y O4: KUT, entre otras), siendo de gran importancia en el estudio de la patogenicidad de esta especie (Faruque *et al.*, 2003; Raskin *et al.*, 2006; Nair *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2008).

Infección por *V. parahaemolyticus*

Los síntomas asociados a *V. parahaemolyticus* se pueden presentar en un periodo de incubación de 4 a 96 h. El cuadro clínico se considera autolimitante, de gravedad moderada y un promedio de duración de tres días en pacientes sanos, siendo la gastroenteritis la principal manifestación, cuyos síntomas son diarrea, náuseas, vómito, dolor de cabeza y fiebre, y en ocasiones, la diarrea es sanguinolenta, “como carne lavada”, denominación con la que se describe un tipo de heces de color rojizo acuoso, pero diferente del que se puede ver en otros cuadros diarreicos parecidos, como en los producidos por *Shigella* o amebas (CDC, 2013). Los casos de infección se presentan mayormente por gastroenteritis (51%) y en menor proporción, las infecciones de heridas (24%) y septicemia (17%) (Honda y Lida, 1993; Levine y Griffin, 1993; Hlady y Klontz, 1996). La duración de la enfermedad es de 2-3 días y no se han reconocido portadores sanos ni la transmisión de hombre-hombre. Estudios con

voluntarios muestran que la dosis infectiva es de 2×10^5 a 3×10^7 UFC, para desarrollar un cuadro diarreico gastrointestinal (Fernández, 2000). Sin embargo, en los brotes acontecidos en Canadá y EEUU durante 1997 y 1998 por consumo de ostras, el análisis de muestras evidenció valores inferiores a 200 UFC/g de carne de ostra, lo que sugiere que la enfermedad puede aparecer como consecuencia de la exposición del agente a niveles mucho más bajos de los que habitualmente se habían considerado (CDC, 1999). El CDC estima que solo se informa 1 de cada 20 casos de *V. parahaemolyticus* y es probable que la hospitalización y la muerte sean raras entre los casos no notificados. El diagnóstico se realiza mediante el cultivo del organismo a partir de las heces, la herida o la sangre de una persona (en casos de septicemia). Cualquiera que coma productos del mar crudos o mal cocidos, es susceptible a la infección por este organismo (CDC, 2013).

Métodos de aislamiento en medios de cultivos

Las especies de *Vibrio*, como muchas otras bacterias Gram negativas, crecen en presencia de niveles altos de sales biliares. Son anaerobias facultativas y crecen mejor en condiciones alcalinas. El aislamiento a partir de alimentos se facilita mediante el uso de medios formulados con un pH alcalino. El agua de peptona alcalina (APW) se usa comúnmente para aislar varias especies y, en el manual para el análisis Bacteriológico (por sus siglas en inglés BAM), se describen varias técnicas para el aislamiento, identificación y detección de vibrios, siendo una de estas la técnica del número más probable (NMP) aunque también se incluyen identificación mediante galerías bioquímicas y técnicas de base genética (BAM, 2001). El diluyente utilizado para la preparación de diluciones debe contener NaCl, por ejemplo, el PBS (solución salina tamponada con fosfato) (Elliot *et al.*, 1995).

El agar TSBC es un medio comúnmente utilizado para aislar *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Este medio favorece el buen crecimiento de la mayoría de las especies mientras inhibe a la mayoría de los no vibriones (Kobayashi *et al.*, 1963). Otro método para el aislamiento de *vibrio* consiste en utilizar Agar Cromogénico. Este es un medio para el aislamiento y la diferenciación selectiva de las especies de *Vibrio* en función de los colores de las UFC, debido a las actividades

enzimáticas β -galactosidasa y β -glucosidasa. Uno de los medios comogénicos empleados para el aislamiento de los vibrios en este trabajo fue el agar HardyCHROM que contiene un alto pH y una salinidad elevada que suprime el crecimiento de las especies distintas de *Vibrio* que se encuentran en muestras marinas. En este, las UFC de color malva se identifican como posibles *V. parahaemolyticus*, mientras que las UFC azules se identifican como posibles *V. vulnificus* o *V. cholerae* y las UFC incoloras se identifican como posibles *V. alginolyticus*. Este medio permite diferenciar claramente *V. parahaemolyticus* de *V. vulnificus* (Hara-Kudo *et al.*, 2001; Blanco-Abad *et al.*, 2009).

Condiciones ecológicas y factores ambientales asociados con la distribución de *Vibrios*

Los patógenos asociados con las enfermedades transmitidas por el agua, como es el caso de las infecciones por *Vibrio* tienen una gran dependencia de los factores físico-químicos y biológicos del ambiente, que van a modular su presencia y su abundancia mediante un equilibrio entre crecimiento y depredación. Variaciones en las condiciones ambientales y ecológicas del medio van a repercutir sobre la dinámica biológica de estos microorganismos, favoreciendo o limitando su abundancia, y promoviendo la aparición de infecciones cuando las condiciones ambientales permiten alcanzar altas cargas de organismos en alimentos marinos de consumo. Actualmente, se viene estudiando la compleja relación entre las condiciones ecológicas del medio y la dinámica poblacional de estos patógenos, con el fin de poder conocer qué variables son las críticas en el surgimiento de un proceso infeccioso o una epidemia (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008).

Temperatura del Agua

La temperatura es un factor fundamental para entender la dinámica poblacional de los *Vibrios*, ya que aumentos estacionales de temperatura del agua de mar inducen de forma directa la proliferación de estos organismos en el medio, alcanzando generalmente mayores densidades en las épocas de mayor temperatura, siempre y cuando los niveles de salinidad en esas épocas sean los óptimos para su expansión

demográfica. Se ha informado que la temperatura del agua de mar es uno de los principales factores ambientales que aumentan la abundancia de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en muchas áreas del mundo. El efecto positivo de la temperatura del agua de mar sobre la abundancia de *V. Parahaemolyticus*, se ha observado en regiones templadas con temperaturas bajas y moderadas y un patrón estacional claro, como son los casos en Francia (Deter *et al.*, 2010b), España (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008), el Golfo de México (DePaola *et al.*, 2003b) o la bahía de Chesapeake de los EEUU (Parveen *et al.*, 2008). Por el contrario, se ha demostrado que la temperatura del agua de mar tiene una influencia mínima en la abundancia de los *Vibrios* en áreas tropicales, donde los valores de la temperatura del agua permanecen casi constantes durante todo el año (Deepanjali *et al.*, 2005).

Salinidad

La salinidad es un factor crítico que regula la distribución de las distintas especies de *Vibrio* en función de su afinidad o presión osmótica óptima. De esta forma, se conoce que *V. cholerae* tiene afinidad por aguas más salobres que *V. parahaemolyticus*, lo que hace que su distribución a lo largo de las zonas costeras y estuarios, esté en función de los gradientes de salinidad existentes (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008).

También se ha demostrado que la salinidad juega un papel importante en la ecología de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* y ha sido identificado como el factor principal que rige la distribución de *V. parahaemolyticus* en áreas con valores de salinidad más cercanos a las aguas oceánicas (35 ppt). La mayor incidencia de *V. parahaemolyticus* característicamente ocurrió en períodos y áreas con valores más bajos de salinidad (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008). Sin embargo, el efecto de la salinidad es menos significativo en regiones donde este parámetro alcanza valores favorables para la supervivencia de los *Vibrios* o muestra variaciones mínimas a lo largo del año (Parveen *et al.*, 2008).

Relación con el zooplancton

Diversos estudios han demostrado que *Vibrio* spp, constituye una porción significativa de la microbiota natural del plancton, especialmente del zooplancton con exoesqueleto

de quitina, como los copépodos. Por lo tanto, la relación que existe entre ellos podría explicar la persistencia durante todo el año de los *Vibrios*. En consecuencia, la densidad de *V. parahaemolyticus* en el agua de mar podría estar controlada por los mismos parámetros que causan variaciones en las poblaciones de zooplancton, entre los que se encuentran la temperatura, luminosidad, corrientes marinas, concentración de nutrientes y concentración del fitoplancton, entre otros (Kaneko y Colwell, 1975; Sakar *et al.*, 1983; Watkins y Cabelli, 1985).

V. vulnificus está ampliamente distribuido en los estuarios y ambientes marinos naturales con temperaturas superiores a 25°C, se aísla principalmente de agua de mar, plancton, tracto intestinal de peces, ostras, almejas, cangrejos y anguilas (Gutiérrez y Martos, 1997).

Otros Factores Ambientales

Además de la temperatura y la salinidad del agua de mar, se han identificado algunos factores abióticos y bióticos adicionales que modulan la presencia y abundancia de *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en aguas costeras de todo el mundo. Sin embargo, los efectos de estas variables no son concluyentes y en algunos casos, se ha informado en un estudio particular que afecta un área específica. Es probable que haya una serie de factores que interactúan y no son mutuamente independientes, lo que provoca fluctuaciones en la prevalencia y concentración de estas especies en el ambiente natural y los animales marinos en un período de tiempo determinado. Se ha informado que la clorofila influye positivamente en la abundancia de *V. parahaemolyticus* en las costas de Francia, aunque también se ha informado de un efecto contrario para el noroeste de España (Martínez-Urtaza *et al.*, 2008; Deter *et al.*, 2010b).

Se ha propuesto a los bacteriófagos, abundantes en mariscos y agua de mar, como agentes potenciales que influyen en la concentración de *V. parahaemolyticus*. La lisis bacteriana durante el ciclo de replicación del fago daría como resultado una reducción de las poblaciones bacterianas viables. Los fagos específicos de *V. parahaemolyticus*, VP93 y VP58.5, que se han descrito recientemente en Chile, se sugieren como una posible causa del aumento y la disminución, respectivamente, de las infecciones

asociadas con la pandemia de *V. parahaemolyticus* O3:K6 en este país (Zabala *et al.*, 2009; Bastías *et al.*, 2010). El bacteriófago lítico VP93 puede haber favorecido inicialmente el crecimiento de las cepas pandémicas entre cepas similares sensibles a los fagos, mientras que el fago moderado VP 58.5 puede haber provocado la disminución al matar las células pandémicas y conferir una mayor sensibilidad a la luz ultravioleta a las células lisogenizadas resistentes a los fagos en el ambiente (García *et al.*, 2013).

Indicadores de contaminación fecal, coliformes termotolerantes y *E. coli*.

Los coliformes termotolerantes (antiguamente fecales), es un grupo de microorganismos que puede estar presente en el ambiente que rodea a los moluscos bivalvos. La utilización de estos microorganismos como indicadores de calidad microbiológica, ha sido una práctica establecida desde hace muchos años (Mossel y Moreno, 1985). El grupo de los coliformes termotolerantes está restringido a organismos que crecen en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y humanos. Incluye a los miembros de tres géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, y se pueden encontrar en productos marinos contaminados (Kueh y Chan, 1985; Frampton y Restaino, 1993).

El tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente está colonizado principalmente por *E. coli* pero este microorganismo puede ser ingerido a partir de alimentos o agua contaminada. Se ha establecido que cepas resistentes de *E. coli* pueden persistir por muchos meses o años en el ambiente (Quevedo y Gonzalez, 1994).

La frecuencia y gravedad de las infecciones por *E. coli* enteropatógena han sido reportados desde 1960 en los países menos desarrollados. Del mismo modo, ha sido confirmada como el agente causal de la llamada diarrea de los viajeros en el Norte de África, México y Santiago de Chile (Levine *et al.*, 1993). En la actualidad, los brotes por este patógeno son esporádicos y, por lo general, su incidencia se hace presente en aquellos países donde las prácticas de saneamiento son mínimas, y por ende, la contaminación a partir del consumo de agua y/o alimentos contaminados directa o

indirectamente (moscas o por las excretas de enfermos o portadores sanos) se ubican como los principales vehículos de transmisión de este patógeno (Blanco, 1990).

Moluscos de importancia comercial en Panamá

Los moluscos bivalvos (ostras, conchuela, almejas, mejillones), pertenecen al filo Mollusca, Clase Vivalvia. Poseen una particularidad muy especial y es que están cubiertos por dos conchas o valvas, formadas principalmente de carbonato de calcio. En el interior se encuentran sus partes blandas, las cuales están cubiertas por el manto. También poseen branquias que utilizan para respirar y filtrar el alimento, sistema digestivo, circulatorio, nervioso y las gónadas (Keen, 1971).

La importancia de los moluscos ha traspasado el valor escénico que tenía en tiempos pasados, ya que además de formar parte de la trama trófica, muchas especies están siendo utilizadas como recurso alimentario y Panamá no escapa de este escenario, y entre los moluscos de mayor importancia en Panamá se encuentran:

Leukoma asperrima

La almeja blanca *Leukoma asperrima*, anteriormente conocida como *Prothotaca asperrima*, del filo Mollusca, familia *Veneridae*, es un bivalvo de explotación intensiva por parte de los habitantes de la playa Bique, Arraiján, Panamá. Su concha es grisácea- amarillenta o blancuzca en adultos, con una gran variedad de manchas café en los estadios juveniles, que la confunden con el sustrato donde se localiza. Sus valvas poseen costillas finas dándole un aspecto áspero. Concha sub circular o sub ovalada, generalmente de aspecto tosco, moderadamente convexa y escultrada, pero muy toscamente, con radios. Los radios son escultrados y las costillas radiales tienden a disectarse de forma que se convierten en pares o tríos en el margen ventral (Cruz y Jiménez, 1994). Este bivalvo prefiere playas con un sustrato arenoso fangoso con mucha materia orgánica. Varias son las playas en nuestro país con las condiciones adecuadas para su desarrollo, entre los que se encuentran: Puerto Caimito, Bique, Punta Chame, en la provincia de Panamá Oeste; Garachiné y Taimití en la provincia de Darién; y Farallón en la provincia de Coclé. Sin embargo, es en playa Bique en donde esta actividad es de mayor concentración, supliendo de este bivalvo a la ciudad

de Panamá, a través de su comercialización en el Mercado del Marisco y otros puestos aledaños en la playa de Bique.



Figura 2. *L. asperrima*, foto de GB Sembrador (1835).

Donax punctatostriatus

En la provincia de Panamá, en el distrito de Chepo, las comunidades se dedican a diferentes actividades como la pesca, la extracción de almejas y la agricultura (a menor escala). La extracción de almejas (almejita) en playa Chinina, es utilizada para el consumo y la comercialización, pero de igual forma, no registra grandes ingresos a la economía familiar y se realiza de manera muy rudimentaria. Se calcula una extracción comercial alrededor de 50-80 libras del molusco por familia y el producto es vendido en el Puerto de Coquira (CREHO, 2010).

Son bivalvos del filo Mollusca, familia Donacidae. Estas almejas son de concha pequeña y ovalada, con el extremo anterior redondeado y el extremo posterior truncado. La forma es fácil de reconocer, a pesar de sus variaciones de color y forma, por los orificios en los espacios intermedios entre las costillas, siendo más grandes en el extremo anterior y con ligamento pequeño. La mayoría de los ejemplares de esta especie son de color marrón brillante, manchado ligeramente de color violeta. El interior de la concha también puede ser de color violeta y puede alcanzar los 45 mm de largo, son organismos dominantes en las playas arenosas (Keen, 1971; Cordoso, 2001).



Figura 3. *D. punctatostriatus*, foto de Femorale (2011).

Anadara tuberculosa

Son bivalvos del filo Mollusca, familia Arcidae. La extracción de la concha negra (*A. tuberculosa*), ha sido una actividad de sostenibilidad durante varias épocas para los pescadores artesanales en todo el Pacífico y, de igual forma, para las poblaciones de San Miguel, Montijo, Chiriqui, y en Espavé y Sajalices, en la provincia de Panamá Oeste, donde la tala descontrolada de los manglares y la sobreexplotación de las conchas en estado juvenil, pone en riesgo este recurso natural, disminuyendo considerablemente su presencia en los manglares del país. De acuerdo a datos de la dirección de MiAmbiente, desde el 2012 hasta el 2019, el manglar de Chame ha perdido 358.94 hectáreas producto de la tala ilegal. Las autoridades de MiAmbiente y ARAP realizan un proyecto de vivero de engorde de concha negra y restauración de la Bahía de Chame, para combatir la tala ilegal, donde se dará inicialmente la asistencia técnica, seguimiento y capacitación a los miembros de la comunidad, para que posteriormente, pueda ser atendido y administrado por ellos. Este proyecto va a ayudar a que haya un mejoramiento natural del área y la conservación de las poblaciones de moluscos (MiAmbiente, 2021). Estas almejas son de concha bien sólida, de contorno ovalado y moderadamente alargada, con superficie de color blanco, bajo una capa marrón o negra que le recubre el periostraco (Lucero *et al.*, 2007). Presenta unas 35 costillas (radiales) en cada valva, relativamente juntas. Vive casi completamente enterrada en el fango, desde la zona intermareal hasta unos 5 m de profundidad. Abundante en pantanos de manglares (Poutiers, 1995). El nombre científico hace alusión a la presencia de nódulos o tubérculos en las costillas: como el suelo del manglar es ácido, el periostraco se destruye a medida que el molusco

envejece y se observa el color de la concha blanca (figura 4) (Proyecto Nagoya en Panamá, 2016).

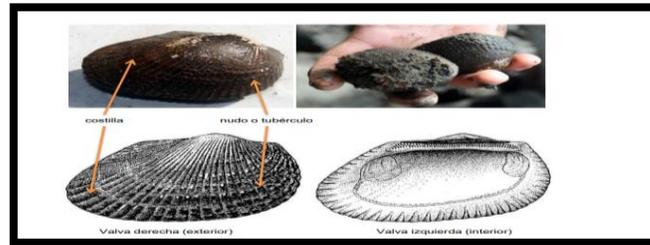


Figura 4. *A. tuberculosa*, Foto de Ángel Vega (1995).

La acuicultura en Panamá

La acuicultura en Panamá se inicia formalmente en los primeros años de la década de 1970, mediante proyectos comunitarios dirigidos a atender las necesidades nutricionales de distintas áreas marginadas. Los principales rubros de exportación acuícola lo conforman los camarones marinos (nauplios y post larvas, y producto entero o cola congelada), las truchas y la tilapia proveniente de la pesca en los grandes embalses. En la costa del Pacífico de Panamá se concentra el 95% de la actividad pesquera del país y el 80% de su población. La pesca es de suma importancia en nuestra economía, es el segundo producto de exportación después del banano, seguido el café, sandía y piña y representan una fuente de empleo considerable para las población, siendo los principales socios de exportación, España, República Popular de China, Corea del Sur, Países Bajos, Brasil, Estados Unidos, Japón, India, Bulgaria, Costa Rica y Guatemala (Panamá Digital, 2020). Los invertebrados marinos (langosta, camarón y moluscos), representaron entre el 2003 y 2012, un promedio del 11% del total de las exportaciones de los productos acuáticos, siendo el principal recurso de exportación el camarón (Posada *et al.*, 2014).

En Panamá, la acuicultura rural, especialmente de seda de pequeña escala y en especial, el cultivo de moluscos bivalvos como las almejas, que se alimentan en el primer eslabón de la cadena trófica y por tanto, no necesitan de insumos para su alimentación, suponen una alternativa de producción viable para las comunidades pesqueras que viven en condiciones de pobreza. El desarrollo del cultivo de moluscos

posee un gran potencial para contribuir al alivio de la pobreza, en la medida en que contribuye a la seguridad alimentaria de las comunidades, como fuente económica de proteína animal saludable, además de generar empleo y fuentes de ingreso alternativas a la pesca de extracción (Rodríguez, 2009).

La acuicultura a nivel mundial

De acuerdo con las estadísticas de la FAO (2020), la acuicultura marina y costera produce actualmente muchos más moluscos que peces de aleta y crustáceos. En 2018, los moluscos con concha representaron el 56.2% (17.3 millones de toneladas) de la producción de la acuicultura marina y costera, mientras que los peces de aleta (7.3 millones de toneladas) y los crustáceos (5.7 millones de toneladas) representaron conjuntamente el 42.5%. Los principales componentes de la producción de moluscos en 2018 fueron: los ostiones con el 29.5%, seguido de las almejas con un 23.6%, y las ostras, los mejillones y los pectínidos con un 11.0%, cada uno. Entre los principales productores acuícolas del mundo se encuentran China, Chile, Japón, la República de Corea, EEUU, Taiwán, Canadá, Francia, Italia y Nueva Zelanda (Cuadro 3). El cultivo de moluscos bivalvos en América Latina y el Caribe alcanzó unas 128,410 toneladas, con un valor estimado de 432 millones de dólares (FAO, 2020).

Cuadro 3. Principales productores acuícolas mundiales y regionales.

	Producción total	Producción de bivalvos	Proporción de bivalvos
	<i>(en miles de toneladas, peso vivo)</i>		<i>(porcentaje)</i>
China	47 559,1	13 358,3	28,1
Chile	1 266,1	376,9	29,8
Japón	642,9	350,4	54,5
República de Corea	568,4	391,1	68,8
Estados Unidos de América	468,2	181,1	38,7
España	347,8	287	82,5
Provincia china de Taiwán	283,2	75,8	26,8
Canadá	191,3	43,2	22,6
Francia	185,2	144,8	78,2
Italia	143,3	93,2	65
Nueva Zelanda	104,5	88,2	84,3

FUENTE: FAO.

La regulación ambiental

En el ámbito internacional, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), es la agencia reguladora en sanidad acuícola, es el ente encargado que se cumplan las normas, que son obligatorio para todos los países miembros, por lo que las Autoridades Competentes de cada país, están autorizados para comprobar que se cumplan. Hay otras organizaciones internacionales que se han enfocado en regular aspectos de la acuicultura como la FAO y en este, se trabajan las directrices técnicas sobre la certificación en la acuicultura. El Codex Alimentarius, contribuye a través de sus normas, directrices y códigos de prácticas alimentarias internacionales, a la inocuidad, la calidad y la equidad en el comercio internacional de alimentos. En el Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros (CAC/RCP 52-2003), se describe un programa de requisitos previos que comprende directrices tecnológicas y las condiciones esenciales de higiene para la producción de pescado y productos pesqueros (entre ellos los moluscos bivalvos) que resulten inocuos para el consumo humano y que cumplan con las restantes condiciones indicadas en las normas del Codex Alimentarius para los productos correspondientes (OMS y FAO, 2020). En cada país existen normas, acuerdos y procedimientos que ya se aplican a diversos aspectos de la acuicultura y su cadena de valor. La legislación sobre la acuicultura en la mayoría de los países se contempla en las leyes generales de pesca destinadas al ordenamiento de la actividad pesquera y acuícola, y en algunos casos, se norma la extracción y el desarrollo de la acuicultura para los moluscos (FAO, 2020).

La regulación ambiental del cultivo de moluscos, por ser una actividad que está en vías de desarrollo en la región centroamericana, es todavía escasa. Es una situación generalizada para todos los países de las zonas costeras de la región, en donde se realiza el cultivo o extracción de moluscos, en zonas de asentamiento de numerosas comunidades pesqueras que viven en condiciones de pobreza, en casas con una infraestructura limitada, que carecen de sistema de tratamiento para las aguas residuales y las aguas negras son vertidas directamente a los esteros. Y esto, aunado a que tampoco existen centros de depuración de moluscos y la inexistencia de una regulación para la calidad de las aguas destinadas al cultivo de moluscos, hace que los moluscos no reúnan las condiciones higiénico-sanitarias que los hagan aptos para

el consumo humano. Otro factor que también aumenta el riesgo de problemas sanitarios es el hábito de su consumo en crudo. También, el control de las Floraciones de Algas Nocivas (FANs), conocidas también como mareas rojas, ya que los moluscos, como organismos filtradores que se alimentan de microalgas, tienen la capacidad de acumular toxinas que producen las microalgas y estas toxinas suponen un riesgo muy grave para la salud (FAO, 2020).

Normativas vigentes en materia de sanidad e inocuidad acuícola-pesquera en Panamá

En Panamá, los proyectos de explotación acuícola están sujetos al Decreto Ejecutivo 209 del 5 de septiembre de 2006, por el que se regula que la explotación de criaderos de peces y granjas piscícolas, incluyendo cría de camarones, cocodrilos, tortugas, cangrejos, caracoles u otros productos del mar o agua dulce mayores de una hectárea, deberán someterse al proceso de evaluación de impacto ambiental, siendo MiAmbiente el que otorga el permiso de concesión acuícola (Rivero, 2009). Además, la extracción de moluscos en Panamá no está regulada ni sujeta a ningún tipo de control y tampoco existen datos de capturas por lo que se desconoce la situación de este recurso (Cáceres y Vásquez, 2014).

Clasificación de la zona de producción según SERNAPESCA (2018)

El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) es un organismo público chileno, que garantiza la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos de exportación, destinados al consumo, basado en la determinación de los niveles de coliformes termotolerantes y *E. coli* presentes en carne y líquido intervalvar de los moluscos o en las aguas de cultivo. Según los criterios de calidad sanitaria, estos se clasifican según las zonas de producción en (Cuadro 4):

Tipo A: Para consumo humano directo. Los recursos extraídos desde estas zonas pueden ser exportados en estado vivo, fresco refrigerado o procesado:

1. Poseer las características visuales propias de la frescura y la viabilidad, incluida la ausencia de suciedad en la concha, una reacción a la percusión adecuada y una cantidad normal de líquido intervalvar.
2. No contendrán *Salmonella* en 25 g de carne de molusco.
3. No contendrán *V. parahaemolyticus* en 15 g de carne de molusco.
4. En el caso de ostras, no contendrán Norovirus en 15 g de hepatopáncreas.
5. No contendrán compuestos tóxicos, ni nocivos de origen natural o introducidos en el ambiente en cantidades tales que la absorción alimentaria calculada supere la ingesta diaria admisible (IDA) para el hombre o que pueda deteriorar el sabor del producto.
6. La cantidad de veneno paralítico del molusco, VPM, en las partes comestibles (el cuerpo entero o toda la parte consumible separada) no deberá sobrepasar los 80 µg/100 g, según el método de análisis biológico.
7. El nivel máximo total de ácido okadaico, dinofisistoxinas y pectenotoxinas en moluscos bivalvos, equinodermos y tunicados (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado), será de 160 µg de equivalentes de ácido okadaico/kg, de acuerdo con el método biológico o con métodos de detección alternativos.
8. El nivel máximo de yesotoxinas en moluscos bivalvos, tunicados y equinodermos, será de 3.75 mg de esa toxina/kg, de acuerdo con el método biológico o con métodos de detección alternativos.
9. El nivel máximo de azaspirácidos en moluscos bivalvos, tunicados y equinodermos (el cuerpo entero o cualquier parte comestible por separado) será de 160 µg de equivalentes de azaspirácido/kg, de acuerdo con el método biológico.

Tipo B: Para depuración, reinstalación o aplicación de tratamientos térmicos aprobados:

1. Cumplir con los requisitos relativos a la presencia de toxinas marinas descritos para áreas Tipo A.

2. Someterse, previo a su consumo, a un tratamiento en un centro de depuración o reinstalación en una zona autorizada. Luego de su depuración o reinstalación, deberá cumplir todas las exigencias fijadas para zona Tipo A.
3. Someterse, previo a su consumo, a alguno de los procesos térmicos establecidos en el Capítulo I de la Sección II.

Tipo C: Para reinstalación por períodos largos de tiempo o aplicación de tratamientos térmicos:

1. Cumplir con los requisitos relativos a la presencia de toxinas marinas descritos para áreas Tipo A.
2. Destinarse a consumo humano, sólo luego de someterse a un tratamiento en una zona de reinstalación durante un periodo largo de tiempo, no inferior a dos meses.
3. Someterse, previo a su consumo, a alguno de los procesos térmicos establecidos en el Capítulo I de la Sección II.

Cuadro 4. Criterio para la clasificación de áreas de extracción de moluscos bivalvos, según las zonas de producción en función del número de coliformes termotolerantes y *E. coli*. SERNAPESCA (2018).

Categoría	Estándar microbiológico	Tratamiento requerido post-Cosecha
A	No deben sobrepasar, en un 80% de las muestras recolectadas durante el período de clasificación, 230 NMP de <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar. El restante 20% de las muestras no deben exceder los 700 NMP de <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar.	Ninguna

B	No deben exceder, en un 90% de las muestras, los 4600 NMP de <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar. En el 10% restante de las muestras, no deben superar los 46.000 NMP de <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar.	Depuración, reinstalación o cocido bajo un proceso térmico aprobado
C	Los moluscos bivalvos vivos de estas áreas no deben superar los 46.000 NMP de <i>E. coli</i> por 100 gr de carne y líquido intervalvar.	Reinstalación o cocido bajo un proceso térmico aprobado
Prohibida	>46000 NMP de <i>E. coli</i> /100 g de carne y líquido intervalvar	La cosecha no está permitida

Prevención en el manejo y consumo de bivalvos

No consumir los ostiones y pescado crudos, después de la captura de los bivalvos colocarlos en agua clorada durante 24 h, lavar perfectamente las valvas (conchas), cocinar los bivalvos (ostiones, almejas, mejillones) perfectamente, evitar la contaminación cruzada de los mariscos cocidos y de otros alimentos, con los mariscos y los jugos de los mariscos crudos, comer los bivalvos después de cocinar y refrigerar las sobras, evitar la exposición de heridas abiertas o de la piel quebrada, a la sal caliente o al agua salobre, o a los bivalvos crudos cosechados en tales aguas, usar ropa protectora (p. ej., guantes) al manejar los bivalvos crudos, evitar meterse al mar si se padece alguna enfermedad hepática o se está inmunodeficiente (cáncer, VIH, lupus, leucemia, hematopatías, etc.). Si se presenta una herida en el medio marino, salir del agua y atenderla tal y como si fuera cualquier lesión cortante o abrasiva (Zúñiga y Lozano, 2014).

Técnicas de detección

Importancia de la PCR

Los inicios de la PCR se remontan a 1971, cuando un artículo publicado por Kleppe en el *Journal of Molecular Biology*, describió por primera vez un método que usaba enzimas para replicar una secuencia pequeña de ADN *in vitro*. Sin embargo, este ensayo no recibió mucha atención y la autoría de la PCR fue atribuida 12 años después a Kary Mullis, perteneciente a la *Cetus Corporation*, California SA. La PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces, su uso se ha extendido a distintos laboratorios clínicos, ambientales y de veterinaria, para optimizar a nivel de especificidad, sensibilidad y rapidez, las mejores técnicas diagnósticas y los programas más adecuados en materia de prevención, control y tratamiento. Entre las alternativas diagnósticas propuestas a estos retos, se señalan las técnicas basadas en los principios de la biología molecular, que busca brindar apoyo en la obtención de resultados altamente confiables y además, acortando los tiempos de entrega de los mismos. La PCR significó una valiosa alternativa para el estudio de los genes y a partir de entonces, su uso se ha extendido a distintos laboratorios. La PCR ha sido ensayada con buenos resultados en una amplia gama de campos que abarcan desde la detección de agentes etiológicos, pasando por genotipificación, análisis de enfermedades genéticas y oncológicas, amplificación y modificación de fragmentos de ADN, análisis de especímenes ambientales y de marcadores genéticos para aplicaciones forenses, pruebas de paternidad, mapeo de rasgos hereditarios y hasta estudios de expresión de genes (Bell, 1989; Alvares y Pérez, 2012).

El hecho de estandarizar y optimizar aplicaciones individuales de la PCR, ha permitido desarrollar variantes del método. En este aspecto, toma gran interés, el desarrollo de la denominada PCR múltiples (multiplex-PCR o mPCR), reacción que consigue amplificar simultáneamente en un único tubo (y por ende una única reacción), para diferentes secuencias diana. A su vez, se han desarrollado protocolos de mPCR muy prometedores mediante la utilización de PCR en tiempo real (RT-PCR), de forma que se puede monitorizar la cinética de reacción, conocer la cantidad de ADN molde y/o detectar la presencia de variaciones genéticas (Bolívar *et al.*, 2014). Sin embargo, la

qPCR nos permite la detección de los productos de amplificación en el mismo momento en el que se están amplificando sin necesidad de realizar geles de agarosa. Además, permite la cuantificación de las moléculas de forma rápida y precisa (Costa, 2004). La qPCR ha sido aplicada por distintos autores para la detección de *V. parahaemolyticus* en ostras, langosta, almejas y diferentes especies de pescados (Cai *et al.*, 2006) y de *V. vulnificus* en pescado y en agua del Golfo de México (Panicker *et al.*, 2004). Existe otra tecnología basada en el uso de “huellas digitales” de ADN (El Sistema RiboPrinter), utilizan Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP, por sus siglas en inglés), segmentos de ADN que pueden identificar longitudes muy específicas para cada bacteria pudiendo identificar a nivel de cepa. Los RFLP son creados con enzimas de restricción, que son enzimas digestivas que comúnmente provienen de ADN bacteriano que corta en un sitio único de restricción (Higienda, 2017). En todos estos trabajos, se han obtenido resultados de detección y cuantificación muy específicos, con un límite de detección muy bajo, demostrando así ser más sensible que el cultivo o la PCR convencional (Bag *et al.*, 1999 Hernández *et al.*, 2005). Es de importancia comprender que, a pesar de estas ventajas, dichos métodos no sustituyen, sino que complementan los métodos de diagnóstico tradicional (Bell, 1989; Sint *et al.*, 2009).

Objetivos

Objetivo general

- Detección molecular y aislamiento de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en almejas provenientes de tres zonas de producción de Panamá.

Objetivos Específicos

- Aportar una introducción básica a los problemas de salud pública que puedan estar asociados al consumo de moluscos bivalvos, para garantizar la inocuidad de bivalvos-almejas que se comercializan en Panamá.
- Determinar la calidad microbiana de los moluscos bivalvos (almejas), mediante indicadores de contaminación fecal, coliformes termotolerantes y *E. coli*.
- Detectar molecularmente las especies de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus* en almejas provenientes de las tres zonas de producción de Panamá, mediante la Técnica de PCR múltiple en tiempo real.
- Estandarizar una PCR múltiple en tiempo final que identifique las especies de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus* simultáneamente, en almejas provenientes de tres zonas de producción de Panamá.
- Comparar los resultados de la Técnica de Aislamiento con la PCR múltiple en tiempo real y tiempo final.

Hipótesis de trabajo

Ha: Hay presencia de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en las almejas provenientes de tres zonas de producción de Panamá.

Ho: No hay presencia de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en almejas provenientes de tres zonas de producción de Panamá.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología

El muestreo se llevó a cabo en tres zonas de alta producción de almejas en Panamá: Bique, provincia de Panamá Oeste (*L. asperrima*), Espavé, provincia de Panamá Oeste (*A. tuberculosa*) y Chinina, provincia de Panamá (*D. punctatostratus*) (ver coordenadas geográficas de las zonas de colectas, Cuadro 5). Estos bivalvos son de alto consumo nacional. Durante la marea baja, las almejas fueron colectadas por los lugareños durante la temporada lluviosa, que corresponde a los meses de septiembre, octubre y noviembre del (2020) y en la temporada seca que corresponde a los meses de febrero, marzo y abril (2021).

Cuadro 5. Coordenadas geográficas de las zonas de Colectas.

ZONAS DE MUESTREO	UBICACIÓN
Playa Bique	8°53'37.14" N 79°39'23.33" O
El Espavé	8°39'29.78" N 79°52'56.82" O
Chinina	9°07'30.80" N 79°03'50.86" O

En cada mes se procesaron 5 muestras de cada una de las especies de almejas provenientes de las tres zonas de producción, siendo al final un total de 90 muestras entre la temporada seca y lluviosa, procesando las muestras como se muestra en el siguiente diagrama.



Figura 5. Diagrama de flujo del muestreo.

Toma y procesamiento de la muestra

La toma y preparación de las muestras se realizó bajo estrictas condiciones de asepsia. Las muestras fueron depositadas en bolsas estériles y, posteriormente, almacenadas en neveras con hielo, para su traslado en cadena de frío e inmediato procesamiento en los laboratorios LAMEXA y LAMA de la VIP, Universidad de Panamá. Las muestras se limpiaron con agua y un cepillo limpio para eliminar restos de arena y suciedad visible en las mismas, y una vez limpias, se les extrajo el cuerpo y líquido intervalvar, se pesaron 100 g de cada muestra, que se mezclaron con 100 mL de tampón fosfato estéril y se licuaron por un periodo de 5 min, con interrupciones de 5 s. Se preparó una alícuota de 25 g del licuado para su traslado en cadena de frío a las instalaciones del laboratorio de Alimento y Aguas de la compañía Food Safety S.A., para su procesamiento y detección de las tres especies de *Vibrio*, a través de la metodología de PCR múltiple en tiempo real.

Aislamiento de Vibrios y bacterias indicadoras (Coliformes termotolerantes y *E. coli*)

Los aislamientos fueron realizados por estudiantes de Licenciatura en Biología con Orientación en Microbiología y Parasitología como parte de su trabajo de graduación. Las muestras se procesaron utilizando el Manual del Programa Canadiense de Saneamiento de Mariscos (2010) y el Manual de Microbiología de Alimentos (2005).

Análisis microbiológico

Para el análisis de los indicadores de contaminación fecal, se pesaron 10 g del licuado y se agregaron en frascos con 90 mL de tampón fosfato estéril para obtener una dilución de 10^{-1} , de la dilución 10^{-1} se toma 10 mL y se agregaran a 90 mL de buffer para obtener una dilución 10^{-2} , hasta obtener diluciones seriadas de 10^{-3} , y procesarlas mediante la Técnica de Tubos Múltiples (Eaton *et al.*, 2005).

Bacterias Fermentadoras de Lactosa

Las diluciones de las muestras se sembraron en tubos de caldo Lauril Sulfato, empleando la Técnica de Tubos Múltiples, para determinar las bacterias

fermentadoras de lactosa. Posteriormente, los tubos fueron incubados a 37°C durante 48 h aproximadamente. Todo tubo que presentó crecimiento y gas en la cápsula de Durham, se consideró como positivo (Mclandsborough, 2005; American Public Health Association, 2005).

Aislamientos de Coliformes termotolerantes y *E. coli*

Los cultivos que salieron positivos en la prueba con caldo Lauril Triptosa, se inocularon en medio EC-MUG (medio para coliformes termotolerantes y *E. coli*). Luego, fueron incubados a 44°C por 24 a 48 h. Terminado el periodo de incubación, todos los medios con crecimiento y gas en la cápsula de Durham, se consideraron positivos para coliformes termotolerantes y los que presentaron fluorescencia, al ser expuestos a luz ultravioleta, se consideraron positivos para *E. coli* (Mclandsborough, 2005). Para la obtención de los resultados se anotó la combinación de los tubos positivos EC MUG y se determinó el NMP de *E. coli*/g de muestra (Canadian Shellfish Sanitation Program, 2002).

Caracterización de Cepas silvestres de *V.cholerae* y *V.vulnificus* en el Sistema de secuenciación por RiboPrinter (Ribotipificación)

Caracterización de Cepas silvestres de *V. cholerae* y *V. vulnificus* en el Sistema de Secuenciación por RiboPrinter (Ribotipificación).

Para los controles positivos se utilizaron cepas silvestres de la colección de la compañía FOOD SAFETY, que fueron secuenciadas mediante el Sistema RiboPrinter, utilizando un kit de secuenciación estandarizado (RiboPrinter, Microbial Characterization Systems, DuPont Qualicon, EEUU). Esta es una herramienta automatizada para la identificación y caracterización de aislados bacterianos por género, especie e incluso cepa, y que se utilizó para la identificación de cepas silvestres de *V. cholerae* y *V. vulnificus*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. En resumen, se seleccionó una Unidad Formadora de Colonia (UFC) y se transfirió a 40 µL del buffer de lisis, se agitó en el vórtex por 5 s. Después, se colocó la placa para portar la muestra en la gradilla y se transfirió 30 µL de la muestra a su pozo correspondiente. Luego, se colocó la placa en la estación de

tratamiento de calor, donde este proceso terminó en aproximadamente 25 min. Al finalizar este proceso, se adicionó 5 µL del agente de Lisis A, después 5 µL del agente de Lisis B y una vez finalizado el tratamiento térmico, se comenzó el procesamiento con el Sistema RiboPrinter, utilizando el kit comercial, que contenía por corrida de muestras: gel cassette, membrana, MP-base, MP conjugado, MP sustrato, MP sonda, enzima y ADN pre, donde este sistema automatizado terminó en un periodo de 6 h.

Identificación mediante técnica de PCR múltiple en tiempo real

Para la detección de los *Vibrios* se utilizó la técnica de PCR múltiple en tiempo real y para la extracción de ADN se siguió la metodología del Sistema BAX (AOAC 050902) que utiliza un kit comercial, para la detección simultánea de tres especies distintas de *Vibrio* (*V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus*).

Se pesaron 25 g de las muestras, se enriquecieron con 225 mL de agua peptonada alcalina y se incubaron a 35°C ± 1 por un periodo de 18 a 22 h. Se preparó el agente de lisis adicionando 150 µL de proteasa a 12 mL de tampón de lisis, de esta preparación, se transfirieron 200 µL del agente de lisis a cada tubo clúster, al que se le adicionó 5 µL de muestra. Las muestras fueron colocadas en un bloque térmico, para realizar los pasos de lisis, a 37°C por 20 min, 95°C por 10 min y 4°C por 15 min, se hidrataron las tabletas de PCR con 30 µL de los lisados, que contiene todos los reactivos necesarios para evitar el mínimo de contaminación, para la detección molecular. Luego se realizó automáticamente el proceso de termociclado por 1 h. Estos lisados se almacenaron a -20°C para analizarlos a través de la PCR-múltiple en tiempo final.

Estandarización de PCR múltiple en tiempo final

Protocolo para la extracción del ADN de cepas ATCC

Se extrajo el ADN genómico a partir de las UFC puras de las cepas ATCC de *V. parahaemolyticus*, y las cepas silvestres de *V. cholerae* y *V. vulnificus* de la colección de Food Safety S.A. Se pasaron tres UFC en 7 mL de medio nutritivo BHI (infusión cerebro corazón) por duplicado y se incubaron por 24 h para obtener un buen crecimiento.

La extracción se realizó mediante la metodología de precipitación por sales (Sambrook y Russell, 2001). En resumen, una vez crecido el cultivo durante 24h, se centrifugaron 2.5 mL de la suspensión de *Vibrio* a 5000 rpm por 5 min. Esto se repitió una vez más hasta obtener un pellet lo suficientemente grande de la muestra de bacterias. Este pellet se mezcló en 200 µL de la solución de lisis (40 mM Tris-acetato pH 7.8B, 20 mM sodium acetate, 1mM de EDTA, 1% de SDS) y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente (TA). Después, se mezclaron fuertemente en el vórtex hasta que se disolvió el pellet y se le añadió 66 µL de NaCl 1M, se centrifugó a 12000 rpm por 10 min, y luego, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se cuantificó el volumen, y posteriormente, se añadió el mismo volumen de cloroformo, se invirtió suavemente unas 5 veces, hasta que se formó una solución lechosa, y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min. Se extrajo el sobrenadante cuidadosamente, cuantificándolo, para posteriormente mezclarlo con dos volúmenes de isopropanol -70°C frío y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Seguido, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó una vez con etanol al 70%, se dejó secando a TA y se resuspendió con 20-25 µL de agua estéril libre de nucleasas. Se almacenó la solución de ácidos nucleicos a -20°C hasta su utilización.

Amplificación por PCR

Se verificó la identidad taxonómica de los aislamientos que se utilizaron en esta investigación mediante PCR utilizando los cebadores que se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 6. Secuencia de los iniciadores utilizados para la amplificación de los *Vibrios* en la PCR- Multiple en tiempo final.

Microorganismos	Primer	Secuencia	Gen que franquean	Tamaño	Autor
<i>V. cholerae</i>	groVc1	5'- GATCTTGACTGGCG GTGTTGTG-3'	<i>groEL</i>	417 pb	(Hossain et al., 2012)
	groVc2	5'- GTCACCCACCAGAG AAGAGAGT-3'			
<i>V. parahaemolyticus</i>	groVp1	5'- GTCAGGCTAAGCGC GTAAGCA-3'		644 pb	

	groVp2	5'- GCATGCCTGCGCTT TCTTTTG-3'			
<i>V. Vulnificus</i>	groVv1	5'- GTTCGCGCTGGTGA AGGTTCA- 3'		191 pb	
	groVv2	5'- TGGCATACCAGAGT CTTCTGTG-3'			

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µL, que contiene 1.5 mM de MgCL₂, 0.5 mM de cada dNTP (Applied Biosystems, CA, USA), 0.5 µM de cada cebador, 2 µL de la muestra de ADN y 1 U de Taq ADN polimerasa (Applied Biosystems, CA, EEUU) y solución tamponada (Buffer) 2.5 µL. Las condiciones de de la PCR según S.B Neogial (2010) y Hossain *et al.* (2012) fueron las siguientes: desnaturalización inicial 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 56.5°C por 1 min y extensión a 72°C por 1 min, terminando con una extensión final de 72°C por 5 min y almacenamiento a 4°C hasta el ∞ (termociclador Cycle Sequencing Applied Biosystems).

Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, y esta preparación se vertió en una cámara de electroforesis hasta solidificar. Posteriormente, se recubrió el gel de agarosa con el tampón Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) a una concentración de 0.5 X. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb, las muestras se mezclaron con 2 µL del tampón de corrida (*loading buffer*) y luego, se depositaron en cada pocillo, corriéndose a 120 V durante 1 h. Finalmente, se observó en un fotodocumentador con transiluminador de luz ultravioleta (UV), para tomar la foto y registrar los resultados.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba no paramétrica de Post Hoc Bonferroni de Kruskal-Wallis, U de Mann Whitney. Para la asociación de los *Vibrios* con los indicadores se utilizó la correlación de Spearman, dentro del programa SSPS versión 23 (IBM, 2013).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Determinación de los niveles de contaminación fecal por zonas de producción, según los criterios de calidad sanitaria SERNAPESCA (2018). Para este estudio solo se tomaron los valores de coliformes termotolerantes y *E. coli*, que son los parámetros microbiológicos utilizados en esta normativa, para la categorización de las zonas.

Distribución de coliformes totales (CT) por zonas de producción

De las 90 muestras analizadas, tanto de la temporada seca como la lluviosa, la distribución de coliformes totales en la zona de Chepo (Chinina), se mostró con los valores más elevados, presentando 7.45×10^5 NMP/100 g en la temporada seca y de 5.52×10^4 NMP/100 g en la temporada lluviosa, seguida de la zona de Bique con 1.79×10^4 NMP/100 g en la temporada seca y en la lluviosa 1.94×10^4 NMP/100 g. Siendo la zona de Chame, donde menos concentraciones de coliformes se encontró, reportándose 2.62×10^3 NMP/100 g en la temporada seca y 7.20×10^3 NMP/100 g en la temporada lluviosa (Cuadro 7).

Distribución de las coliformes termotolerantes (CTT) por zonas de producción

Las CTT por gramo de muestra presentaron mayor concentración en la zona de Chepo (Chinina), 1.70×10^4 NMP/100 g, en la temporada seca. Según la norma sanitaria, esta zona se ubica en categoría C y en la temporada lluviosa, se reportó en Bique una concentración de 1.89×10^3 NMP/100 g y en Chepo de 7.90×10^2 NMP/100 g, donde estas zonas se ubicaron en la categoría B. Por otro lado, Chame, en ambas temporadas, se ubicó dentro de categoría A, al igual que Bique en la temporada seca (Cuadro 7).

Distribución de *E. coli* (EC) por zonas de producción

Según la norma de calidad sanitaria, se ubican en la categoría A las zonas de Chame y Bique en la temporada seca, y Chame y Chepo en la temporada lluviosa, con niveles inferiores a 230 NMP de *E. coli* por cada 100 g de carne y líquido intervalvar. Por encima de estos niveles, en la categoría B, se ubica Chepo en la temporada seca con 3.90×10^3 NMP/100 g y Bique en la temporada lluviosa con 6.97×10^2 NMP/100 g (Cuadro 7).

Cuadro 7. Categorización de las zonas de producción mediante los indicadores de contaminación fecal.

Indicadores de contaminación fecal en almejas provenientes de tres zonas de producción en Panamá						
Estación	Zonas de producción	CT (NMP/100 g)	CTT (NMP/100 g)	Cat	EC (NMP/100 g)	Cat
Temporada seca	Chame (<i>Annadara</i>)	2620	169	A	66	A
	Bique (<i>Leukoma</i>)	17967	223	A	223	A
	Chepo (<i>Donax</i>)	745167	17007	C	3903	B
Temporada Lluviosa	Chame (<i>Annadara</i>)	7200	163	A	60	A
	Bique (<i>Leukoma</i>)	19400	1893	B	697	B
	Chepo (<i>Donax</i>)	55233	790	B	83	A

Cat: Categoría, CT: coliformes totales, CTT: coliformes termotolerantes, EC: *E. coli*

Análisis estadísticos de los indicadores por zonas de producción.

Al comparar las medias geométricas se observó que existen diferencias estadísticas significativas entre las zonas de muestreo (Bique, Chame y Chepo) en temporada lluviosa y seca, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis, para los CT: $H=13.49$; $p = 0.001$), para los CTT: $H = 14.19$; $p = 0.001$) y para EC: $H = 9.05$; $p = 0.11$), donde $p < 0.05$. (Fig. 6).

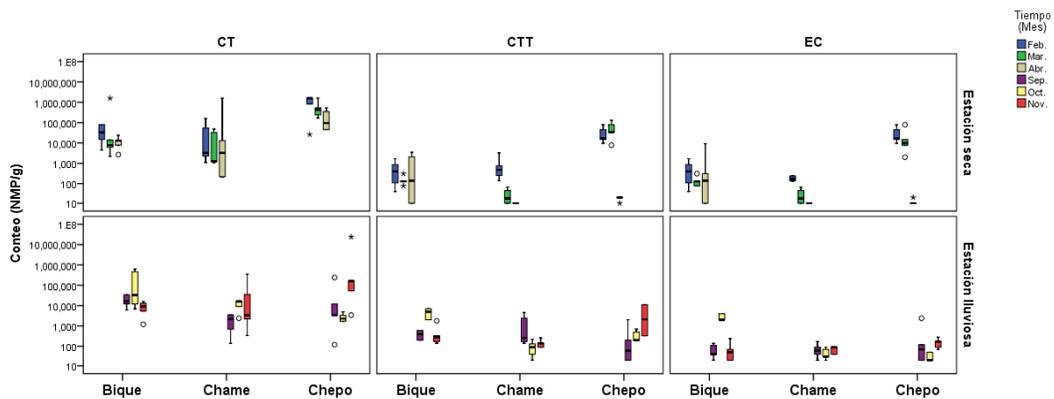


Figura 6. Valores promedio de los indicadores de contaminación fecal (CT, CTT, EC) por zonas de producción.

Indicadores de la calidad microbiológica por mes de muestreo en la temporada lluviosa y seca.

Se pudo observar que, de los meses de muestreo de la temporada seca y lluviosa, fue en los meses de febrero y marzo, donde se detectaron las concentraciones más altas de CT, CTT y EC, correspondiendo a la temporada seca. Sin embargo, los meses de abril y septiembre presentaron valores por debajo de los límites máximos de aceptación establecidos por las normas sanitarias (Cuadro 8).

Cuadro 8. Recuento de indicadores de contaminación fecal: Coliformes totales, coliformes termotolerantes y *E. coli* en bivalvos (Almejas), en los meses de temporada seca y lluviosa.

Recuento de indicadores de contaminación fecal en los meses de la temporada seca y lluviosa					
Meses	CT (NMP/100g)	CTT (NMP/100 g)	Cat	EC (NMP/100 g)	Cat
Febrero	545433	5960	C	757	B
Marzo	183053	11383	C	3383	B
Abril	37267	57	A	53	A
Septiembre	7200	243	A	53	A
Octubre	17100	1763	B	683	B
Noviembre	57533	840	B	103	A

Cat: Categoría, CT: coliformes totales, CTT: coliformes termotolerantes, EC: *E. coli*

Los análisis estadísticos indican que no existen diferencias estadísticas significativas entre los meses de muestreo de la temporada lluviosa y seca correspondientes a los meses de muestreo de febrero, marzo, abril, y septiembre, octubre y noviembre, utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para los CT ($H = 7.70$; $p = 0.17$), donde la $p > 0.05$. Si existe diferencias estadísticas significativas para los CT: $H = 22.89$; $p = 0.00$ y EC: $H = 28.13$; $p = 0.00$, donde la $p < 0.05$ (Fig. 7).

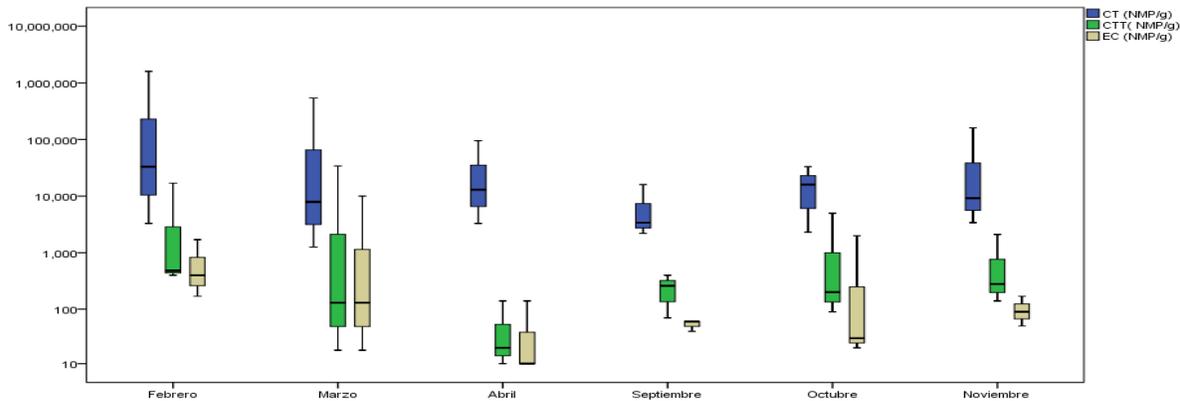


Figura 7. Valores promedio de los indicadores de contaminación fecal (CT, CTT, EC) en los distintos meses de muestreo.

Análisis estadístico de la estación seca y Lluviosa.

Existen diferencias estadísticas significativas entre los meses de muestreo de la temporada lluviosa y seca, según la prueba de U de Mann-Whitney para los CT ($H = 737.50$; $p = 0.2$), donde la $p < 0.05$. No existen diferencias estadísticas significativas utilizando la prueba de U de Mann-Whitney para los CTT ($H=844.00$; $p = 0.17$) y utilizando la prueba de Kruskal-Wallis para las EC ($H = 924.00$; $p = 0.47$), donde la $p > 0.05$.

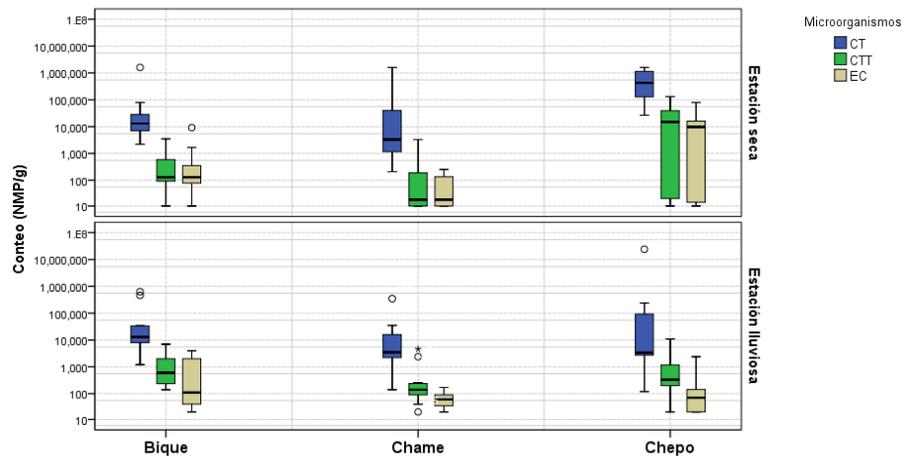


Figura 8. Diagrama de cajas de los microorganismos: coliformes totales (CT), coliformes termotolerantes (CTT) y la *E. coli* (EC) en NMP/ 100 g en los sitios Bique, Chame y Chepo durante la estación seca y lluviosa.

Secuenciación de cepas Silvestres *V.cholerae* y *V.vulnificus*, por ribotipificación.

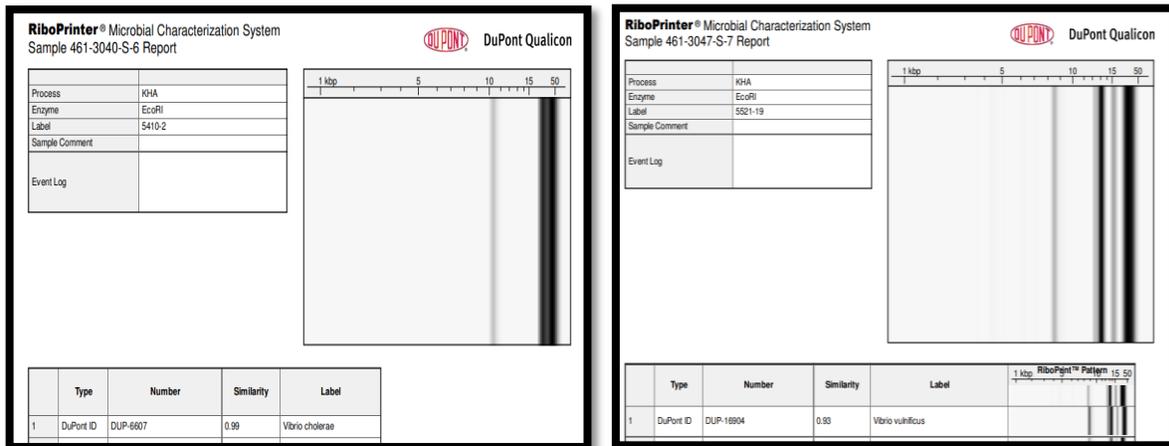


Figura 9. En la secuenciación de las cepas silvestres se obtuvo un porcentaje de similitud por encima de 0.85 considera una identificación certera. Obteniendo en nuestros resultados en *V.cholerae* un porcentaje de similitud 0,99% y para *V.vulnificus*, 0.93%.

Análisis Descriptivo de las zonas de producción de *Vibrios* utilizando la técnica de Aislamiento, PCR en Tiempo Real y PCR en Tiempo Final en la temporada seca y lluviosa.

Análisis Descriptivo de las zonas de producción de *Vibrios* utilizando la técnica de aislamiento en medio de cultivo.

En los aislamientos de los *vibrios* con agar TCBC, durante la temporada seca y lluviosa, las tres zonas reportan un alto crecimiento de *Vibrio*, observándose que *V. parahaemolyticus* se aisló en un 43% de las muestras y *V. vulnificus* en un 29%, siendo septiembre el mes que presentó menos aislamientos para esta especie, y para *V. cholerae* en un 28%, encontrándose que en la temporada lluviosa se reportó la menor cantidad de aislamientos de *V. cholerae*, principalmente en los meses de octubre y noviembre.

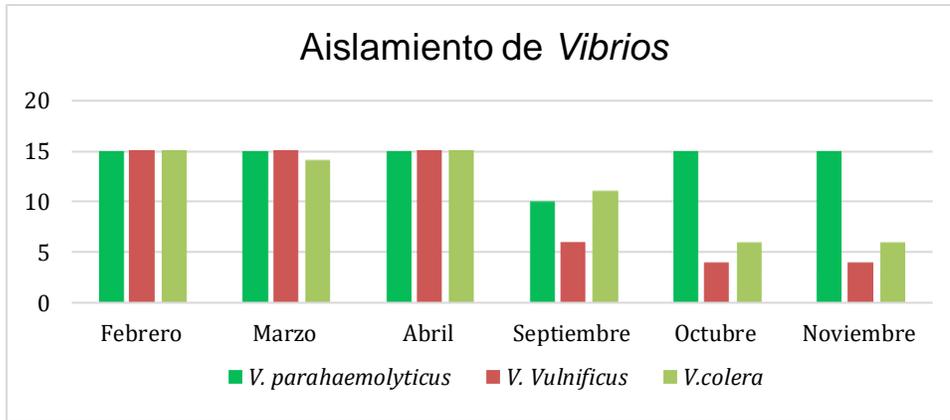


Figura 10. Aislamientos de *Vibrios*, por zonas de producción, en la temporada seca y lluviosa.

Análisis Descriptivo de las zonas de producción de *Vibrios* utilizando la técnica de PCR en Tiempo Real.

De las 90 muestras analizadas de bivalvos (almejas), 45 en la temporada lluviosa que comprende los meses de septiembre, octubre y noviembre y 45 muestras en la temporada seca, que comprende los meses de febrero, marzo y abril, se encontró que, de las tres especies de *Vibrios* analizadas en las zonas de producción, la especie más prevalente, tanto en la estación seca como en la lluviosa, fue *V. parahaemolyticus* con 53%, seguido de *V. vulnificus* con 37%, donde se observó que marzo y abril fueron los meses donde menos se detectó este patógeno (Fig. 11), y *V. cholerae* con 10%, donde en los meses de septiembre y octubre se observó una mayor prevalencia.

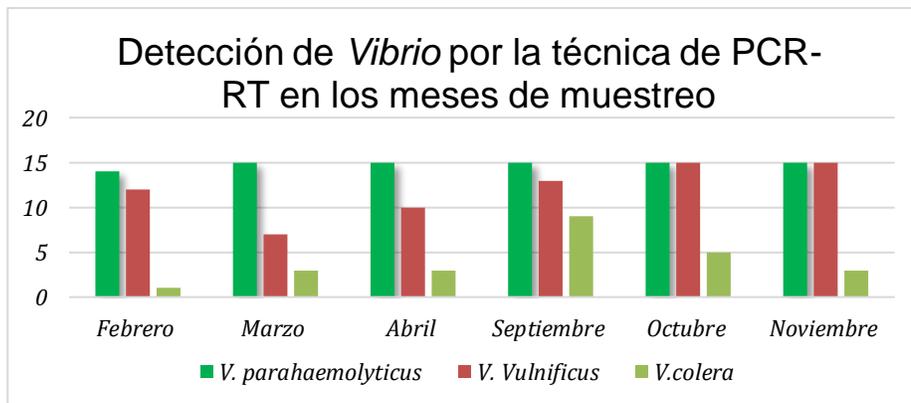


Figura 11. Detección de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, mediante la técnica de PCR en Tiempo Real, en temporada seca y lluviosa.

Gráfico de PCR en Tiempo Real mediante el sistema Bax

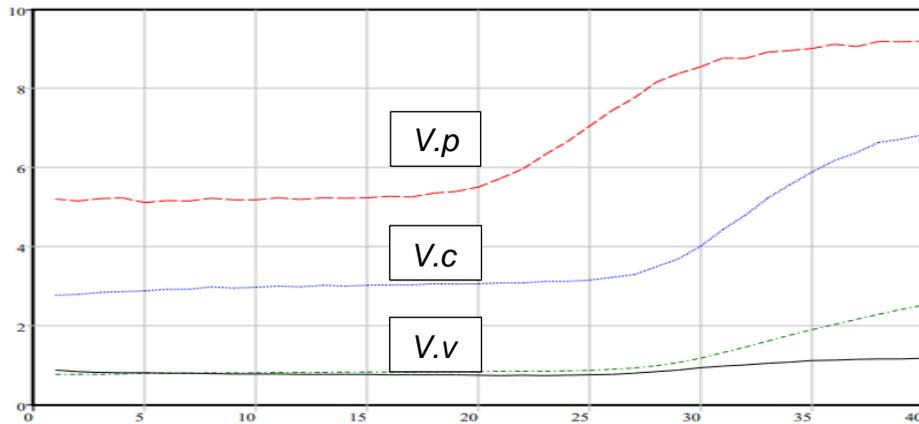


Figura 12. Presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus*.

Análisis Descriptivo de las zonas de producción de *Vibrios* utilizando la técnica de PCR en Tiempo Final.

En la PCR en tiempo final, el *Vibrio* con mayor prevalencia fue *V. parahaemolyticus* con 67%, donde los meses de mayor prevalencia fueron febrero, marzo y octubre, seguido de *V. vulnificus* con 33%, detectándose solo en los meses de octubre y noviembre, mientras que *V. cholerae* no fue detectado en ninguno de los meses de muestreo (Fig. 13).

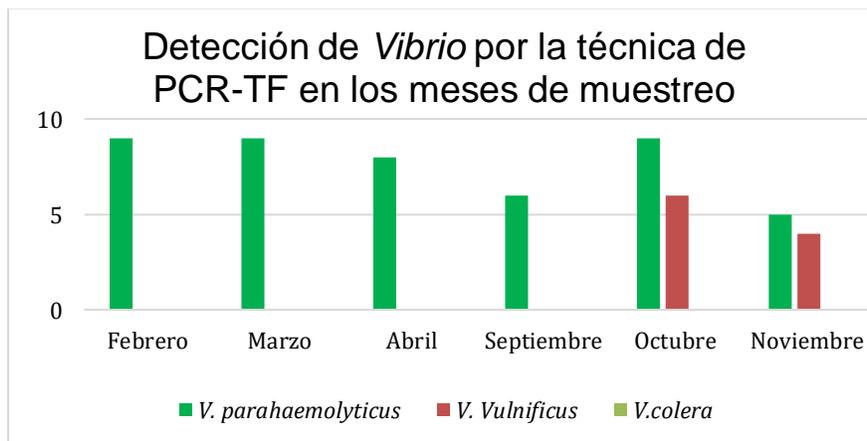


Figura 13. Detección de *Vibrios* mediante la técnica de PCR-TF, durante la época seca y lluviosa.

Análisis Estadísticos para la comparación de *Vibrio* entre las tres zonas de producción (Bique, Chame y Chepo).

En estos resultados, no existe diferencias estadísticas significativas entre las zonas de producción de Bique, Chame y Chepo (Fig. 14) de los *Vibrios* estudiados, de acuerdo al análisis de Kruskal-Wallis para *V. parahemolyticus* ($H=0.715$; $p=0.699$), *V. vulnificus* ($H=0.198$; $p=0.906$) y *V. cholerae* ($H=2.086$; $p = 0.352$), por lo que no hay diferencias estadísticas significativas entre las zonas, donde el $p > 0.05$. Los datos presentan una mayor dispersión en la zona de Chepo y también se muestra que los valores máximos son muy similares.

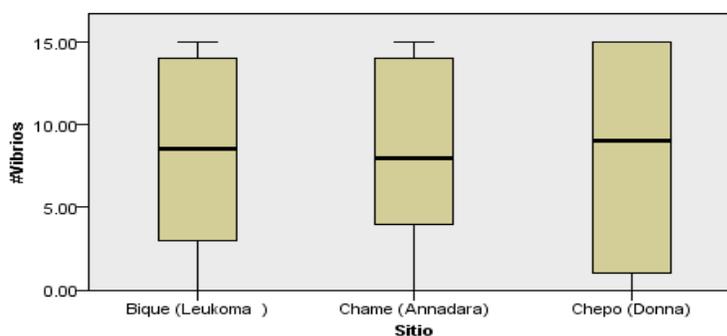


Figura 14. Prueba de Kruskal-Wallis entre los *Vibrios* y las zonas de producción.

Análisis estadístico de *Vibrio* con las tres técnicas utilizadas (Aislamientos, PCR-TR, PCR-TF).

En estos resultados, las estimaciones de las muestra para los tres grupos son 54% PCR-TR), 29% (Aislamiento) y 17% (PCR-TF) (Fig. 15). La hipótesis nula indica que las medianas de población para estos grupos son todas iguales. Existen diferencias estadísticas entre las técnicas utilizadas (aislamientos, PCR-TR y PCR-TF) en cuanto al conteo de *vibrios*, utilizando la técnica de Kruskal-Wallis ($H = 21.806$; $p = 0.000$). En la Prueba Post Hoc Bonferroni de Kruskal-Wallis, para los conteos de *vibrios* se aprecian diferencias estadísticamente significativas (5% de nivel de significación) entre las técnicas PCR-TF y PCR-TR ($p = <0,05$), y PCR-TF y aislamiento ($p = <0,05$).

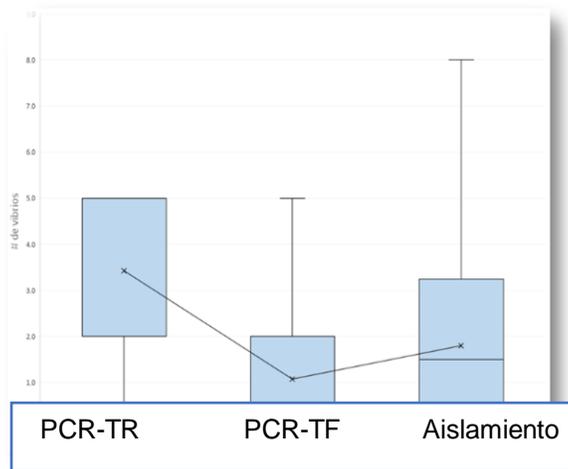


Figura 15. Comparación de las tres técnicas utilizando la prueba de Kruskal-Wallis.

Comparación de la presencia de vibrios entre la temporada seca y lluviosa.

No existe diferencia significativa en cuanto a la distribución de los *Vibrios* en la temporada seca y lluviosa puesto que el valor p es >0.05 para todos ellos. Utilizando la técnica (Mann-Whitney), *V. parahemolyticus* presentó: $H=306.00$; $p=0.248$, *V. vulnificus*, $H=353.00$; $p=0.834$ y *V. cholerae* presento un $H=357.500$; $p=0.897$ (Fig. 16)

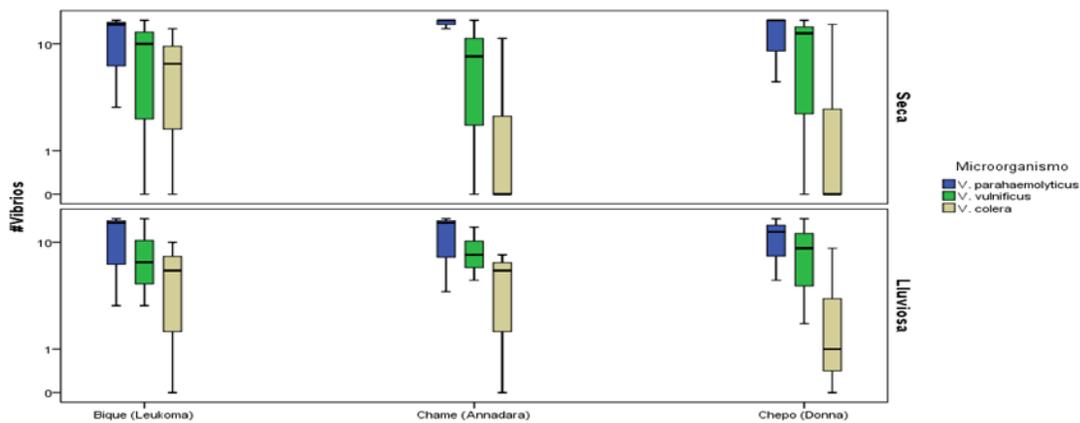


Figura 16. Diagrama de cajas de los microorganismos de la presencia de *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*, en los sitios de Bique, Chame y Chepo durante la estación seca y lluviosa

Asociación de la calidad sanitaria de los moluscos bivalvos (almejas) dada por la asociación de *Vibrios* y los indicadores de contaminación fecal.

De acuerdo a la correlación de Spearman (r_s), se pudo observar que no hubo asociación alguna entre la presencia de los patógenos de *Vibrios* (*V.c*, *V.p*, *V.v*) y los indicadores de contaminación fecal (CT, CTT, EC) de los bivalvos estudiados, siendo esta no significativa, donde *V. parahaemolyticus* con CT, presentó una ($r_s = -0.18$; $p > 0.05$), CTT ($r_s = -0.14$; $p > 0.05$), EC ($r_s = -0.25$; $p > 0.05$); *V. vulnificus* presentó una correlación con CT de ($r_s = 0.23$; $p > 0.05$), CTT de ($r_s = 0.19$; $p > 0.05$), EC de ($r_s = 0.04$; $p > 0.05$); para *V. cholerae* con CT de ($r_s = -0.05$; $p > 0.05$), CTT de ($r_s = 0.18$; $p > 0.05$) y EC de ($r_s = 0.09$; $p > 0.05$). Sin embargo, en el cuadro 9, se observó una asociación significativa entre los indicadores de contaminación fecal, en el que CT presentó una asociación con CTT, donde ($r_s = 0.56$; $p < 0.05$), con EC, donde ($r_s = 0.53$; $p < 0.05$).

Cuadro 9. Asociación de *Vibrios* con indicadores de contaminación fecal.

			Correlaciones					
			V. parahaemolyticus	V. Vulnificus	V.colera	CT (NMP/g)	CTT(NMP/g)	EC (NMP/g)
Rho de Spearman	V. parahaemolyticus	Coefficiente de correlación	1.000	.363	-.025	-.187	-.140	-.258
		Sig. (bilateral)	.	.138	.923	.457	.578	.302
		N	18	18	18	18	18	18
V. Vulnificus	V. Vulnificus	Coefficiente de correlación	.363	1.000	.166	.227	.199	.043
		Sig. (bilateral)	.138	.	.510	.364	.427	.867
		N	18	18	18	18	18	18
V.colera	V.colera	Coefficiente de correlación	-.025	.166	1.000	-.047	.018	.087
		Sig. (bilateral)	.923	.510	.	.853	.944	.732
		N	18	18	18	18	18	18
CT (NMP/g)	CT (NMP/g)	Coefficiente de correlación	-.187	.227	-.047	1.000	.563*	.533*
		Sig. (bilateral)	.457	.364	.853	.	.015	.023
		N	18	18	18	18	18	18
CTT (NMP/g)	CTT (NMP/g)	Coefficiente de correlación	-.140	.199	.018	.563*	1.000	.823**
		Sig. (bilateral)	.578	.427	.944	.015	.	.000
		N	18	18	18	18	18	18
EC (NMP/g)	EC (NMP/g)	Coefficiente de correlación	-.258	.043	.087	.533*	.823**	1.000
		Sig. (bilateral)	.302	.867	.732	.023	.000	.
		N	18	18	18	18	18	18

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral).
 **. La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

Amplificación de PCR-TF MÚLTIPLE

Se usaron tres conjuntos de cebadores diseñados para detectar las tres especies de *Vibrio* en una PCR uniplex para amplificar 417 pb para *V. cholerae*, 644 pb para *V. parahaemolyticus* y 192 pb para *V. vulnificus*, donde se produjeron amplificaciones, utilizando los controles positivos de V.c, V.p y V.v.

En la evaluación de la PCR múltiple, se utilizaron las cepas combinadas utilizando los ADN de las cepas ATCC y las cepas silvestres, y su cuantificación se realizó a través del espectrofotómetro de UV, Visible BioSpec Nano (SHIMADZU). En los primeros ensayos se observó un ADN bastante concentrado para *V. cholerae* de 100 µg/mL, para *V. parahaemolyticus* de 40 µg/mL y para *V. vulnificus* de 130 µg/mL, y se procedió a realizar diluciones seriadas del ADN 1/10, 1/100 y 1/1000, respectivamente, para disminuir la intensidad del amplicón y así, lograr la disminución de concentración de ADN, lográndose exitosamente la PCR múltiple, amplificándose simultáneamente las tres especies de *Vibrios* evaluadas (Fig.17).

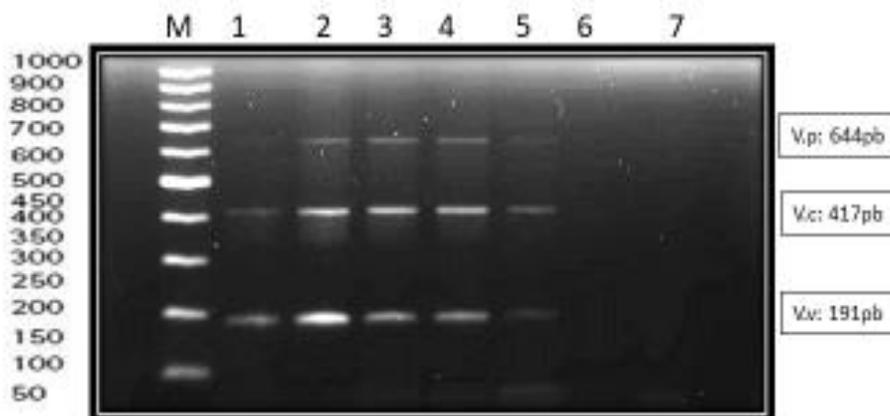


Figura 17. Bandas amplificadas de la PCR- Múltiple para la detección de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*.

Detección de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* a partir de muestras ambientales de moluscos (almejas).

Para realizar la PCR-TF múltiple, se utilizaron los lisados de la PCR-TR de las almejas que resultaron positivas con las diferentes especies de *Vibrios* de las tres zonas de producción evaluadas (Bique, Chame y Chepo), donde se reportó para *V. parahaemolyticus* 89 casos positivos, *V. vulnificus* 73 y *V. cholerae* 24 detecciones positivas. Sin embargo, en la detección de la técnica de PCR-TF múltiple, solo se

encontró para *V. parahaemolyticus* 33 casos positivos, *V. vulnificus* 20 y no se logró detectar *V. cholerae* en las muestras evaluadas. Las muestras 3 y 4 resultaron positivas para *V. cholerae*, en la PCR-TR, pero se observaron bandas inespecíficas en la PCR-TF (Fig.18).

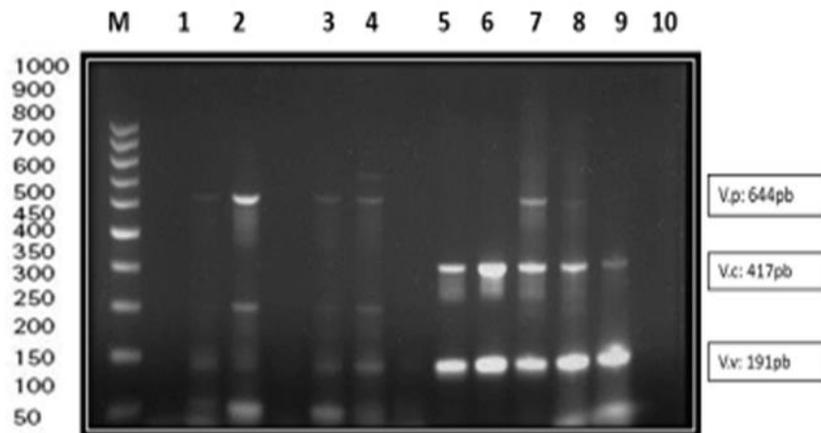


Figura 18. Corrida en gel de agarosa a 1.5% de muestras ambientales y controles positivos.

M: Marcador de peso Molecular 1: Lisado *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*; 2: Lisado *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*; 3: Lisado *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*; 4: Lisado *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*; 5: Control + *V. cholerae*, *V. vulnificus*; 6: Control + *V. cholerae*, *V. vulnificus*; 7, 8, 9 Control + *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*; 10: Control negativo, muestra de agua.

DISCUSIÓN

Indicadores de la calidad microbiana de los moluscos bivalvos (almejas), mediante indicadores de contaminación fecal.

En este estudio se evaluaron tres zonas de producción de moluscos bivalvos (almejas) de importancia comercial en Panamá: Bique, Chame y Chepo. En Panamá, la extracción de moluscos posee un gran potencial para contribuir al alivio de la pobreza y también, como recurso alimentario de proteína animal saludable, además de generar empleo y fuentes de ingreso alternativas a la pesca de extracción (Rodríguez, 2009). Los bivalvos, por ser organismos filtradores que obtienen su alimento a través de las corrientes de agua, concentran en su interior microorganismos que pueden ser potencialmente patógenos al hombre (Solo *et al.*, 2000). Para evaluar la calidad sanitaria de las zonas de producción, se midieron los indicadores de contaminación fecal. Según el Codex Alimentario, el número total de coliformes se puede asociar a una amplia variedad de fuentes medioambientales, pero no necesariamente de origen fecal y por tanto, esta orientación se limita principalmente al uso de *E. coli* o coliformes termotolerantes (fecales).

Los valores promedios del recuento de coliformes totales (CT), se reportaron entre 2.62×10^3 a 7.45×10^5 (cuadro 7). Los CT se encuentran en las plantas, el suelo, animales y en el tracto intestinal de los humanos. La presencia de estas bacterias indica que el agua está contaminada con aguas servidas y otros desechos en descomposición. Generalmente, las bacterias coliformes se encuentran en mayor abundancia en la capa superficial del agua o en los sedimentos. (Munn, 2004).

Los valores promedio de los coliformes termotolerantes (CTT) estuvo entre el 58% de las muestras analizadas, presentando valores dentro de los límites de aceptación, encontrándose en la categoría A en la temporada seca, tanto en las zonas de Bique como la de Chame, y por encima de los límites, la zona de Chepo en la temporada seca, ubicándose en la categoría C. La zona de Chame de la temporada lluviosa se ubicó en la categoría A, y las zonas de Bique y Chepo de la temporada lluviosa se ubicaron en la categoría B (cuadro 7).

En cuanto al recuento del NMP de *E. coli* (EC), el 67% de las muestras analizadas estuvieron dentro de los límites de aceptación establecidos por los criterios de calidad sanitaria de SERNAPESCA (2018) y solo 33% de las muestras exceden los valores de 230 NMP/g de muestra. En la categoría B, se ubicaron la zona de Chepo en la temporada seca y la zona de Bique en la temporada lluviosa. Según señalan Hernández y col. (2004), las almejas *P. asperima* (*L. asperima*) y *D. panamensis* (*D. punctatostriatus*) analizadas no eran aptas para el consumo humano, debido a que estas se encontraban por encima de los límites de aceptación, donde estos reportan que solo una de las muestras de *Donax*, se categorizó como zona A. Sin embargo, Saldaña *et al.* (2006) y Garrido *et al.* (2018), reportaron que la especie de *A. tuberculosa*, ubicada en zona de producción de Chame, se ubica en categoría A, lo que indica que la muestra es apta para consumo humano directo, según los estándares microbiológicos (SERNAPESCA 2018). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en este trabajo, donde la zona de Chame presentó los valores más bajos en cuanto a los indicadores de contaminación fecal, tanto en la temporada seca como la lluviosa, lo que pudiera significar que las corrientes marinas hacen que las posibles descargas de aguas residuales puntuales, no afecten estas zonas en la mayor parte del tiempo (Billalobos, 1997). Las masas de aguas de la Bahía de Chame están en constante renovación, donde el aporte de las aguas continentales en esta estación modifica la parte interna de la Bahía, originando un desplazamiento hacia afuera (Araúz, 1995) lo que impediría la acumulación de estos microorganismos en el área cerca de la costa.

La zona de Bique en la temporada seca se ubicó en la categoría A. Sin embargo, datos reportados por Martínez y Rodríguez (2006) en los meses de marzo a junio 2004, ubicaron a Bique en categoría B, datos que concuerdan con Garrido (2018), lo que indica que estas muestras solo se pueden utilizar para consumo humano, luego de someterse a un tratamiento en una zona de reinstalación durante un periodo largo de tiempo no inferior a dos meses, ó someterse, previo a su consumo, a procesos térmicos establecidos. A diferencia de los resultados observados en este trabajo, los niveles de *E. coli* presentaron un comportamiento en la zona de Bique en la temporada lluviosa, que la ubicó en la categoría B. Los ambientes marino-

costeros están sujetos a procesos continuos de contaminación por aguas servidas, debido al aumento de la población a nivel mundial (McFeters *et al.*, 1993; PNUMA, 2003). En los últimos años el distrito de Arraiján ha tenido un increíble aumento poblacional, que según el censo de la Contraloría General de la República (2010), se registraban 230,311 habitantes. Se realizó un estimado para el censo del año 2020 (que no se ha realizado), en el que se registraron 300,979 habitantes, siendo este uno de los factores que causan mayor deterioro de las aguas marino-costeras, entre el vertimiento de desechos sólidos, la falta de conciencia de la población, el desarrollo urbanístico, donde se ha hecho notable la carencia de plantas de tratamiento de aguas residuales, las cuales se vierten directamente a los cuerpos de agua, y en la mayoría de los casos, al mar (McFeters *et al.*, 1993; PNUMA, 2003). Por estas razones, se considera de gran relevancia el monitoreo constante de los cuerpos de agua destinados a la recreación, y la recolecta de moluscos bivalvos, como las almejas destinadas al consumo local, y para la comercialización a nivel regional. Según la norma, estas muestras deberán someterse a un proceso de depuración o reinstalación en una zona autorizada y cumplir todas las exigencias fijadas en una zona tipo A, o someterse a un proceso térmico (SERNAPESCA, 2018). Esto para garantizar que los moluscos bivalvos sean aptos para consumo humano.

En cuanto a la zona de Chepo, ubicada en el área de Chinina, según los datos obtenidos, se ubicó en la categoría C con el conteo de CTT de la temporada seca y en la categoría B con el conteo de EC de la temporada seca, datos que concuerdan con los resultados obtenidos por Saldaña *et al.* (2006) y Garrido *et al.* (2018). La presencia de estos grupos de indicadores de contaminación fecal con valores considerablemente altos, indica que esta zona está siendo afectada por las aguas residuales provenientes de las poblaciones aledañas. Según la estimación del Censo de Población de 2020, la población registrada para el distrito de Chepo fue de 60,345 habitantes, frente a los 49,385 que se registró en el censo del año 2010, observándose un incremento absoluto de 10,956 personas, lo que representa un crecimiento anual de 913 habitantes. En el distrito de Chepo está uno de los mayores ríos de Panamá, el río Mamoní, que desemboca en el puerto de Coquira,

y además, cuenta con más de 55 ríos y quebradas, por lo que se considera un área propensa a inundaciones y derrumbes, con muchos problemas sanitarios, debido a que los residuos domésticos se arrojan directamente a los ríos y quebradas sin tratamiento previo para la eliminación de las excretas, por falta de alcantarillados, contaminando los recursos hídricos superficiales, subterráneos y las zonas costeras (McFeters *et al.*, 1993; PNUMA, 2003). Por otra parte, es importante considerar la contribución del suelo y sedimento, adyacentes al área de crecimiento de los bivalvos, como reservorios de bacterias coliformes durante los períodos de precipitación, como consecuencia de la escorrentía en la superficie de la tierra, arrastrando desechos domésticos y agrícolas a las costas (Villalobos *et al.*, 1997). En la literatura consultada sobre los moluscos bivalvos y la microbiota de los productos del mar, se señala a las bacterias del género *Vibrio* como predominantes, y las mismas conforman más del 80% de las especies encontradas (Cowell, 1996; Aliaga, 2005).

Para la evaluación de la calidad microbiológica de los moluscos, se realizaron tres técnicas para el aislamiento y detección de los *Vibrios* presentes en las almejas analizadas, observándose que *V. parahaemolyticus* fue el patógeno más prevalente, tanto en la época seca como en la lluviosa, detectándose en un 47% de las muestras, seguido de *V. vulnificus* en un 34% y *V. cholerae* en 19%. La frecuencia elevada de bacterias del género *Vibrio* en moluscos bivalvos, es debida a su alimentación (por captación pasiva), los cuales son filtradores típicos y es por esta razón, que en su sistema digestivo, se concentran grandes cantidades de microorganismos, entre virus y bacterias (Fontánez, 2005). Este hallazgo coincide con los resultados observados en otras áreas geográficas, donde reportaron una prevalencia de 0.3% hasta 37.2% de *V. parahemolyticus*, resultados dependientes de la región y probablemente, relacionados con algún cambio en la naturaleza de la bacteria, por factores abióticos y bióticos que repercuten globalmente (Quintoil *et al.*, 2008; Kagico *et al.*, 2001). En un estudio realizado en Venezuela por Muños *et al.* (2012) asociado a diferentes zonas de producción de moluscos bivalvos, encontraron que *V. parahaemolyticus* fue una de las bacterias de mayor prevalencia con 22.7%, seguido de otras especies del género *Vibrio*. En el ambiente, se ha

informado que solamente del 1 al 5% de los aislamientos de *V. parahaemolyticus*, son de las cepas TDH+ o TRH+, las cuales poseen la capacidad de producir infección entérica (Wong *et al.*, 2000; De Paola *et al.*, 2003; Heitmann *et al.*, 2005). Según Raghunath *et al.* (2009), esta baja frecuencia en el ambiente, podría deberse a que las cepas patógenas son más sensibles a las condiciones adversas y rápidamente, revertirían a un estado viable no cultivable (VBNC). Por otra parte, la selectividad del caldo de enriquecimiento (Agua Peptona Alcalina) utilizado en el aislamiento, está basada en un pH alcalino. Sin embargo, las cepas patógenas humanas se encuentran en el tracto gastrointestinal a un pH ácido y con un ambiente que contiene sales biliares (Raghunath *et al.*, 2009). Pace *et al.* (1997), sugirieron que estos factores revertirían el estado viable no cultivable, activando y aumentando la virulencia de las cepas de *V. parahaemolyticus*. Estas podrían ser algunas razones por las cuales se aíslan cepas patógenas del tracto gastrointestinal humano, en contraste con lo hallado en el ambiente acuático (Pace *et al.*, 1997).

A finales de la década de 1960 y principios de la de 1970, *V. parahaemolyticus* fue reconocido como el causante de enfermedades diarreicas en todo el mundo, aunque se notificó con mayor frecuencia en Asia y EEUU. En un meta-análisis publicado por Odeyemi (2016), se señala que la incidencia de *V. parahaemolyticus* era mayor en ostras que en otros mariscos, con tasas de prevalencia de 63.4%, seguida de almejas con 52.9%, peces con 51%, camarones 48,3% y en mejillones y vieiras con 28%, coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio, en las técnicas utilizadas, con 53% de detección de *V. parahaemolyticus* en la PCR-RT (Fig. 9).

Fernandez (2000) reportó que, en un estudio realizado con voluntarios, la dosis infectiva para *V. parahaemolyticus* puede ser entre 2×10^5 a 3×10^7 UFC/g, para desarrollar un cuadro diarreico gastrointestinal. Sin embargo, se han reportado brotes en Canadá y EEUU por consumo de ostras, donde se evidencian valores inferiores a 200 UFC/g (CDC, 1999).

En este estudio, se reportó que el 34% de las muestras de las tres zonas de producción de bivalvos evaluadas, estuvieron infectadas por *V. vulnificus*, contrario a lo observado en un estudio que se realizó en Venezuela, en las zonas productoras

de Sucre, que reportaron que la mayoría de las cepas aisladas correspondieron a *V. alginolyticus* (57.4%), seguida de *V. parahaemolyticus* (22.7%), y lográndose aislar *V. vulnificus* solo en dos de las cuatro zonas productoras evaluadas, con un 5.9 y 5.1%, e igualmente se observó *V. cholerae* con un 3.3 y 8.4% de los aislamientos (Muños *et al.*, 2012). En un estudio realizado en Sao Paulo, Brasil, se reportó una mayor contaminación por *V. vulnificus* en ostras (65.4%), en camarones (14,3%) y en mariscos (42.1%) (Moreno y Landgraf, 1997). En las costas del Golfo de México, reportaron que *V. vulnificus* se encontraron en ostiones y agua, durante la época de lluvias o cuando la temperatura del agua es elevada (23°C) (Zúñiga y Lozano, 2014). Este hallazgo concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde se encontró un notorio aumento en la cantidad de *V. vulnificus* en la temporada lluviosa, en los meses de septiembre, octubre y noviembre, utilizando la técnica de PCR-TR. Sin embargo, hay otros estudios donde indican que este patógeno se encuentran en mayores concentraciones en los meses más cálidos, donde causan infecciones (Chin, 2001). Esto coincide con los resultados reportados en este estudio con la metodología tradicional de aislamiento bacteriano, donde los picos más altos se observaron en la época seca, correspondiente a los meses de febrero, marzo y abril. También, este microorganismo está presente en el sedimento, plancton y otras formas de vida marina, por lo que ha sido aislado de una gran variedad de ecosistemas (Høi *et al.*, 1998).

Según Rey (2005), se estima que *V. vulnificus* es una de las bacterias más invasivas y patógenas para los seres humanos, que tiene capacidad de destruir e invadir tejidos, y ha generado muertes debido al consumo de bivalvos crudos. *V. vulnificus* es una bacteria cuyas infecciones presentan un alto índice de mortalidad en los EEUU, asociados al consumo de ostras crudas (FDA, 2000; Red Mundial, 2005). Normalmente, las infecciones con *V. vulnificus* tienen como principal síndrome clínico la septicemia, pero al igual que *V. parahaemolyticus*, es capaz de causar gastroenteritis e infecciones en heridas (Hlady y Klontz, 1996). Las infecciones por septicemia suelen aparecer después de la ingestión de moluscos crudos o poco cocidos, principalmente ostras, donde ocurre en grandes cantidades (10^5 g) (CDC, 2013). *V. vulnificus* es un patógeno humano grave, responsable de más del 95% de las muertes relacionadas con los mariscos en EEUU (Jones y Oliver, 2009) y tiene

la tasa de mortalidad más alta de cualquier patógeno transmitido por los alimentos (Rippey, 1994).

La temperatura del agua del mar juega un papel clave en la determinación de los niveles de *V. parahemolyticus* y *V. vulnificus*, ya que en aumentos estacionales de la temperatura del agua de mar, inducen de forma directa a la proliferación de estos organismos en el medio, alcanzando generalmente mayores densidades en las épocas de mayor temperatura, siempre y cuando los niveles de salinidad en esas épocas, sean las óptimas para su expansión demográfica (Deter *et al.*, 2010b). El cólera es una de las enfermedades infecciosas que se conocen de más larga data, existiendo reportes de esta patología desde 1817 (Colwell *et al.*, 1996). Los serogrupos O1 y O139 son los causantes de la cólera epidémica, mientras que los serogrupos no-O1 y no-O139, que están asociadas al consumo de moluscos, han sido aisladas en infecciones extraintestinales, de heridas, oídos, esputos y orinas. Los serogrupos no-O1 y no-O139, se han observado como agentes causales de gastroenteritis, septicemia y meningitis, en pacientes pediátricos y con insuficiencia renal crónica (Dhar, 2004). Según Moore (2014), afirma que las cepas de *V. cholerae* O1/O139 no suelen persistir en el ambiente, se ha observado que no es fácil que prosperen en los nichos ecológicos simultáneamente con las cepas ambientales, aunque hay ciertos focos de cepas virulentas, se deben presentar las condiciones idóneas para la proliferación de cepas patógenas (Moore *et al.*, 2014). En América, el hecho más reciente fue el brote de Haití en 2010 y según monitoreos realizados hasta 2014, se encontró cepas de *V. cholerae* O1 en muestras ambientales. No obstante, no se ha logrado concluir si las cepas ya han establecido un reservorio ambiental en las aguas superficiales de Haití (Alam *et al.*, 2015). En Colombia, se ha encontrado aislamientos de *V. cholerae* no-O1 y no-O139 en muestras clínicas y ambientales, y también se observó que en el país hay reservorios ambientales para otras especies que están causando enfermedad. Incluso varios reportes mencionan que a través del tiempo, algunas especies de *Vibrio* spp, han emergido en diferentes lugares a nivel mundial, incluyendo Latinoamérica y han sido asociadas a infecciones gastrointestinales y extra-intestinales, e incluso, en brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (Chunga, 2018; Gavilán y Martínez, 2011). En un estudio en Colombia

realizado por Sánchez (2020), se reportaron la presencia del 10% de *V. cholerae* no O1/O139 en muestras ambientales, no encontrando el serogrupo patogénico O1/O139. Esto puede deberse a la influencia de condiciones climáticas en cada temporada, de este modo la temporada lluviosa favoreció la presencia de *V. cholerae* no O1/O139 (Sánchez, 2020).

Se plantea que el calentamiento global y el fenómeno meteorológico del “El Niño”, pueden afectar profundamente las condiciones ambientales locales, y pueden ejercer un papel clave en el reemergencia del cólera. Las temperaturas calientes de la superficie marítima que trae consigo este fenómeno, pueden propiciar grandes concentraciones del plancton, especialmente, en las aguas costeras, lo que resultaría en grandes cantidades de nutrientes procedentes de las aguas residuales y de las escorrentías de las tormentas, favoreciendo la multiplicación del *V. cholerae*. Estos cambios pueden favorecer el incremento de las especies de *Vibrio* (Huarcaya *et al.*, 2004; Eiter *et al.*, 2007). Atendiendo a lo expresado, se puede decir, que en nuestros resultados se registraron fuertes lluvias en la temporada seca (marzo y abril), donde se ve un notable aumento de *V. cholerae*, entre la temporada seca y lluviosa, correspondiendo a un 10% de las muestras analizadas. Sin embargo, este aumento fue más progresivo al inicio de la temporada lluviosa, en los meses de septiembre y octubre. Según datos proporcionados por ETESA, la mayor precipitación se dió en septiembre, con 285 y 543 mm de precipitación acumulada mensual, en las estaciones meteorológicas de Chame y El Llano de Arraiján, respectivamente (ETESA, 2019), observándose que la zona de producción de Bique, Arraiján (*L. asperrima*), se reportó la mayoría de las muestras infectadas por *V. cholerae*. En los datos del 2021 proporcionados por la ARAP, del laboratorio de moluscos bivalvos de la Estación de Maricultura del Pacífico (EMP), ubicado en Vacamonte, que es corregimiento del distrito de Arraiján. Esta área se ubica cerca de la zona de producción de Bique, se da una condición apropiada de temperatura de 26.9 a 33°C y pH, 7.15 a 8.38 y una salinidad (ppt) de 28 a 33, siendo esta última no favorable para el crecimiento de los *V. cholerae*. Fontánez (1971), ha señalado que, aún en tales condiciones desfavorables, *V. cholerae* puede permanecer viable en estado de latencia, pero no ser cultivable en los medios estándares y por tanto, no ser detectable. En un estudio realizado en Panamá por Gómez *et al.* (2016),

reportaron tres aislamientos presuntivos de *V. cholerae* en medio TSBC, sin encontrar muestras positivas en la zona del Espavé (Chepo). La baja incidencia de la especie *V. cholerae* en bivalvos fue encontrada también por Matte y Rivera (1994), en un estudio sobre *vibrios* patógenos en ostras de la costa atlántica brasileña, donde reportaron una incidencia entre 0 y 8%.

Con el método de PCR múltiple desarrollado en este estudio, se proporciona una alternativa para la detección directa y simultánea de tres especies de *Vibrio*, incluidos los *Vibrio* patógenos humanos como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, ayudando al diagnóstico clínico, estudios de la industria alimentaria y evaluación de riesgos de muestras ambientales, solo habría que mejorar la sensibilidad encontrada con esta técnica. Los protocolos de diagnóstico molecular han proporcionado métodos efectivos para el diagnóstico de agentes bacterianos, porque permiten una detección específica y sensible (Gonzalez *et al.*, 2004). Varios métodos de detección basados en PCR para la detección de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* han sido desarrollados, utilizando genes de virulencia como marcadores de identificación, siendo de gran importancia, ya que estos pueden estar relacionados con la patogénesis. Sin embargo, cuando se aplica a muestras ambientales, existe un riesgo potencial de identificación errónea, porque dichos genes podrían transferirse entre bacterias (Neogi *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Hossain *et al.* (2012), al igual que nosotros en este estudio, utilizaron el gen *groEL*, pero a diferencia de las muestras ambientales utilizadas en nuestro estudio, ellos emplearon muestras inoculadas de mariscos y agua de mar, donde reportaron después del enriquecimiento, una detección con una señal fuerte. En nuestro estudio, también se encontró una detección con una señal fuerte en los ensayos realizados en la PCR uniplex y múltiple de ADN genómico purificado de las cepas control o de referencia como lo observado por otros autores (Fig 17). (Thompson *et al.*, 2005 ; Nhung *et al.*, 2007). El gen *groE1* codifica la chaperonina GroEL (sinónimos son Cpn 60, GroL, Hsp 60 y Mop A), que juega un papel esencial en el control del estrés celular y también, es un poderoso marcador filogenético (Junick y Blaut, 2012). La superioridad del gen *groEL* en comparación con el rRNA 16S y el rRNA 23S, ya se ha informado en la detección de especies

de *Vibrio* (Nishibuchi, 2006; Yushan *et al.*, 2010). Sin embargo, en nuestro estudio, no se pudo utilizar los aislamientos de *vibrios*, porque al momento de reactivar los crioviales, estos no crecieron, lo que se puede atribuir a que las bacterias se encontraban en un estado viable pero no cultivables (VPNC) o se presentaban células muertas o dañadas (Lejima *et al.*, 2004). Estas cepas aisladas no eran viables, por lo que se utilizaron los lisados de bivalvos (almejas) empleados en la PCR-TR, en la PCR múltiple estandarizada en este estudio, pero no se pudo detectar la presencia *V. cholera*, pero si la presencia de bandas inespecíficas (Fig 18). La PCR múltiple puede presentar una sensibilidad y especificidad mucho más baja que una PCR simple o úniplex, como lo observado con los resultados obtenidos en este trabajo y esto puede deberse a la competencia que existe por los desoxiribonucleótidos trifosfato (dNTP's) y la Taq polimerasa cuando varios pares de iniciadores se combinan en una sola reacción (Phuektes *et al.*, 2001). A diferencia de los resultados obtenidos con la técnica de PCR-TR que fueron muy buenos, y puede ser porque en la PCR-TR se utilizan sondas fluorescentes por lo que tiene la ventaja de ser muy precisa y evita posibles artefactos o secuencias inespecíficas presentes en el producto de la PCR-TF, por lo que la interpretación de los resultados suele ser más rápida y directa, debido a que la mayoría de estas sondas usan el fenómeno FRET (fluorescent resonance energy transfer), para emitir las señales luminosas que se van a medir en el termociclador a medida que se obtenga el producto de la PCR (Lee *et al.*, 2004).

En este estudio, no se encontró asociación alguna entre los *Vibrios* estudiados y los indicadores de contaminación fecal donde la correlación de Spearman (r_s), que los valores de $p > 0.05$ (Cuadro 9). Los coliformes han sido utilizados como indicadores sanitarios de la calidad del agua y también, para clasificar las áreas de recolección de bivalvos desde hace mucho tiempo (Larkin y Hunt, 1982). Sin embargo, algunos autores concuerdan, que las concentraciones de organismos indicadores no han sido bien correlacionadas entre las especies patogénicas del género de *Vibrio* aisladas en muchos estudios. Esta falta de correlación se atribuye generalmente a las grandes diferencias biológicas entre los indicadores y los patógenos (Trompiz y Judith, 2000). Leyva (1996) sostiene que los microorganismos indicadores utilizados

para valorar la calidad sanitaria en los moluscos-bivalvos, no resultan útiles en relación con las especies patógenas del género *Vibrio*, por la naturaleza autóctona de estas especies.

Comparación de las tres técnicas aplicadas (Aislamientos Microbiológicos, PCR–TR, PCR–TF)

Al comparar los resultados de aislamientos con respecto a la identificación molecular a través de la PCR–TR, se observó discrepancia en la identificación fenotípica de *V. cholerae*, porque con los aislamientos se obtuvo un 27% y mediante PCR–TR se reportó solo un 10% de *V. cholerae*, por lo que algunos aislamientos se consideran como falsos positivos, ya que molecularmente no se lograron detectar y se conoce en la literatura que la sensibilidad de la PCR–TR es mucho mayor que los aislamientos (Martínez y García, 2006). Se tomaron algunas de las muestras de la temporada seca que fueron aisladas en TCBS, que permanecían cultivables y se les realizó la prueba bioquímica de API, donde se determinó la presencia de *Aeromonas* spp, lo que coincide con lo observado en la PCR–TR. Actualmente, se han evidenciado las ventajas que confieren los métodos moleculares con respecto a los métodos tradicionales que utilizan medios de cultivo, pues los resultados de estos últimos son muy variables y dependerán de diferentes aspectos como por ejemplo el origen de las muestras (clínico o ambiental). Además, este tipo de análisis requiere entre 5 a 7 días para obtener resultados, y también, en ocasiones los medios selectivos y diferenciales suelen ser muy costosos. Por ello se ha evidenciado en estudios de *Vibrios*, que la identificación mediante métodos moleculares como PCR con genes específicos, provee una sensibilidad y especificidad, que va entre un 100% con respecto a pruebas fenotípicas que oscila entre 70-90% (Crocì *et al.*, 2007; Fabbro, Cataletto y Del Negro, 2010), y si bien la identificación fenotípica puede proveer una caracterización presuntiva, tiene mayor validez la confirmación mediante métodos moleculares (Bou, Fernández, García, Sáez y Valdezate, 2011). En cuanto a la PCR-TF, esta técnica permite ahorrar tiempo y dinero en el diagnóstico. A pesar de utilizarse con éxito en el diagnóstico de varias enfermedades, una de sus limitantes es la susceptibilidad de que ocurra una contaminación en algunas de las etapas. Aunque esta técnica se sigue

utilizando para investigar la expresión genética celular, su principal desventaja es la exigencia de cantidades relativamente grandes de ARN, impidiendo su uso cuando las cantidades de ARNm son limitadas (McGuire *et al.*, 2004). Para superar esta limitación, se ha desarrollado la técnica de PCR en tiempo real. Esta técnica está basada en la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario específicas, y así, acceder a datos fiables y precisos sobre la expresión genética de las células en estudio (Heid *et al.*, 1996). Adicional, permite que la evaluación de los alimentos, sea mucho más rápida y permite trabajar con alto volumen de muestras, debido al corto tiempo que requiere esta técnica, y se puede dar una respuesta más expedita para la liberación de un producto al mercado o con fines de exportación (Cai *et al.*, 2005).

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. Las almejas están siendo comercializadas con niveles altos de coliformes termotolerantes, por encima de los límites establecidos para moluscos bivalvos.
2. En la zona de producción de Chame, de la especie de *A. tuberculosa*, se reportaron los valores más bajos de indicadores de contaminación fecal por lo que se sigue ubicando en categoría A, lo que indica que esta especie es apta para el consumo humano de manera directa.
3. La zona de producción de Chinina, ubicada en el área de Chepo, fue la que presentó mayor NMP de coliformes termotolerantes, ubicándose en categoría C y en base a los recuentos de *E. coli* en categoría B, en la temporada seca. En cuanto al aislamiento y detección de especies de *Vibrio*, *V. parahaemolyticus*, fue la especie que prevaleció en las tres zonas de producción, seguido por *V. vulnificus*.
4. No se encontró diferencia significativa en cuanto a la distribución de *Vibrios* en la temporada seca y lluviosa.
5. No hubo una correlación entre los *Vibrios* detectados y los indicadores de contaminación fecal.
6. A través de técnica de PCR –TR, se detectó *V. cholerae* en la zona de Bique (*L. asperrima*), en la temporada seca.
7. No hubo diferencia significativa de los *Vibrios* encontrados en cuanto a la técnica de Aislamiento y la técnica de PCR–TR.
8. La PCR-TR resultó tener mayor sensibilidad que la técnica de aislamientos y la PCR-TF múltiple, igual que lo reportado por otros autores.
9. El ensayo de PCR-TF múltiple desarrollado en este estudio, es bastante sensible y específico para la detección simultánea de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.
10. Si bien este estudio no serotipificó los aislamientos de esta especie, su presencia y predominancia en esta región podría representar un riesgo para la salud pública.

RECOMENDACIONES

1. Se requiere evaluar los parámetros fisicoquímicos en las zonas de producción, para poder hacer una mejor discusión del comportamiento de los *Vibrios*, ya que estos son muy influenciados por los factores ambientales como la temperatura, pH y salinidad de las aguas donde habitan.
2. Es importante evaluar los serogrupos de los *V. cholerae* detectados, para determinar que cepas están circulando en Panamá, si estas corresponden a cepas ambientales no-O1/no-O139 y no a cepas pandémicas O1/O139.
3. Realizar la prueba de hemolisina de TDH y TRH a los aislados de *V. parahaemolyticus*, porque son señaladas como agentes causantes de problemas de salud en el humano.
4. En los aislamientos de los *Vibrios* en medio de cultivo, se recomienda conservar los aislados en ultra-congelación a (-80°C), ya que los *Vibrios* a temperaturas -20°C se inactivan y se vuelven bacterias no cultivables.
5. Evaluar la presencia de *Salmonella* spp. en los moluscos bivalvos, como parte de los requisitos de las normativas de calidad sanitaria.
6. La PCR-TF múltiple, estandarizada en este estudio, puede considerarse como un ensayo altamente sensible y específico para la detección simultánea de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, pero se requiere una mayor evaluación de este método utilizando muestras ambientales y clínicas para mejorar su sensibilidad, la cual es baja en comparación a la PCR-TR.
7. Se recomienda que los moluscos bivalvos analizados en este estudio no se consuman crudos o pocos cocidos, y que no se comercialicen, sin cumplir con las condiciones necesarias para el consumo humano, por lo que se hace necesario que las autoridades competentes creen normativas que regulen la calidad sanitaria de las zonas de producción, para tomar las medidas y, evitar así, posibles brotes de enfermedades que afecten a la salud del consumidor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BIBLIOGRAFÍA

- Aliaga, R., J Miranda, J., Zevallos, J. (2010). Aislamiento e identificación de *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 en pescados y moluscos bivalvos procedentes de un mercado pesquero de Lima, Perú. *Revista Médica Scielo*, 21(3):130-1018.
- Anon. (1999). Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey, and New York, 1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48(3):48-51.
- Anwarul, Hug, Colwell, R. (1996). Environmental factors associated with emergence of disease with special reference to cholera. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 2(1):37-45.
- Ashrafus, S., Nurul A.B., Alam M y Nair J.B. (2005). Genomic Relatedness of the New Matlab Variants of *Vibrio cholerae* O1 to the Classical and El Tor Biotypes as Determined by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3):1401-1404.
- Aznar, R., Ludwig, W., Amann, R.I. and Schleifer, K.H. (1994). Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole-cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:330-337.
- Arias, C. R., Verdonck, L., Swings, J., Garay, E. y Aznar, R. (1997). Intraspecific differentiation of *Vibrio vulnificus* biotypes by amplified fragment length polymorphism and ribotyping. *Applied Environmental Microbiology*, 63(7):2600- 2606.

- Amaro, C., Biosca, E. G., Esteve, C., Fouz, B. y Toranzo, A. E. (1992). Comparative study of phenotypic and virulence properties in *Vibrio vulnificus* biotypes 1 and 2 obtained from a European eel farm experiencing mortalities. *Diseases of Aquatic Organisms*, 13, 29-35.
- Alam, M. T., Weppelmann, T.A., Longini, I., De Rochars, V.M., Morris, J.G. y Ali, A. (2015). Increased isolation frequency of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 from environmental monitoring sites in Haiti. *Plos One*, 10(4):E0124098.
- Bastías, R., Higuera, G., Sierralta, W. y Espejo, R. (2010). Un nuevo grupo de cosmopolitas Los bacteriófagos inducen un estado de portador en la cepa pandémica de *Vibrio parahaemolyticus*. *Microbiología Ambiental*, 12:990-1000.
- BAM. (2001). Bacteriological Analytical Manual On line, Detection of Enterotoxigenic *Vibrio cholerae* in Foods by the Polymerase Chain Reaction. Chapter 28: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-28.html>.
- Baumann, P., Schubert, R.H. (1984). Family II. Vibrionaceae. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, pp. 516-550.
- Baumann, P., Furniss, A.L. and Lee, J.V. (1984). Genus I *Vibrio*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, 1:518-538.
- Baris BE, Colak H. (2008). The microbiological quality of stuffed mussels (Mi dye dolma) sold in Istanbul. *British Food Journal*, 110(11):1079-1089.
- Bag, K., Nandi, S., Bhadra, R., et al. (1999). Clonal diversity among recently emerged strains of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 associated with pandemic spread. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(7):2354-2357.

- Baffone, W., Tarsi, R., Pane, L., Campana, R., Repetto, B., Mariottini, GL y Pruzzo, C. (2006). Detección de vibriones de vida libre y unidos a plancton en aguas costeras del mar Adriático (Italia) y estudio de sus propiedades asociadas a la patogenicidad. *Environmental Microbiology*, 8:1299–1305.
- Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R. y Martinez-Urtaza, J. (2010). Ocurrencia ambiental e impacto clínico de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus*: una perspectiva europea. *Environmental Microbiology Reports*, 2:7–18.
- Baker-Austin, C., Lemm, E., Hartnell, R., Lowther, J., Onley, R., Amaro, C., *et al.* (2012a). PCR en tiempo real basada en polimorfismo pilF para distinguir cepas de *Vibrio vulnificus* relevantes para la salud humana. *Revista Argentina de Microbiología*, 30:17–23.
- Blanco V, R.T. *Prontuario Microbiológico*. 2ª Ed. Disinlimed, C.A. Hospital Universitario, Caracas, Venezuela. 385 pp. 1990.
- Biosca, EG, Oliver, JD y Amaro, C. (1996). Caracterización fenotípica del biotipo 2 de *Vibrio vulnificus*, un serogrupo O homogéneo basado en lipopolisacáridos dentro de *Vibrio vulnificus*. *Environmental Microbiology Reports*, 62:918-927.
- Biosca, EG , Collado, RM , Oliver, JD y Amaro, C. (1999) Estudio comparativo de propiedades biológicas y características electroforéticas de lipopolisacáridos de cepas de *Vibrio vulnificus* virulentas y avirulentas de anguila. *Applied and Environmental Microbiology Journal*, **65**: 856 - 858.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben Dror, G., Lerner, L., *et al.* (1999). Características clínicas, epidemiológicas y microbiológicas

del biogrupo 3 de *Vibrio vulnificus* que causan brotes de infección de heridas y bacteriemia en Israel. *Lanceta* 354, 1421-1424.

Bisharat N, Koton Y, Oliver JD. (2020). La filogeografía del patógeno marino, *Vibrio vulnificus*, reveló los escenarios ancestrales de su evolución. *Microbiologíaopen* 9:e1103.

Bisharat, N., Cohen, D. I., Harding, R. M., Falush, D., Crook, D. W., Peto, T. y Maiden, M. C. (2005). Hybrid *Vibrio vulnificus*. *Emerging Infectious Diseases* 11(1), 30-35.

Bisharat, N., Amaro, C., Fouz, B., Llorens, A. y Cohen, D. I. (2007). Serological and molecular characteristics of *Vibrio vulnificus* biotype 3: evidence for high clonality. *Microbiology*, 153(3), 847–856.

Boyd, E., Cohen, A., Naughton, L., Ussery, D., Binnewies, T., Stine, O. y Parent, M. A. (2008). Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol*, 8(110), doi: 10.1186/1471-2180-8-110.

Beaz-Hidalgo., R. (2009). Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Resúmenes tesis doctorales. *SEM*, 47:4-5. 20.

Bell J. The polymerase chain reaction. *Immunol Today*. (1989). 10: 351-5.

Bolivar, M., Rojas, A., Garcia, P. PCR y PCR-Múltiple (2014). Parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Publicación Oficial del Instituto de Inmunología Clínica* 3(1): 25-33.

Brown, L.D., y Dorn, C.R. (1977). Fish shellfish and human health. *Journal of Food Protection* 40: 712-717.

- Beaz-Hidalgo, R. (2009) Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Resúmenes tesis doctorales. SEM. 47:4-5.
- Bisharat, N., y Raz, R. (1996). *Vibrio* infección en Israel debido a cambios en la comercialización del pescado. Lanceta, 348:1585-1586.
- Bier, N., Bechlars, S., Diescher, S., Klein, F., Hauk, G., Duty, O., Strauch, E. y Dieckmann, R. (2013). Genotypic Diversity and Virulence Characteristics of Clinical and Environmental *Vibrio vulnificus* Isolates from the Baltic Sea Region. Applied Environmental Microbiology, 79(12), 3570-3581.
- Carsten M., McDouglas D., Moreno A., Yung P., Septiembre (2005). Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation – driven persistence of *Vibrio cholerae*, 102(46):16819-16824.
- Cai, T., Jiang, L., Yang, C and Huang, K. (2005). Application of Real –Time PCR for Quantitative Detection of *Vibrio parahaemolyticus* from Seafood in Eastern China. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 46:180-186.
- Cai, T., Jiang, L., Yang, C., Huang, K. (2006). Application of real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* froms eafood in Eastern China. FEMS Immunol Med Microbiol 46 (2006): 180–186.
- Cáceres, J., Martínez y Vásquez. R. (2009). Manual de Buenas Prácticas de Manejo para el Cultivo de Moluscos Bivalvos.
- CDC (1999). Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* infection associated with eating raw oysters and clams harvested from Long Island Sound-Connecticut, New Jersey and New York, 1998. Morbidity Mortality Weekly Report, 48 (3), pp: 48-51.

- (CREHO, Inventario de los humedales continentales y costeros de Panamá, 2010).
- Cook, D.; O'leary, P.; Hunsucker, J.; Sloan, E.; Bowers, J.; Blodgett, R.; Depaola, A. (2002). *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U.S. retail shell oysters: A national survey from June 1998 to July 1999. *J. Food Prot.* 65: 79-87.
- Colwell, R., Grimes, J. Semantics and strategies. (2000) In: *Non-culturable microorganisms in the environment*. ASM Press, Washington D C. Pp: 1-6.
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5): 229-305.
- Colwell R. (1996) Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science*, 274: 2025-2031.
- Colwell, Rita R. (2004). Infectious disease and environment: cholera as a paradigm for waterborne disease. *International Microbiology* (7): 285- 289.
- Cohen, A. L., Oliver, J. D., DePaola, A., Feil, E. J. y Boyd, E. F. (2007). Emergence of a virulent clade of *Vibrio vulnificus* and correlation with the presence of a 33- kilobase genomic island. *Applied Environmental Microbiology*, 73(17), 5553– 5565.
- Chatzidaki-Livanis, M., Hubbard, M. A., Gordon, K., Harwood, V. J. y Wright, A. C. (2006). Genetic distinctions among clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus*. *Applied Environmental Microbiology*, 72(9), 6136– 6141.
- Chuang, Y. C., Yuan, C. Y., Liu, C. Y., Lan, C. K. y Huang, A. H. (1992). *Vibrio vulnificus* infection in Taiwan: Report of 28 cases and review of clinical

manifestations and treatment. *Clinical Infectious Diseases*, 15(2), 271–276.

Chung, K. J., Cho, E. J., Kim, M. K., Kim, Y. R., Kim, S. H., Yang, H. Y., Chung, K. C., Lee, S. E., Rhee J. H., Choy H. E. y Lee, T. H. (2010). RtxA1-induced expression of the small GTPase Rac2 plays a key role in the pathogenicity of *Vibrio vulnificus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(1), 97–105.

Chunga, J.C. (2018). *Vibrio cholerae y Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos en cuerpos de agua de Piura. (Tesis De Pregrado). Universidad Nacional De Piura, Peru.

Cruz, R. & J. Jiménez. (1994). Moluscos asociados a las áreas de manglar de la Costa Pacífica de América Central. EFUNA, Heredia, Costa Rica. 182 p.

Dabanch, J., Herrero, D., Pávez, C., Veas, N., Braun, S., Porte, L. Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista chilena de infectología*, 26(4): 360-362. 2009.

DePaola, A., Kaysner, C.A., Bowers, J., Cook, D.W. (2000). Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998) *Appl. Applied and Environmental Microbiology Journal*, 66, 4649-4654.

DePaola, A., Nordstrom, JL, Bowers, JC, Wells, JG & Cook, DW (2003b) Estacional abundancia de patógenos y totales *Vibrio parahaemolyticus* en ostras de Alabama *Microbiología aplicada y ambiental*, 69:1521-1526.

Desmarchelier, P.M. (1997). Pathogenic *Vibrios*. In A.D. Hocking, G. Arnold, I. Jenson, K. Newton and P. Sutherland, eds. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance* 5th Edition, pp 285 -312.

- Dileep, V., Kumar, Y., Nishibuchi, M., Karunasagar, I. (2003). Application of polymerase chain reaction for detection of *Vibrio parahaemolyticus* associated with tropical seafood and coastal environment. *Letters in Applied Microbiology*, 36:423-427.
- Dhar Rita, Badwi M, (2004). *Vibrio cholerae* (non-O1, non-O139) sepsis in a child with anemia, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Vol 50.
- Desmarchelier, P.M. (1997). Pathogenic *Vibrios*. In A.D. Hocking, G. Arnold, I. Jenson, K. Newton and P. Sutherland, eds. *Foodborne Microorganisms of Public Health Significance* 5th Edition, pp 285 -312.
- Deter, J., Lozach, S., Véron, A., Chollet, J., Derrien, A. y Hervio-Heath, D. (2010a). Ecología de patógenos y no patógenos. *Vibrio parahaemolyticus* en la costa atlántica francesa. Efectos de la temperatura, la salinidad, la turbidez y la clorofila a. *Reinar microbiología mental* 12: 929-937.
- Deter, J., Lozach, S., Derrien, A., Véron, A., Chollet, J. y Hervio-Heath, D. (2010b). La clorofila a podría estructurar una comunidad de Vibrionaceae cultivables potencialmente patógenas. Perspectivas de un estudio de un año sobre el agua y los mejillones encuestados en Costa atlántica francés *Informes de microbiología ambiental*, 2:185-191.
- De SN. Enterotoxocidity of bacteria-free culture-filtrate of *Vibrio cholerae* (1959). *Nature (London)*, 183: 1533-1534.
- Deepanjali, A., Kumar, HS, Karunasagar, I. y Karunasagar, I. (2005). Variantes estacionales a lo largo de la costa suroeste de la India. *Microbiología aplicada y ambiental*, en abundancia de total y patógenos *Vibrio parahaemolyticus* bacterias en ostras, 71:3575-3580.

- Esteve, C., Alcaide, E., Canals, R., Tomás, J.M. y Merino, S., (2005). *Vibrio vulnificus* en anguilas silvestres del lago de L'Albufera (Valencia): primera referencia de la existencia de cepas inmóviles y virulentas para-Anguilla, XX Congreso Nacional de Microbiología.
- Eastaugh, J., Shepherd S. (1989). Infectious and toxic syndromes from fish shellfish consumption. *Archives of internal medicine*, 149: 1735-40.
- Eiler AC, Gonzalez-Rey SA, Bertilsson S. Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio spp* to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water. *FEMS Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Ecology*. 2007; 60:411-18.
- Elliot, EL, CA Kaysner, L. Jackson y ML Tamplin. (1995). *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y otras *Vibrio spp*, pág. 9.01-9.27. En *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 8ª ed. AOAC Internacional, Gaithersburg, MD.
- FAO. (2020). El estado mundial de la pesca y la acuicultura (2020) La sostenibilidad en acción. Roma. <https://doi.org/10.4060/ca9229es>.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. (2011). Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and Technical report. *Microbiological Risk Assessment Series No. 16*. Rome. pp.193.
- Farmer, J.J. and Hickman- Brenner, F.W. (1992). The General *Vibrio* and *Photobacterium*, in *The Prokaryotes*, vol. III, (eds A. Barlows, H.G. Truper, M, Dworkin, W. Harder and H. Schleifer), Springer- Verlag, New York, pp 2952-3011.
- Farmer JJ3rd, Hickman-Brenner FW. C (2006). The genera *Vibrio* and *Photobacterium*. En: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH,

Stackebrandt E (eds). The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, vol. 6 (3rd Ed). Springer, New York. pp 508-563.

Faruque, Shah M. M. Albert John, and John J. Mekalanos. (1998). Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(4): 130-1314.

Faruque. Shah M., Sack David A. Sack R. Bradley, Colwell Rita R., Takeda Yoshifumi, and G. Nair Balakrish. Febrero 4 de (2003). Emergence and Evolution of *Vibrio cholerae* O139. 100(3): 1304-1309.

Faruque, S. M. y Mekalanos, J. J. (2003). Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. Trends Microbiology, 11(11), 505-510.

Farfán., Sellarés., Maribel, (2002) Estudio de la Estructura Genética de Poblaciones de *Vibrio cholerae*. Universidad de Barcelona. Consultado en la RedMundia http://www.tdx.cesca.es/tesis_ub/available/tdx0103103095654//tesis.pdf

Fernández, E. (2000). Microbiología e Inocuidad de Alimentos Universidad Autónoma de Querétaro. pp. 392-395.

Fontánez, Y. Determinación del perfil microbiológico de la almeja (*Lucina pectinata* Gmelin, (1791) del ostión de mangle (*Crassostrea rhizophorae* Guilding, (1828) y las aguas de extracción de bivalvos en la zona suroeste de Puerto Rico. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez. Puerto Rico. Tesis de Grado. 83 pp. 2005.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO). Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. Interpretative summary and technical report. Microbiological risk assessment Series, 2005:8.

- Fouz, B. y Amaro, C. (2002). Aislamiento de un nuevo serovar de *Vibrio vulnificus* patógeno para anguilas cultivadas en granjas de agua dulce. *Acuicultura*, 217: 677 - 682.
- Fouz, B., Larsen, JL y Amaro, C. (2006). *Vibrio vulnificus* serovar A: un patógeno emergente en la anguillicultura europea. *Journal of Fish Diseases*, 29: 285 - 291.
- Fouz, B., Roig, F.J. y Amaro, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of a new fish-virulent *Vibrio vulnificus* serovar that lacks potential to infect humans. *Microbiology*, 153 (6), pp: 1926-1934.
- Frampton, E.W.; Restaino, L. (1993). Methods for *Escherichia coli* identification in foods, water and clinical samples based on Beta-glucuronidasa detection. *Journal of Applied Bacteriology*, 74: 223-233.
- Fujino T., Okuno Y., Nakada D., Aoyama A., Fukai K., Mukai T., et al. (1953). Sobre el examen bacteriológico de la intoxicación alimentaria por Shirasu. *Medicina. J. Osaka Univ.* 4, 299-304.
- García, K., Bastías R., Higuera, G., Torres R., Mellado, A., Uribe, P. y Espejo, RT (2013). Auge y caída de la pandemia *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3: K6 en el sur de Chile. *Microbiología ambiental*, 15: 527-534.
- Gavilán, R.G. y Martínez, J. (2011). Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur. *Revista Peruana De Medicina Experimental Y Salud Pública*, 28 (1), 109-115.
- Guía del BAX® System (2016). Real-Time PCR Assay for *Vibrio cholerae/parahaemolyticus/vulnificus* (AOAC PTM #050902). pp 83-86.

- Gil AI, Miranda H., Lanata CF, Prada A., Hall ER, Barreno CM, et al. (2007). O3: Serotipo K6 de *Vibrio parahaemolyticus* idéntico al clon pandémico global asociado con diarrea en Perú 11, 324–328.
- Gutiérrez, J.M., Martos P.G. (1998). Vibrios de Origen Marino en patología humana, Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Volumen 15, Número: 7H Hlady, WG 1997. *Vibrio* infecciones asociadas con el consumo de ostras crudas en Florida, 1981-1994 Revista de protección alimentaria, 60: 353-357.
- Hernández C, Ulloa J, Vergara J, Espejo R, Cabello F. (2005). Infecciones por *Vibrio parahemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile. Rev Med Chile, 133(2):1081-1088.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. Genome Research 6: 986-994.
- Heitmann I.G., Jofré L., Hormázabal J.C., Olea A., Vallebuona C. & Valdés C. (2005). Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. La Revista Chilena de Infectología, 22 (2): 131-40.
- Hossain, M.T., Kim, E-Y. And Kim, Y-R (2012). Development of a groEL gene-based species-specific multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. Journal of Applied Microbiology, 114:448-455.
- Høi, L., Larsen, JL, Dalsgaard, I. y Dalsgaard, A. (1998) Ocurrencia de biotipos de *Vibrio vulnificus* en ambientes marinos daneses. Journal of Applied Microbiology, 64: 7 - 13.
- Hlady, W. G. y Klontz, K. C. (1996). The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. Journal of Infectious Diseases, 173(5), 1176-1183.

- Hida, T. e Yamamoto, K. (1990). Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a Kanagawa-phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain. *Gene*, 93(1), 9-15.
- Hygiena, (2017) RiboPrinter® System DNA Prep Enzyme, Ficha de seguridad <https://www.hygiena.com/wp-content/uploads/2020/06/SDS-RiboPrinter-DNA-Prep-Enzyme-ES.pdf>
- Huarcaya Castilla E, Rossi Leyva F, Llanos-Cuentas A. Influencia de factores climáticos sobre las enfermedades infecciosas. *Rev Med Hered* 2004; 15:218-24.
- Inoue, Y., Ono, T., Matsui, T., Miyasaka, J., Kinoshita, Y. e Ihn, H. (2008). Epidemio estudio lógico de *Vibrio vulnificus* infección en Japón entre 1999 y 2003 T el evista de Dermatología, 35:129-139.
- Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Japón (NIID). (2010). Enteritis por *Campylobacter* en Japón, 2006-2009. Informe de vigilancia de agentes infecciosos, 31(1):1-3.
- Johnson, C.N., Flowers, A.R., Noriera, III N.F., Zimmerman, A.M., Bowers, J.C., DePaola, A., y Grimes, D.J. (2010) Relación entre factores ambientales y *vibrios* patógenos en el norte del Golfo de México. *Microbiología aplicada y ambiental*, 76: 7076-7084.
- Kaper J.B., Morris, J.G., y Levine M. M. (1995). Cholera *Clin. Microbiol* 8:48-86.
- Kaneko, T. y Colwell, RR (1975). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* en Chesapeake Bahía. *Microbiología aplicada y ambiental*, 30: 251-257.
- Kaysner, C.A., DE Paola, A. (1998) *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio spp.* In: *Bacteriological Analytical*

Manual. 8th Ed. Food and Drug Administration (FDA). A.O.A.C. International, Gaithersburg, Md. USA. 9.01-9.2.

Kagiko M, Damiano A, Kayihura M. Characterisation of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from fish in Kenya East Afr Med J 2001; 78 (3):124-7.

Kwak, J. S., Jeong H. G. y Satchell, K. J. (2011). *Vibrio vulnificus* rtxA1 gene recombination generates toxin variants with altered potency during intestinal infection. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 108(4), 1645–1650.

Keen, A. M. (1971) Seashells of Tropical West America: Marine mollusks from Baja California to Peru, pp 1064.

Kim, M. S. y Jeong, H. D. (2001). Development of 16S rRNA targeted PCR methods for detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments. Aquaculture, 193, 199–211.

Kim, Y. R., Lee, S. E., Kook, H., Yeom, J. A., Na, H. S., Kim, S. Y., Chung, S. S., Choy, H. E. y Rhee, J. H. (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells.

Kobayashi, T., S. Enomoto y R. Sakazaki. (1963). Un nuevo medio de aislamiento selectivo para el grupo *vibrio* en medio de Nakanishi modificado (agar TCBS). Japanese Journal of Bacteriology, 18:387-392.

Kourany, M., Kinney RJ, Vasquez, M.A. (1974) *V. parahaemolyticus* en agua de mar frente a la costa del Pacífico de Panamá. Society of Tropical Medicine and Hygiene. 23, 714-715.

- Kourany, M., Vasquez M.A. (1975) El primer caso reportado en Panamá de gastroenteritis aguda causada por *Vibrio parahaemolyticus*. Society of Tropical Medicine and Hygiene. 24, 638–640.
- Krishna, B.V.S., Asha, B.P, Chandrasekhar, M.R. (2005). Fluoroquinolone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholerae outbreak in India, Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.
- KUEH, C.; CHAN, K.Y. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. Journal of Applied Bacteriology, 59: 41-47.
- LARKIN, E.; HUNT, D. (1982) Bivalve mollusks: control of microbiological contaminants. Bioscience. 32:193-197.
- Lambert, C., Nicolas, J. L., Cilia, V. and Corre, V. (1998). *Vibrio pectenida* sp. Nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Sociedad de Microbiología, 48(2): 481.
- Leyva, C.V.; Valdés, A.E.; Cisnero, D.E.; Pérez, S.B. (1996). Aislamiento de *vibrios* patógenos y valoración de la calidad sanitaria de ostiones frescos cosechados en Cuba. Rev Cubana de Alimentación y Nutrición, 10:189-98.
- Leyton, Y., Riquelme, C. (2008). *Vibrios* en los sistemas costeros. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 43(3): 441-456.
- Levine, M., Kaper, J. B., Herrington, D., Losonsky G., Morris J.G., Clements M. L., Black R. E., Tall, B. and Hall R. (1988) Volunteer studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. Infection and Immunity. 56(1):161-167.

- Levine, W. C. y Griffin, P. M. (1993) *Vibrio* infections on the Gulf Coast: results of first year of regional surveillance. *Journal of Infectious Disease*, 167(2), 479-483.
- Levine, C.; Ferrecio, V.; Pardo, M.; Cayazzo, P.; Abrego, J.; Martínez, L.; Maggi, M.; Baldini, W.; Manewal, D.; Kay, B.; Guers, L.; Lior, H.; Wasswman, S.; Nataro, J. (1993). Epidemiologic studies of *Escherichia coli*, diarrheal infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago of Chile. *Am. J. Epidemiol.* 138 (10): 849-869.
- Lee, M.A., Squirrell, D.J., Leslie, D.L. & Brown, T. (2004). Homogeneous Fluorescent Chemistries. In: *Real-Time PCR; An Essential Guide*.
- Lee, B. C., Choi, S. H. y Kim, T. S. (2008). *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection*, 10, 1504-1513.
- Lo, H. R., Lin, J. H., Chen, Y. H., Chen, C.L., Shao, C.P., Lai, Y. C. y Hor, L. I. (2011). RTX toxin enhances the survival of *Vibrio vulnificus* during infection by protecting the organism from phagocytosis. *Journal of Infectious Diseases*, 203(12), 1866– 1874.
- López, L; Manjarrez G; Herrera, L; Montes A; Olascuaga, Y; Ortega, (2010) Estudio piloto para el aislamiento de *vibrio* spp en ostras (*crassostrea rhizophorae*) capturadas en la ciénaga de la virgen, cartagena, Colombia revista de salud publica y nutrición. 11(1).
- Lucero, C., J. Cantera y R. Neira. 2007. Pesquería y crecimiento de *Anadara tuberculosa*, en el pacífico colombiano. *Revista de Biología Tropical*, San José, Costa Rica.

- Logar-Henderson, C., Ling, R., Tuite, A. R., & Fisman, D. N. (2019). Effects of large-scale oceanic phenomena on non-cholera vibriosis incidence in the United States: implications for climate change. *Epidemiology and Infection*, 147, e243. <https://doi-org.accedys2.bbt.ull.es/10.1017/S0950268819001316>.
- Lijima, Y. Asako, N.T. Ithara, M. Hayashi, K. (2004). Improvement in the Detection rate Diarrhoeagenic bacteria in human Stool specimens by a rapid Real. Time PCR Assay. *J. Medical. Microbiol.* 53:617-622.
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanés, J., Pazos, Y García Martín, O. 2008. Determinantes ambientales de la ocurrencia y distribución de *Vibrio parahaemolyticus* en las rías de Galicia, España. *Microbiología aplicada y ambiental.* 74: 265-274.
- Matsumoto, C., Okuda, J., Ishibashi, M., Iwanaga, M., Garg, P., Rammamurthy, T., Wong, H. C., Depaola, A., Kim, Y. B., Albert, M. J. y Nishibuchi, M. (2000). Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed pcr and toxRS sequence analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 578–585.
- Méndez-Alvarez S, Pérez-Roth E. La PCR múltiple en microbiología clínica. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2012; 3:898-905.
- Morris, J.G. Jr. (1990). Non-O group 1 *Vibrio cholerae*: a look at the epidemiology of an occasional pathogen. *Epidemiological Review*, 12: 179-191.
- Moreno, M.L., Landgraf, G.M., (1997), Presencia de *Vibrio vulnificus* en algunos alimentos de origen marino. *Revista de Microbiología e Inmunología Clínica*, 17(2); 457-467.

- MOSSEL, D.A.; MORENO, G. Microbiología de Alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 135 pp. 1985.
- Moore, S., Thomson, N., Mutreja, A. y Piarroux, R. (2014). Widespread epidemic cholera caused by a restricted subset of *Vibrio cholerae* clones. *Clin Microbiol Infect*, 20 (5), 373-379.
- Morrison, S. S., Williams, T., Cain, A., Froelich, B., Taylor, C., Baker-Austin, C., Varner-Jeffreys, D., Hartnell, R., Oliver, J. D. y Gibas, C. J. (2012). Pyrosequencing-based comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus* environmental isolates. *PLoS ONE*, 7(5), e37553 doi: 10.1371/journal.pone.0037553.
- McLandsborough, L. 2005. Food Microbiology Laboratory CRC Serie in Contemporary Food Science. CRC Press. 1° Edition. 33.
- CLAughlin JC. Chapter 35. *Vibrio*. En: JoBaron E, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Murray PR (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, D.C, 1995:465-476.
- McGuire, K., Anju, M., Russell, G.C., Springbett, A., Craigmile, S.C., Nichani, A.K., Malhotra, D.V. & Glass, E.J. (2004). Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in *Theileria annulata* infected cell lines derived from resistant and susceptible cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 99: 87-98.
- McFeters G, Barry J, Howington J (1993). Distribution of enteric bacteria in antarctic seawater surrounding a sewage outfall. *Water Res*. 27: 645-650.
- Murciano, C., Hor, LI y Amaro, C. (2015) Interacciones huésped-patógeno en *Vibrio vulnificus*: respuestas de monocitos y células endoteliales vasculares a bacterias vivas. *Future Microbiology*, 10: 471 - 487.

- Muñoz, D.; Graü DE M., C.; Martinez, C.; Marval, H.; Zerpa, A. (2008). Prevalencia de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. Y enterobacterias en carne de pepitona, Arca zebra, comercializada en Cumaná, Venezuela. *Zootecnica Tropical*, 26(4): 505-513.
- Nair, GB, Ramamurthy, T., Bhattacharya, SK, Dutta, B., Takeda, Y. y Sack, DA (2007). Difusión mundial de *Vibrio parahaemolyticus* serotipo O3: K6 y su serovariantes. *Revisiones de microbiología clínica*, 20: 39-48.
- Nair, (2000). Emergence of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Serotype Inaba from the Prevailing O1 Ogawa Serotype Strains in India. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11):4249-4253.
- Nascimento, SM, dos Fernandes Vieira, RH, Theophilo, GN, Dos Prazeres Rodrigues, D. y Vieira, GH (2001). *Vibrio vulnificus* como peligro para la salud de los consumidores de camarones. *Rev do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 43: 263 – 266.
- Neogi, S.B; Chowdhury, N; Asakura, M; Asakura, M; Hinenoya, S; Aldar, S, M; Saidi, K; Kogure, R.J; Laura, S; Yamasaki. (2010). A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*, *Letters in Applied Microbiology* ,51: 293-300.
- NISHIBUCHI, M. Molecular identification (2006) In: *The biology of vibrios*. Thompson, F.L.; Austin, B.; Swings, J. (Eds). ASM, Washington D.C. Pp 44-64.
- Nilsson, W. B., Paranjype, R. N., DePaola, A. y Strom, M. S. (2003). Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 442-446.

- Oliver, J.D. (1989). *Vibrio vulnificus*. In M.P. Doyle, ed. Foodborne Bacterial Pathogens, pp 569-600.
- 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, pp 228-264.
- Oliver, JD (2005) Infecciones de heridas causadas por *Vibrio vulnificus* y otras bacterias marinas. *Epidemiology and Infection*, 133: 383 – 391.
- Osawa R, Okitsu, T., Morozumi, H. y Yamai, S. (1996). Occurrence of urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in Kanagawa, Japan, with specific reference to presence of thermostable direct hemolysin (TDH) and the TDH-related-hemolysin genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 725-727.
- CDC. (2013). *Vibrio vulnificus*. Recuperado el 1 octubre de 2014, de: <http://www.cdc.gov/vibrio/vibriov.html>.
- Paredes C., Cardoso, F. (2001). El género *Donax* en la costa peruana (Bivalvia: Tellinoidea). *Revista Peruana de Biología*, 8(2): 083-093.
- Pallavi Garg, Ranjan K. Nandy, Papiya Chaudhury, Nandini Roy Chowdhury, Keya D, T. Ramamurthy, Shinji Yamasaki, S. K. Bhattacharya, Yoshifumi Takeda, y G. Balakrish Nair, (2000). Emergence of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Serotype Inaba from the Prevailing O1 Ogawa Serotype Strains in India, *J. Journal of Clinical Microbiology* 2000, November; 38(11):4249-4253.
- Parveen, S., Hettiarachchi, KA, Bowers, JC, Jones, JL, Tamplin, ML, McKay, R., Beatty, W., Brohawne, K., DaSilva, LV y DePaola, AD. (2008) Distributions estacional bution de total y patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en ostras de la bahía de Chesapeake y aguas. *Revista Internacional de Microbiología de Alimentos*, 128: 354-361.

- Pace J.L., Chai T.J., Rossi H.A. & Jiang X. (1997). Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environmental Microbiology*, 63: 2372-2377.
- Panicker, G., Myers, M. L., Bej, A. K. (2004). Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in Shellfish and Gulf of Mexico Water by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 498-507
- Panicker, G., Michael C.L. Vickery, and Asim K. Bej. (2004). Multiplex PCR detection of clinical and environmental strains of *Vibrio vulnificus* in shellfish. *Canadian Journal of Microbiology*. 50(11): 911-922.
- PNUMA (2003). *Perspectivas del Medio Ambiente Mundial GEO 3*. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Mundi Prensa. Madrid, España. 410pp. Panamá Digital (2020).
<https://www.panamadigital.gob.pa/Noticia/exportaciones-panamenas>.
- Porras G, Viana J, Chávez B, Sierra J. (1994). *Vibrio vulnificus* en México: reporte de un caso y revisión de la literatura. *Revista de Investigaciones Clínicas* 46:495-8.
- Poutiers, J.M. (1995a). Bivalvos En: *Guía FAO para la Identificación de Especies para los Fines de la Pesca. Pacífico Centro-Oriental*. Vol. 1. Plantas e Invertebrados. FAO, Roma (W.K. Fischer, F. Schneider, W. Sommer, C. Carpenter, K.E. y V.H. Niem, Eds). Pp.100-222.
- Programa canadiense de saneamiento de mariscos. (2010). y el manual de microbiología de alimentos (2005).
- Phuektes P, D Mansell, F Browning. (2001). Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 84,1140-1148.

- Quiñones-Ramírez, E., Vásquez-Salinas, C., Pedroche, F., Moreno-Sepúlveda, L.; Rodassuarez, O. (2000). Presencia de los géneros *Vibrio* y *Salmonella*, y detección de coliformes fecales en almejas del Golfo de México. *SciELO Analytics Hidrobiológica*.10 (2): 131-138.
- QUEVEDO, F.; GONZALEZ, A. (1994). Enfermedades transmitidas por alimentos. Impacto socioeconómico. *La aliment. Latin*. 203: 52-60.
- Raguénès, G.R., Guezennec, J., Pignet, P. and Barbier, G. (1997). *Vibrio diabolicus* sp. nov, a new polysaccharides ecreting organism isolated from a deep-sea hidrotermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International Journal of Systematic Bacteriolo*.47 (4):989-995.
- Raskin, D. M., Seshadri, R., Pukatzki, S. U. y Mekalanos, J. J. (2006). Bacterial genomics and pathogen evolution. *Cell*, 124(4), 703–714.
- Raghunath P., Karunasagar M. & Karunasagar I. (2009). Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth. *Inter. Journal of Food Microbiology*, 129: 200–203.
- Rowe-Magnus, D. A., Zouine, M., Mazel, D. Fabiano, L.T., Brian, A., Swings, J.G. (2006). The adaptive genetic arsenal of pathogenic *vibrio species*: the role of integrons. In: *The biology of vibrios*. ASM Press, Washington, DC.Pp: 95-111.
- Roig FJ, González-Candelas F, Sanjuán E, Fouz B, Feil EJ, Llorens C, Baker-Austin C, Oliver JD, Danin-Poleg Y, Gibas CJ, Kashi Y, Gulig PA, Morrison SS, Amaro C. (2018). Filogenia de *Vibrio vulnificus* a partir del análisis del genoma central: implicaciones para la taxonomía intraespecies. *Rev Microbiologica de Argentina*, 8:2613.

- Roig, F. J., Sanjuán, E., Llorens, A. y Amaro, C. (2010). pilF polymorphism-based PCR to distinguish *Vibrio vulnificus* strains potentially dangerous to public health. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1328-1333.
- Roig, F. J., González-Candelas, F. y Amaro, C. (2011). Domain organization and evolution of multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin in *Vibrio vulnificus*. *Applied Environmental Microbiology*, 77(2), 657–668.
- Rosche, T.M., Yano, Y. y Oliver, J.D. (2005). A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiology and Immunology*, 49(4), 381-389.
- Rodríguez Rivero, Susana, (2009). Diagnóstico del Cultivo y Extracción de Moluscos en Centroamérica Pp 18-78.
- Rosche, T. M., Binder, E. A. y Oliver, J. D. (2010). *Vibrio vulnificus* genome suggests two distinct ecotypes. *Environmental Microbiology reports*, 2(1),128-132.
- Rippey, SR (1994) Enfermedades infecciosas asociadas al consumo de moluscos. *Clinical Microbiology Reviews*, 7: 419 – 425.
- Sánchez Joaquín, (2005). Cólera: La bacteria causal y su toxina. Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Recuperado de la Red Mundial.
- Sánchez, L.P. (2020). Caracterización molecular de aislamientos de *Vibrio spp.*, recuperados de cuerpos de agua en Colombia y recuperados a través de la vigilancia por laboratorio de Microbiología del Instituto Nacional de

Salud (INS), Maestría en Ciencias-Microbiología, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.

Satchell, K. J. (2007). MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infection and Immunity*, 75(11), 5079-5084.

Sakurai, J., Matsuzaki, A. y Miwatani, T. (1973). Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, 8(5), 775–80.

Sanjuán E, Fouz B, Oliver JD, Amaro C. (2009). Evaluación de métodos genotípicos y fenotípicos para distinguir cepas clínicas de *Vibrio vulnificus* ambientales. *Applied and Environmental Microbiology*, 75:1604–1613.

Sanyal S. Epidemiology and Pathogenicity of Non-O1 *Vibrio* Species and related Organisms. *Current Topics in Infectious Disease. Cholera*. Ed. Barua D., Grwnnough III W., N York 1992; 3: 57-67.

Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. SERNAPESCA (2018). Control sanitario de Moluscos Bivalvos. Parte II sección1. Manual de Inocuidad y certificación. Departamento de Sanidad Pesquera. Chile.

Strom, M.S., y Paranjpye, R.N. (2000). Epidemiología y patogenia de *Vibrio vulnificus*. *ELSEVIER*, 2(2):177-88.

Sarcos, M., Botero, L. (2005). Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda solida* recolectada en playas del Municipio Miranda del Estado Zulia. *Cien*. 13(1): 34-43.

- Solo-Gabrielle, H.; Wolfert, M.; Desmarais, T.; Palmer, C. (2000). Sources of *Escherichia coli* in a coastal subtropical environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1): 230-237.
- Sint D, Raso L, Traugott M. (2009). Advances in multiplex PCR: balancing primer
Microbiol. 47:1871–7.
- Taylor R.K., Miller V.L., Furlong D.B., Mekalanos J.J. (1987). Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor co-ordinately regulated with cholera toxin. Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School. 84: 2833-2837.
- Taneja N., Biswal M., Tarai B., Sharma M.; Mayo (2005). Emergence of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Serotype Inaba in North India, *Journal of Community Medicine*, 58: 238-240.
- Thompson, J.R., Polz, M.F. (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. In: *The biology of vibrios*. Thompson, F.L.; Austin, B.; Swings, J. (Eds.). ASM Press, Washington DC. Pp: 190-203.
- Thompson CA Jr, Vanderzant C. (1976c). Serological and hemolytic characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from marine sources. *Journal of Food Protection*. 41(1):204-205.
- Trompiz, L.; Judith, A. (2000). Identificación de diferentes especies de *Vibrio* en muestras de agua y ostras en el Gran Eneal Municipio Páez. *Memorias. Congreso Venezolano de Microbiología. Sociedad Venezolana de Microbiología. Capitulo Zulia, Maracaibo. 5-8/Noviembre. Venezuela.* 106pp.

- Tison, DL, Nishibuchi, M., Greenwood, JD y Seidler, RJ (1982). *Vibrio vulnificus* biogrupo 2: nuevo biogrupo patógeno para las anguilas. Applied and Environmental Microbiology, 44: 640 - 646.
- Tison, D. y Kelly, M. T. (1986). Virulence of *Vibrio vulnificus* Strains from Marine Environments. Applied and Environmental Microbiology, 51(5),1004-1006.
- Thiaville, P. C., Bourdage, K. L., Wright, A. C., Farrell-Evans, M., Garvan, C. W. y Gulig, P. A. (2011). Genotype is correlated with but does not predict virulence of *Vibrio vulnificus* biotype 1 in subcutaneously inoculated, iron dextran treated mice. Infection and Immunity, 79(3), 1194-1207.
- Villalobos, DE B. L. B.; Elguezábal, L.; Sánchez, I. (1997). Efecto de la precipitación atmosférica en la calidad sanitaria del bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná, estado Sucre. XLVII convención anual de la AsoVAC. Acta científica venezolana, 48 (Supl. 1): 144.
- Watkins, W.D., Cabelli V.J. (1985). Effect of fecal pollution on *Vibrio parahaemolyticus* densities in an estuarine environment. Applied and Environmental Microbiology, 49 (5):1307-1313.
- West, P. (1989). The humans pathogenic *vibrios*. A public health update with environmental perspectives. Epidemiology & Infection. 103:1-34.
- Wood, P. C., (1979). Manual de higiene de los moluscos. Factores del medio marino que influyen sobre la higiene de los moluscos. Acribia. Zaragoza, España. pp135.
- Wolfe, M. (19929). The effects of cholera on the importation of foods: Perú – a case study. PHLS Microbiology Digest, 9: 42-44.

- Wong H.C., Liu S.H., Ku L.W., Lee I.Y., Wang T.K., Lee Y.S., Lee C.L., Kuo L.P., & Shih D.Y.C. (2000). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan. *Journal of Food Protection*, 63: 900–906.
- Yamai, S., Okitsu, T., Shimada, T., Katsube, Y. (1997). Distribution of serogroups of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 with specific reference to their ability to produce cholera toxin, and addition of novel serogroups. *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases Dis*, 71 (10):1037-1045.
- Zabala, B., García, K., y Espejo, RT8. (2009). Mejora de la sensibilidad a la luz ultravioleta de un-*Vibrio parahaemolyticus* O3: Cepa pandémica K6 debido a la lisogenización natural por un fago telomérico. *Microbiología aplicada y ambiental*, 75: 1697-1702.
- Zaidenstein, R., Sadik, C., Lerner, L., Valinsky, L., Kopelowitz, J., Yishai, R., Agmon, V., Parsons, M., Bopp, C. y Weinberger, M. (2008). Clinical Characteristics and Molecular Subtyping of *Vibrio vulnificus* illnesses, Israel. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), 1875-1882.
- Zúñiga I. R., Lozano J. C., (2014) *Vibrio vulnificus* una bacteria al acecho en las playas, *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría* 18(110); 1-3.

ANEXOS

Procesamiento de las muestras en los laboratorios LAMEXA Y LAMA

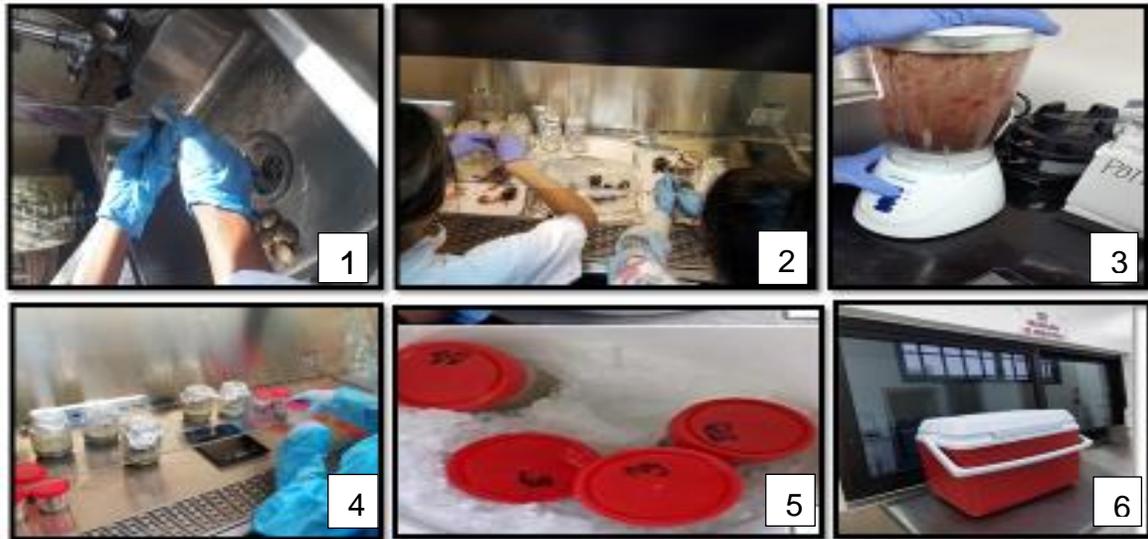


Figura 19. 1) Lavado y cepillado de almejas con agua, 2) Apertura de los bivalvos para extracción del cuerpo y líquido intervalvar, 3) Licuado de la muestra, 4) Pesaje de la muestra para su fraccionamiento, 5), Movilización de las muestras en cadena de frío, 6) Transporte de la muestra para su procesamiento en el laboratorio Food Safety S.A.

Procesamiento de las muestras en el laboratorio Food Safety S.A

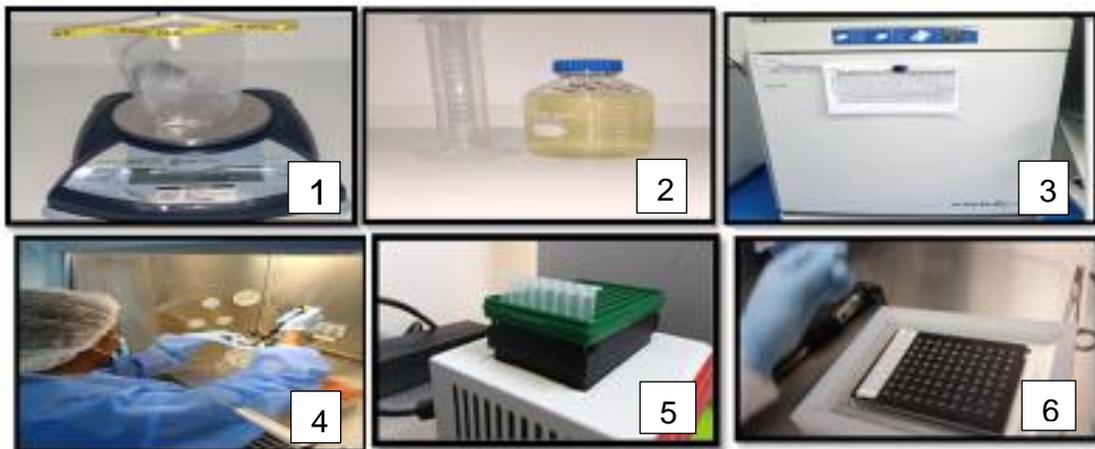


Figura 20. 1) Pesaje de las muestras, 2) Enriquecimiento de la muestra, 3) Incubación de las muestras a 35°C, 4) Pase de muestras en buffer, 5) Lisados en bloque térmico, 6) Hidratación de las muestras.

Procesamiento de las muestras de PCR en tiempo final.

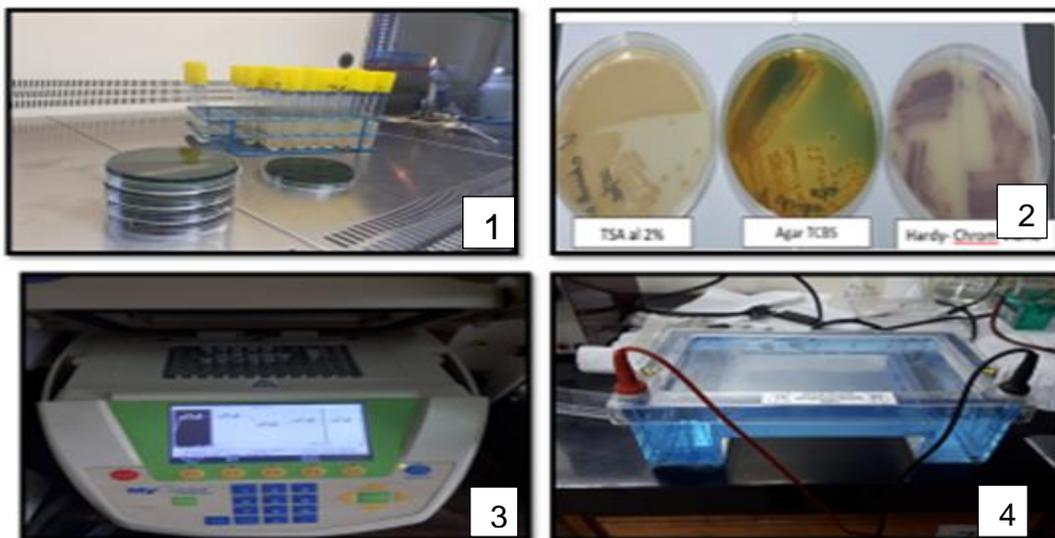


Figura 21. 1) Aislamiento de de *Vibrios* en agar TCBS, 2) Cepas puras, de 3) lisados de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae* e PCR-Multiple , 4) Corrida de PCR-Multiple en gel de agarosa 1.5%.