

Revisión : Evaluación de riesgo microbiológico de *Vibrio parahaemolyticus* moluscos bivalvos. Experiencia chilena desde 1998.

Review: Microbiological risk assessment of *vibrio parahaemolyticus* bivalve molluscs. Chilean experience since 1998.

✎ Viviana Cachicas ¹;

✉ 1 Instituto de Salud Pública de Chile

✉ Autor para correspondencia: Viviana Cachicas. Email: vcachica@ispch.cl

RESUMEN

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria de origen marino que junto a *Vibrio cholerae* y *Vibrio Vulnificus* produce la mayor incidencia de enfermedad del género *Vibrio* en humanos en el mundo. *Vibrio parahaemolyticus*, puede estar presente en moluscos bivalvos por su capacidad bioacumuladora y es significativamente afectado por variables ambientales como salinidad y temperatura atmosférica. Mundialmente se han descrito brotes asociados a la ingesta de moluscos desde el año 1957, especialmente en los periodos estivales. Chile y Perú, se han expuesto a brotes de gastroenteritis causados por *Vibrio parahaemolyticus* entre los años 1997-1998 y 2004-2012, debido al aumento de temperatura de la corriente de Humboldt. El objetivo de este trabajo, es levantar la información generada en los años asociados a los principales brotes en el país, centrada en estudios analíticos ambientales de evaluación de riesgo con colaboraciones entre la academia, laboratorios de referencias y organismos oficiales enfocados en la inocuidad de los alimentos.

Palabras Claves:

Vibrio parahaemolyticus;
brotes; moluscos; Salud
ambiental; Chile.

Keywords:

Vibrio parahaemolyticus;
outbreaks; molluscs;
Environmental health; Chile.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is a bacterium of marine origin that, together with *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*, causes the highest incidence of *Vibrio* disease in humans in the world. *Vibrio parahaemolyticus*, may be present in bivalve mollusks due to its bioaccumulator capacity and is significantly affected by environmental variables such as salinity and atmospheric temperature. Outbreaks associated with their ingestion of molluscs have been described worldwide since 1957, especially in summer periods. Chile and Peru have been exposed to outbreaks of gastroenteritis caused by *Vibrio parahaemolyticus* between the years 1997-1998 and 2004-2012, due to the increase in temperature of the Humboldt current. The objective of this work is to collect the information generated in the years associated with the outbreaks in the country, focused on environmental analytical studies of risk assessment with collaborations between academia, reference laboratories and official organizations related on food safety.



Copyright © 2024. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de la *Creative Commons Attribution License (CC BY)*. El uso, distribución o reproducción en otros foros esta permitido, siempre que el/los Autor/es y el/los dueño/s de los derechos de autor sean acreditados y que la publicación original sea citada, en concordancia con la práctica académica aceptada. No usar, distribuir o reproducir si no se cumplen con estos términos.

Conflicto de interés. El autor declara no tener ningún conflicto de intereses.

Financiamiento. La elaboración de este estudio no contó con fuentes de financiación específicas.

INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus (*V. parahaemolyticus*), es una bacteria Gram negativa de origen marino miembro de especie *Vibrio* de la familia *Vibrionaceae*, caracterizada por su rápida proliferación en aguas temperadas y tropicales con tiempos de generación cortos de 9 minutos debido a la presencia de dos cromosomas (1). Junto a *Vibrio vulnificus* y *cholerae*, forman la triada de especies de *Vibrio*, que causa más enfermedad en humanos en el mundo. Mientras *V. cholerae*, se asocia a bajos niveles de higiene por su capacidad de crecer en aguas dulces, *V. vulnificus* se asocia a exposición de la piel en aguas recreacionales durante olas de calor. La última pandemia de *V. cholerae* afectó a 21 países de América con 1.198.979 casos con baja letalidad (2). En Chile, reapareció el año 1991 con pocos casos luego de estar ausente por más de 100 años. Con respecto a *V. vulnificus*, en Chile no se han detectado casos nativos probablemente debido a la alta salinidad de sus aguas (3,4).

V. parahaemolyticus crece en un rango amplio de temperatura, pH y alta tolerancia a la salinidad. Es nativa en los ambientes marinos encontrando condiciones ideales de proliferación en estuarios y es potencialmente presente en moluscos bivalvos por su alta capacidad de bioacumulación especialmente en los periodos estivales. Fue descubierta en Japón por primera vez en 1950 en un brote de gastroenteritis aguda de 272 personas con 20 muertes por consumo de shirasu (5). Los síntomas clínicos causados en la gastroenteritis son dolores abdominales, diarreas, náuseas, dolor de cabeza y escalofríos. La mayoría son infecciones autolimitantes sin intervención médica. Actualmente la multiresistencia de *V. parahaemolyticus* se ha convertido en un tema importante en seguridad alimentaria enfocado en la búsqueda de drogas y vacunas efectivas debido al peligro de ser adquiridas en la industria de la acuicultura (6).

Hasta el año 1969, los brotes estuvieron restringidos geográficamente a Japón y luego en diversas localidades del Atlántico, Pacífico, Golfo de México y Hawái. Casos esporádicos fueron descritos en Europa, África, Nueva Zelandia y países del Asia (7). Actualmente, la epidemiología de *V. parahaemolyticus* sigue asociada al consumo de productos del mar crudos o insuficientemente cocidos en los

meses de verano, frecuentemente caracterizados tanto por casos esporádicos como grandes brotes, afectando la salud pública.

Los *V. parahaemolyticus* de pacientes han sido por décadas aislados por metodologías microbiológicas tradicionales, principalmente desde enriquecidos alcalinos y el agar selectivo Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sucrosa (agar TCBS) desarrollado en Japón en 1963 (8). Este agar, contiene sales biliares y pH alcalino de 8.6 para inhibir la flora acompañante de bacterias Gram negativas como proteus y coliformes, y las colonias de *V. parahaemolyticus* y otros *Vibrios* de importancia en la salud pública como *V. cholerae* y *V. vulnificus*, son seleccionadas por su capacidad de metabolizar la sacarosa. Además, desde el año 2001, existe comercialmente un agar cromogénico selectivo menos inhibitor que TCBS, que contiene sustratos para la actividad enzimática Beta-galactosidasa, mejorando el aislamiento de cepas (9). Estos aislados, han permitido estudios y vigilancias de diversidades genéticas de los clones en circulación mundial, en relación a factores de virulencia para entender su mecanismo de patogenicidad. Los aislados ambientales han sido obtenidos principalmente de moluscos bivalvos, y su aislamiento se ha dificultado por la mayor abundancia relativa de otras especies de *Vibrio*. Estos, se han caracterizado por su gran diversidad y ausencia de los factores de virulencia presentes en la mayoría de los aislados clínicos.

La patogenicidad de los aislados clínicos ha sido ampliamente estudiada y la información existente se ha desarrollado a la par del avance de la ciencia y tecnología. El año 1968, Japón desarrolló el agar Wagatsuma para visualizar la actividad hemolítica frecuentemente asociada a la patogenicidad (10,11). Esta hemólisis era observada solo en los aislados clínicos. Más tarde, la purificación y caracterización de hemolisinas, denominadas TDH (Termolisina termo estable) y TRH (Termolisina Relacionada), permitió su detección por técnicas moleculares (PCR)(12,13). Estas dos hemolisinas siguen siendo los mejores indicadores de potenciales virulencias de las cepas aisladas (14).

Hasta el año 1996, las cepas predominantes estuvieron asociadas a diversos serovares y distribución localizada en el mundo, por ejemplo o1:K38, o3:K6, o2:K3, o4:K8 y (15).

En febrero de 1996, aumentaron las infecciones en Kolkata, India. Los pacientes fueron hospitalizados y las cepas aisladas cambiaron la epidemiología asociadas a otro grupo clonal de diferentes fenotipos liderados por el serovar O3:K6 con marcadores genéticos específicos *tdh*, *toxRS* y/o *orf8*. Este grupo clonal incluyó un mayor número de serovares: O1:K25, O1:K24, O1:K56, O1:KUT, O3:K6, O3:K58, O3:K68, O3:K75, O4:K8, O4:K12, O4:K68, O4:KUT, O5:KUT y O1:K6. De estos, los predominantes fueron O3:K6, O4:K68, O1:K25, O1:K26 y O1:KUT. Su diseminación por Sudamérica fue considerada rápida, apareciendo inicialmente en Perú con más de 100 casos en 1996 y en la temporada estival siguiente, 273 casos notificados en la ciudad de Antofagasta, Chile. (16).

Este brote de Antofagasta, alertó a los microbiólogos clínicos y ambientales a comprender el fenómeno y no fue hasta el año 2004, cuando *V. parahaemolyticus* realmente azotó a nuestra población y cuestionó nuestras exportaciones de moluscos. Su impacto duró casi una década y todas las organizaciones se coordinaron para entender y mitigar el fenómeno. Hasta la fecha, el Ministerio de Salud del país, prohíbe el consumo de mariscos crudos y recomienda solo la compra de moluscos desde lugares autorizados. Los laboratorios ambientales utilizando metodologías microbiológicas tradicionales utilizadas en el aislamiento de *V. cholerae*, intentaron cuantificar *V. parahaemolyticus* por gramo de molusco. En forma paralela, el Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA) (17) verificó las áreas de cultivos de moluscos asociados a las exportaciones y FAO/OMS promovieron los estudios enfocados en evaluación de riesgo.

EVALUACIÓN DE RIESGO MICROBIOLÓGICO PARA *Vibrio* spp EN ALIMENTOS MARINOS.

El análisis de riesgo, es un proceso que incluye evaluación de riesgo (*Risk assessment*), manejo de riesgo (*Risk management*) y comunicación del Riesgo (*Risk communication*) (18). Enfocados a los alimentos, tiene como objetivo producir alimentos más seguros, reducir el número de casos de enfermedad y facilitar el movimiento de los alimentos a nivel interno y mundial. La evaluación de riesgo microbiológico (en inglés; *Microbiological Risk Assessment, MRA*), es el

componente científico del análisis de riesgo, da la posibilidad de ordenar los datos existentes para comprender a los microorganismos que nos causan enfermedad mediante el estudio de su crecimiento, sobrevivencia y muerte. Permite comprender la producción, procesamiento y preservación de alimentos. Así, es posible estimar el riesgo en la salud humana, proveer herramientas para evaluar diferentes escenarios y optimizar las intervenciones de mitigación.

FAO/OMS mediante consulta de expertos, enfoca sus estudios de evaluación de riesgo en duplas patógeno-matriz alimentaria. En relación a patógenos del género *Vibrio*, considera tres especies como responsables de causar enfermedades relacionadas con el consumo de varias matrices de alimentos especialmente moluscos bivalvos: *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*. Desde el año 2001, FAO/WHO inició una serie de evaluaciones de riesgo y guías del género *Vibrio*, las que han incluido *V. vulnificus* en ostras crudas (MRA 8 /2005) (19), *V. cholerae* toxigénico O1 y O139 en camarones de agua templada (MRA 9 /2005)(20) y *V. parahaemolyticus* en alimentos marinos (MRA 16 / 2011) (21). Selección y aplicación de métodos para la detección y enumeración de *Vibrio spp* patógeno humanos en alimentos marinos (MRA 20/2016) (22), herramientas de evaluación de riesgo para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* asociados con alimentos marinos (MRA 22/2020) (23) y avances en ciencia y herramientas de evaluación de riesgo para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* asociados a alimentos marinos (MRA 35/2021) (24). La Sección de Microbiología de alimentos y Ambiente del Departamento de Referencia Ambiental del Instituto de Salud Pública de Chile, (ScMALAM) (25), tuvo una activa participación en las series MRA 20, 22 y 35 especialmente con la participación en el proyecto coordinado por FAO para Sudamérica (26) y proyecto de bienes públicos (27).

En la series de MRA enfocados en *V. parahaemolyticus*, el único gran modelo fue realizado en Estados Unidos de América, con la intención de ser validado en otros países como Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelandia y Chile (21). Tempranamente, se reconoció las diferencias y la necesidad de utilizar datos locales para mejorar la precisión de acuerdo a los objetivos de evaluación de riesgo regionales. Aplicados

a las regiones se observó múltiples variables que influyen en el modelo: diferencia entre moluscos de interés, diferentes prácticas de producción, cosecha y poscosecha, y condiciones ambientales de los nichos de producción. Estas variables aumentaron la incertidumbre de los modelos predictivos.

El modelo de USA, tuvo éxito en tres factores: Primero estimar la enfermedad causada por diferentes especies de ostras crecidas bajo varios regímenes y sistemas de manejo regulatorio. Segundo, el modelo podía ser modificado y utilizado por evaluadores de riesgo de otros países. Y tercero, el modelo podía ser utilizado para determinar la eficacia de las estrategias de mitigación en la cosecha, por ejemplo someter los moluscos a enfriamiento rápido y controlado. Las principales dificultades para aplicar este modelo en otras regiones fueron tres: La primera fue la ausencia de datos de la abundancia de *V. parahaemolyticus* patógeno en aguas y moluscos y los factores que manejan su incidencia en el ambiente. Segundo, el rol de las especies en concentrar y retener *Vibrio*, y tercero; claridad del sistema de reporte/

subreporte de casos de cada país, así como la capacidad de detectar la emergencia de cepas nuevas.

El modelo de USA, fue criticado por estimar el porcentaje de cepas tdh positivas de un 0,2% en las regiones del Atlántico y Golfo, y 3% en las áreas del pacífico. Posteriormente, estas cepas se han encontrado que varían en un 100% en forma temporal y geográfica. Consideró que todas las cepas tdh positivas son igualmente virulentas con dosis infecciosas LD50 entre 1 y 10 millones, observándose en los brotes de Alaska y brotes de serotipos O3:K6 y O4:K12 valores mayores (24).

METODOLOGIAS PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR *V. PARAHAEMOLYTICUS*

Los métodos microbiológicos y moleculares comúnmente aplicados para aislar y caracterizar cepas de *V. parahaemolyticus* tienen ventajas y limitaciones según el propósito de la información que se requiere obtener, estos a la fecha se resumen en la siguiente tabla (24):

Tabla 1 Métodos de diagnóstico.

Método de diagnóstico	Aplicación más relevante	Limitaciones	Referencia relevante
Aislamiento en medio sólido desde enriquecidos	Aislamiento de cepas de <i>Vibrio</i> en agares selectivos	Crecimiento de flora acompañante no patógena.	Hartnell 2018 (28)
Detección de toxinas	Visualización de hemolisina en agar	Limitada aplicabilidad en ensayo de rutina.	Wagatsuma 1968 (29)
Serotipificación	Caracterización fenotípica de cepas asociadas a patogenicidad	Interpretación de la aglutinación subjetiva por lo que requiere experiencia y entrenamiento. Kits con vencimiento limitado y costoso.	Sakazaki et al 1968(30)
Separación inmunomagnética de enriquecidos	Etapa para aumentar el rendimiento para aislar una bacteria desde un enriquecido por el uso de anticuerpos.	Reactividad inespecífica del anticuerpo. Producción de anticuerpos de alto costo.	Tomoyasu et al 1992 (31).
Identificación bioquímica	Chequeo rápido, fácil y económico para identificar cepas bacterianas.	Pueden presentar diferencias en hasta cinco ensayos bioquímicos.	Martinez-Urtaza et al 2006. (32)
Detección por PCR	Ampliamente usado. Adecuadamente estandarizado para <i>V. parahaemolyticus</i> totales y patógenos.	No provee información cuantitativa.	Bej et al 1999 (33).
Detección por PCR en tiempo real	Método rápido, específico y cuantitativo. Uso de partidores y sondas para <i>V. parahaemolyticus</i> bien establecidos.	Costo de termocicladores y sondas. Debido a su extremada sensibilidad existe el riesgo de falsos positivos.	Nordstrom 2007 (34).
Tipificación multilocus de secuencias, MLST (Multi-locus sequence typing).	Subtipificación robusta de loci de genes conservados derivado de producto PCR ó secuenciación masiva (Whole genome sequencing-based methods WSG)	Se requiere actualización y mantenimiento de datos	González-Escalona et al 2008.(35)
Secuenciación de genoma completo, WGS (Whole genome sequencing-based methods).	Determinación de la secuencia de todo el genoma que permite bioinformáticamente realizar relaciones filogenéticas.	Requiere el costos iniciales altos, apoyo computacional y personal especializado	Chen et al 2003 (36), Makino et al 2003 (1) González Escalona et al 2017 (37)
Hibridación de colonias.	Colonias hibridadas permite detectar genes asociados a patogenicidad y/o especie específico.	Método lento y demandante y requiere entrenamiento	Suffredini et al 2014 (38).

Amplificación molecular isotérmica LAMP	Amplificación de ADN con partidores específicos detectable por turbidimetría e incluso observación visual. Método sensible, rápido y económico. Puede usar equipos portables.	Requiere personal especializado e incluye etapa limitante de elección de partidores. Método sensible que produce gran cantidad de ADN susceptible a falsos positivos por contaminación cruzada. Menos sensible a inhibidores que PCR.	Yamazaki et al 2008 (39) Han et al 2011 (40).
Espectrometría de masa MALDI-TOF	Identificación <i>Vibrio</i> spp	Instalación cara y requiere personal especialista y bases de datos.	Dieckmann, Strauch & Alter (2010) (41)

V. parahaemolyticus en Chile.

El primer brote masivo de gastroenteritis causado por *V. parahaemolyticus* fue vivido por la población de la ciudad de Antofagasta el año en su periodo estival 1997-1998 (16). Chile en ese periodo, se había preparado y fortalecido para estudiar la presencia de *V. cholerae* por los brotes sufridos en los países vecinos. Los laboratorios de microbiología clínicos y ambientales, estaban familiarizados en aislar cepas de *V. cholerae* en agar TBCS desde muestras de heces de pacientes, alimentos y aguas (2).

Las cepas ambientales del brote de Antofagasta de 1998 fueron caracterizadas en los laboratorios ambientales y de referencia, junto a científicos de la Universidad de Antofagasta (16). Con este primer brote, los laboratorios clínicos adaptaron la metodología ya instalada en el país utilizada en el aislamiento de *V. cholerae* (42) y dada la importancia de la cuantificación en la evaluación de riesgo microbiológico, los laboratorios ambientales enfocaron sus análisis con un enfoque más cuantitativo utilizando la metodología del Número Más Probable (43); recomendada para matrices alimentarias donde el microorganismo se encuentra en bajas concentraciones si la cadena de frío se mantiene. Los científicos reenfocaron sus investigaciones y para el año 2004 ya existía un proyecto científico de fondos concursables basado en el brote de Antofagasta del año 1998 (44).

La explicación del brote del 2004 está documentada retrospectivamente por Martínez-Urtaza (45): El clon pandémico Vp O3:K6 llegó desde Asia a las costas del Pacífico por la corriente del Niño, corriente levemente más temperada que le facilitó la sobrevivencia. Ese evento incluso llegó a alterar la abundancia de especies como el Pingüino Humboldt (*Spheniscus Humboldti*) por disminuir la disponibilidad de alimentos las cuales se alejan de las

corrientes cálidas (46).

En el verano del año 2004 y los siguientes cinco años, la presencia de *V. parahaemolyticus* en las costas chilenas inundó nuestros estuarios sureños bioacumulándose en los moluscos bivalvos. Los moluscos están distribuidos en unos centenares centros de cultivos en la X Región regulados principalmente con fines de exportación por Sernapesca. Durante los brotes masivos anuales, los laboratorios clínicos aislaban *V. parahaemolyticus* desde el agar TCBS considerado el gold standard para su aislamiento, generando información de clonalidad asociados a localidades y características propias del paciente. Estas cepas de origen clínico se aislaron desde muestras de heces. En paralelo, los laboratorios ambientales aislaban *V. parahaemolyticus* desde muestras de moluscos macerados en suspensiones alcalinas junto con variadas otras especies de *Vibrio* como *algolyticus*, *cholerae* no toxigénico y *fluvialis* muchas veces en mayores proporciones. Estas características de aislamiento en muestras de moluscos, hizo difícil asociar los bajos recuentos por gramo de marisco con el alto número de casos clínicos, complicando el cálculo del riesgo de infección en los diferentes escenarios de consumo analizados (21).

Los innumerables aislados clínicos del país desde el primer brote del periodo estival del 2004, permitieron su caracterización y contrastación con el brote de 1998 en Antofagasta por diferentes metodologías como PCR con partidores arbitrarios, tox RS-PCR, serología y campo pulsado (7, 47,48). Las investigaciones del científico japonés Dr Nichibuchi, co-descubridor de las hemolisinas TDH y TRH (49), fortalecieron un enfoque molecular de las hemolisinas, (50) la cual fue la primera aproximación de la patogenicidad de las cepas de *V. parahaemolyticus*. El profesor Nichibuchi, fue un gran colaborador de la serie de Risk Assessment

desarrollada por FAO/WHO y uno de los científicos a cargo de dos talleres de transferencia tecnológica mundialmente ejecutados por expertos para Asia y América Latina, esté último desarrollado en la ScMALAM apoyados por ILSI Latina (51) y FAO.

Desde un inicio, se evidenció el complejo clonal representado por el serovar O3:K6 en la mayoría de los aislados clínicos y otro variado grupo de serovares en los aislados ambientales. La clonalidad de esos primeros brotes en el país, estuvo enfocada por estudios de vigilancia recomendados por la red de bases de datos PulseNet US-CDC (<https://www.cdc.gov/pulsenet/about/pulsenet-in-action.html>.) Esta red tiene la ventaja de recomendar protocolos estandarizados para realizar la metodología de geles de electroforesis por campo pulsado (PFGE, Pulsed Field Gel Electrophoresis). Mediante esta metodología se visualizó una significativa clonalidad en los aislados clínicos y múltiples perfiles en los aislados ambientales. Paralelamente, los factores de virulencia estaban enfocados principalmente en detectar la presencia de hemolisina TDH o TRH. La detección molecular por PCR y PCR en tiempo real fue rápidamente incorporada en los laboratorios de mayores recursos. Estos PCR fueron útiles especialmente para los aislados clínicos debido a la baja probabilidad de aislar cepas ambientales con los factores de virulencia. Para los moluscos crudos destinados a exportación, el uso de kits validados fueron incorporados en los laboratorios, pero dado el gran número de años que duraron los brotes, intensos desde el 2004 al 2009; rápidamente se perdió la opción de exportar los moluscos crudos.

El año 2005, fue secuenciado el genoma de la cepa aislada en la India, el año 1996, denominada cepa pandémica RIMD 22101633 (1). Esto permitió incorporar al PCR, la búsqueda de nuevos factores de virulencia donde los sistemas de secreción Tipo III adquirieron importancia para explicar traslado de moléculas biológicas a través de las membranas (53).

El *V. parahaemolyticus* con su sensible susceptibilidad frente a temperatura y salinidad, ha sido un gran blanco de investigación para generar modelos predictivos que apoyen el consumo crudo, tan exigido por el consumidor (54). La

información se concentra en presencia, concentración y variables ambientales específicamente enfocado en conocer cuál es la probabilidad de infección si se ingiere un gramaje de alimento contaminado por *V. parahaemolyticus*. Hubo un gran interés mundial por los brotes anuales sufridos por nuestro país relacionado al consumo interno de moluscos bivalvos, debido principalmente a la gran exportación de productos marinos. El año 2004, Chile es exportador de moluscos bivalvos con el 6% de las exportaciones de productos acuícola (94,480 toneladas el año 2020, www.sernapesca.cl, 2020). Para ScMALAM, fue interesante colaborar, intentar resolver y validar la información mundial asociada a los modelos de riesgo obtenidos de brotes previos.

Con este último enfoque, un primer ejercicio fue enmarcado en el proyecto FAO (25). Consistió en la discusión de microbiólogos ambientales de Brasil, Chile, Argentina, Perú, México. Este proyecto fue liderado por científicos de la Universidad de Sao Paulo, Brasil. Participaron microbiólogos de ScMALAM, Epidemiólogos de Departamento Salud Ambiental de Ministerio de Salud, científicos de las Universidad de Chile y Los Lagos junto a expertos de FDA-US y FAO.

En el proyecto se hizo el ejercicio considerando la presencia de *V. parahaemolyticus* serotipo O3:K6 en los estuarios de la X Región donde coexisten centenares de centros de cultivo de moluscos y salmones. Consistió en estimar el riesgo puntual de enfermedad dado la información que el país generó en los primeros años de los brotes masivos. El ejercicio estuvo a cargo de FAO (54); quienes tenían experiencia en brotes por toxina marina ciguatera en Centro América. La simulación se realizó considerando el peor escenario representado por registros del día con el mayor número de casos registrados en ese periodo estival como fue el 2 de Febrero de 2005 donde se notificaron 675 casos clínicos en la Región de Los Lagos. Temperatura máxima atmosférica de 30,2°C y temperatura superficial del mar de 19°C. Tiempo de cosecha de 40 kilos de moluscos de 2 a 3 horas. Momento de la cosecha entre las 12 y 14 horas. El cálculo de la porción fue considerado de 120 gramos. Bajo este criterio se utilizó la información de evaluación de riesgo (20), especialmente la curva Dosis-

Respuesta desarrollada por el FDA en sus áreas geográficas asociadas a los casos clínicos. Los resultados fueron una patogenicidad de un 0,69, es decir, aproximadamente el 70 % de las porciones fueron consideradas patogénicas. Severidad de $0,95 \times 10^{-6}$, la probabilidad de morir por la ingesta de una de estas porciones de ≈ 1 en un millón. Y la estimación del riesgo por porción de moluscos en la región fue 0,2; es decir: con la ingesta de una porción, existe un 20 % de posibilidades de enfermarse si consume una porción en condiciones similares a las condiciones del 2 de febrero de 2005 en la Región de Los Lagos.

Otra actividad de participación para laboratorios ambientales y de referencia fue participar en proyectos nacionales de Fondos Concursables de Bienes Públicos (27) adjudicado por la Universidad de Los Lagos con una importante participación de FAO, US-FDA y la academia. El proyecto, se realizó entre los periodos estivales de 2010 a 2012 evaluando la presencia de *V. parahaemolyticus* totales y patogénicos con la metodología utilizada en los laboratorios del FDA. Los Vibrio fueron cuantificados mediante formato híbrido de enumeración tradicional por enumeración de tubos múltiples (NMP) y PCR en tiempo real en cada tubo presuntivamente positivo sin aislamiento de la colonia (NMP-qPCR). Por periodos estivales consecutivos (2009-2010) se enumeraron cinco muestras de moluscos dos veces al mes en los meses estivales. Las muestras fueron adquiridas en mercados públicos de la Región de Los Lagos y enviadas en cadena de frío entre $7-10^{\circ}\text{C}$ a ScMALAM. Este estudio fue realizado cuando los casos clínicos habían disminuido significativamente a nivel país cambiando en forma crítica el cumplimiento de los objetivos. Si bien mediante la detección molecular de Vibrio patogénicos en las muestras ambientales aumentó significativamente los valores de enumeración desde el aislamiento microbiológico tradicional, no hubo una buena correlación que permitiese validar la única curva dosis respuesta utilizada como referencia mundial en el MRA 16 (21).

En el verano del año 2013, luego de varios años de casos esporádicos y ausencia de brotes masivos. Chile sufrió una ola de calor que afectó la Región de Los Lagos (55), exponiendo

a altas temperaturas los centros de cultivo de moluscos. Correspondió a tres días donde la temperatura atmosférica máxima subió entre 32 hasta $32,7$ bajando recién al cuarto día a solo $28,6^{\circ}\text{C}$. Este evento, produjo que los casos clínicos de menos de 10 casos endicha región, subieran a 160 casos clínicos en dos semanas. Las concentraciones de Vibrio totales y patogénicos subieron también desde no detectable a 10^2 y 10^4 Vp/gramo de molusco expresados en las unidades de NMP/qPCR. Este evento de ola de calor se repitió en años posteriores sin afectar el número de casos clínicos sugiriendo una importante disminución en su presencia ambiental en los estuarios.

PERPECTIVAS Y CONCLUSIONES

A nivel mundial, el consumo de moluscos crudos especialmente ostras crudas sigue siendo la principal causa de vibriosis y su conocimiento enfocado en el manejo del riesgo continua en desarrollo. Este desarrollo es multifacético enfocados en varias áreas como la microbiología, genómica, evaluación de riesgo, epidemiología, ciencias del clima y oceanografía. Los datos y sus GAP, siguen siendo una gran limitación y pareciera que su enfoque de presencia/ausencia debe ser muy regional a cada ecosistema. En forma paralela aparecen nuevas buenas prácticas que pudiesen ayudar a su mitigación como cuarentenas de cosecha y nuevos procedimientos de control de temperatura en poscosecha como es un rápido enfriamiento por inmersión.

Desde la microbiología aparecen nuevas metodologías y nomenclatura de alerta a nuevos clones como el de actual interés ST36, denominado por su perfil tipificado por multilocus y correspondiente a la antigua denominación por serotipo O4:K12, ahora presente en áreas no endémicas del noreste de US, España y Sudamérica. Vigilancia enfocadas desde la imagen satelital a la genómica parecen ser visionarias para construir nuevas evaluaciones de riesgo: La detección remota se presenta como un predictor de brotes en tiempo real y los métodos de secuenciación tienen grandes aplicaciones prácticas en relación al mecanismo de transmisión, evolución de las cepas y manejo de brotes.

La secuenciación del genoma completo (WGS) se presenta como una herramienta para entender la desde nuevos factores de virulencia hasta la evolución.

Las recomendaciones finales siguen enfocadas mundialmente en establecer sistemas de recolección de datos regionales escalables a las naciones en la etapa de pre y post cosecha, detección de hemolisinas como principales factores de patogenicidad, verificación de la eficacia de la detección remota con enfoques satelitales y WGS para predecir periodos de riesgo elevado para su mejor control.

RECONOCIMIENTOS

Alumnos quienes desarrollaron sus prácticas, tesis de pregrado y postgrado: Diego Belmar, Nicolas Ferreira, Johathan Fletcher, Camilo Pinto, Nayra Muñoz, Andrea Salas, Paulina Orellana, Daniel Levet y Sebastian Guerrero. Coordinadores de Proyectos Lourdes Costarica (18), Iddy Karunnasagar (18), Jessica Matamala (27). Viviana Aranda (51). Investidores de centros de referencias: Jessica Jones, Angelo DePaola, John Bowers (44). Mariel Campalans (Proyecto FIP 53:2005). Carlos Aranda (17), Gonzalo Osorio (17). A todas las unidades de apoyo del Instituto de Salud Pública de Chile especialmente la Sección responsable Microbiología de Alimentos ScMALAM. Red de Laboratorios Ambientales de Salud Pública Ambiental y Laboral del Ministerio de Salud de las Regiones de Antofagasta y De Los Lagos, Departamento de Salud Ambiental y Epidemiológica del Ministerio de Salud de Chile.

Finalmente este trabajo se dedica a la memoria póstuma de los virologos Irma Rivera Universidad de Sao Paulo, Brasil. Mitsuaki Nishibuchi, Universidad de Kyoto, Japón y Josefa Astorga de ScMALAM.

Financiamiento

FAO-USP –PR 38361, Corfo 09CN14-5951, Instituto de Salud Pública y Ministerio de Salud del Gobierno de Chile.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Makino K, Oshima K, Kurokawa K, Yokoyama K, Uda T, Tagomori K. et al. 2003. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera*. *Lancet*. 2003 Mar 1;361(9359):743-9. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12659-1.PMID: 12620739.
- 2 Quevedo P, Arámbulo J, Escalante A, Estupiñán J, Almeida C & Cuella J. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 1997,16 (2), 673-683. Riesgos de transmisión del cólera por productos pesqueros: perspectiva regional en Sudamérica.
- 3 Amaro C, SanJuan E, Fouz B, Pajuelo D, Lee C, Hor L et al. 2015. The fish pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 2: epidemiology, phylogeny and virulence factors involved in warm-water vibriosis. *Microbiology Spectrum*, 3:1-23.
- 4 Poblete R, Andresen M, Perez C, Dougnac A, Diaz O, Tomicic V. 2002. *Vibrio vulnificus*: una causa infrecuente de shock séptico. *Rev Med Chil*.2002. Jul. 130 (7): 787-91. doi. 10.4067/S0034-98872002000700011.
- 5 Fujino T, Okuno Y, Nakada D. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Med J Osaka Univ*. 1953; 4: 299- 304.
- 6 Hasan M, Azim KF, Inram MAS, Chowdhur M, Urmy SRA, Parvez MSA et al, 2020. Comprehensive genome bases análisis of *Vibrio parahaemolyticus* for identifying novel drug and vaccine molecules: Subtractive proteomics and vaccinomics approach. Doi./10.1371/journal.pone.02371821.
- 7 Okuda J, Ishibashi M, Hayakawa E, Nishino T, Takeda Y, Mukhopadhyay A K, et al. Emergence of a unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3150-5.
- 8 Lotz, MJ, Tamplin, ML and Rodrick GE, (1983) Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine vibrio organisms. *Annals Clinical Laboratory Science* 13, 45-48.
- 9 Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishina T, Saitoh A, Nakagawa H, Ichihara T et al. Detection of TDH-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 from naturally contaminated shellfish using an immunomagnetic separation method and chromogenic agar medium. *Kansenshogakuzasshi*. Nov;75(11):955-60. doi: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.75.955.
- 10 Suzuki N, Ueda Y, Furukawa T, Takegaki Y, Miyagi K, Noda

- K. et al. Incidence of Kanagawa phenomenon-positive and -negative *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from traveller's diarrhea and their relation to *tdh* and *trh* genes]. *Kansenshogaku Zasshi*. 1997 May;71(5):417-20. Japanese. doi: 10.11150/kansenshogakuzasshi1970.71.417. PMID: 9209122.
- 11 Kobayashi TS, Enomoto R, Sakazaki, Kuwahara S. A new selective isolation medium for the vibrio group. (Modified Nakanishi's medium TCBS agar). 1963. *Jpn. J. Bacteriol* 18:387-392.
- 12 Honda T, Ni Y & Miwatani T, 1988. Purification of a TDH-related hemolysin produced by a Kanagawa phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus* O6:K46. *FEMS Microbiol Lett*. 1989 Jan 15;48(2):241-5. doi: 10.1111/j.1574-6968.1989.tb03307.x.PMID: 2721917.
- 13 Nishibuchi M., Tanguchi T., Misawa T., Khaeomanne-lam V., Honda T. and Miwatani T. Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene (*trh*) Encoding the Hemolysin Related to the Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity*, Sept. 1989, p. 2691-2697 Vol. 57, No. 9 0019-9567/89/092691-07\$02.00/0.
- 14 ISO 21872-1: 2017. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. - Part 1: Detection of potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* (ISO 21872-1:2017).
- 15 Velazquez-Roman J, Leon-Sicairos N, Hernandez-Diaz J, Canizales-Roman A. 2014. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 on the American continent. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Jan 2;3:110. Doi: 10.3389/fcimb.2013.00110.
- 16 Córdova JL, Astorga J, Silva W, Riquelme C. 2002. Characterization by PCR of *Vibrio parahaemolyticus* isolates collected during the 1997-1998 Chilean outbreak. *Biol Res*. 2002;35(3-4):433-40. doi: 10.4067/s0716-97602002000300017. PMID: 12462995.
- 17 Sernapesca. Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. Chile. www.sernapesca.cl/www.sernapesca/controldeexportaciónycertificación
- 18 FAO/WHO.2011. Guide for application of risk analysis principles and procedures during food safety emergencies. [Fao.org/3/ba0092e/ba0092e00](http://fao.org/3/ba0092e/ba0092e00). Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. Rome 2011.
- 19 FAO/WHO. 2005. MRA 8:2005. FAO/WHO. Risk assessment of *Vibrio vulnificus* in raw oysters: interpretative summary and technical report. Published jointly with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).
- 20 FAO/WHO.2005. MRA 9:2005. FAO/WHO. Risk assessment of choleraogenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 in warm water shrimp for international trade: interpretative summary and technical report. Published jointly with the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (Microbiological risk assessment series No. 9)
- 21 FAO/WHO.2011. MRA 16: Guide N° 16/2016. FAO/WHO. 2011. Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative summary and technical report. Microbiological Risk Assessment Series 16. Rome, Italy.
- 22 FAO/WHO. 2020. Risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* associated with seafood. Microbiological Risk Assessment Series No. 20. Rome. () ISBN 978-92-5-132020-4 [FAO] ISBN 978-92-4-000018-6 [WHO]© FAO and WHO, 2020.
- 23 FAO/WHO. 2016. Selection and application of methods for the detection and enumeration of human-pathogenic halophilic *Vibrio* spp. In seafood. Microbiological risk assessment Series. N° 22 . Rome (<http://www.who.int/publication/i/item/9789241565288>).
- 24 MRA 35:2021. Microbiological Risk Assessment Series FAO/WHO N° 35/2021. Advances in science and risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* associated with seafood. Serie No. 35. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb5834/>.
- 25 Sc-MALAM: Sección Microbiología de Alimentos y Ambiente. Sub Departamento de Ambiente y Alimentos. Departamento Nacional y de Referencia en Salud Ambiental. Instituto de Salud Pública de Chile. www.ispch.cl
- 26 FAO-USP –PR 38361 (2008-2009) . Proyecto “Latin American & Caribbean Regional Data Base for *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* y *V. vulnificus* Risk Assessment in Sea Products and their ecosystem “. FAO-Roma-Universidad de Sao Paulo USP con colaboración de US-FDA e ISP-Chile.
- 27 Corfo 09CN14-5951. Proyecto de bienes públicos 2010-2012. Reforzamiento de la red de salud pública para la inocuidad de moluscos bivalvos frescos mediante una vigilancia molecular efectiva y un modelo de gestión de riesgo de *Vibrio parahaemolyticus* y Norovirus.
- 28 Hartnell R, Stockley L, Keasy W, Rosec JP, Hervio-Heath D, Van den Berg H, Leoni F. et al. 2018. A pan-European ring trial to validate an International Standard for detection of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*. *International Journal of Food Microbiology*, 288:58-65.

- 29 Wagatsuma. On the medium for haemolytic reaction. *Media Circle*, 13:159-162. 1956.
- 30 Sakazaki R, Tamura K, Kato T, Obara Y, Yamai S. 1968. Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacterium, *Vibrio parahaemolyticus*. 3. Enteropathogenicity. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*, 21 (5):325-331.
- Tomoyasu et al 1992.
- 31 Tomoyasu et al 1992. Development of the immunomagnetic enrichment method selective for *Vibrio parahaemolyticus* serotype K and its application to food poisoning study. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8): 2679-2682.
- 32 Martínez-Urtaza J, Losano-Leon A, Viña-feas A, de Novoa J, García-Martin O. 2006. Differences in the API 20 E biochemical patterns of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 255(1):75-81.
- 33 Bej, AK, Patterson DP, Brasher, CW, Vickery MC, Jones DD, & Kaysner CA. 1999. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. *Journal of Microbiological Methods*, 36(3): 215-225.
- 34 Nordstrom JL, Vickery MC, Blackstone GM, Murray SL, DePaola A. 2007. Development of the multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacterial in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:5840-5847.
- 35 González-Escalona N, Martínez Urtaza J, Romero J, Espejo RT, Jaykus LA & DePaola A. 2008. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing. *Journal of Bacteriology*, 190:2831-2840.
- 36 Chen CY, Wu KM, Chang YC, Chang CH, Tsai HC, Liao TL et al. 2003. Comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus*, a marine pathogen. *Genome Research*, 13 (12):2577-2587.
- 37 González-Escalona N, Jolley KA, Reed E, & Martínez-Urtaza J. 2017. Defining a core genome multilocus sequence typing scheme for the global epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(6): 1682-1697.
- 38 Suffredini E, Cozzi L, Ciccaglioni G. & Croci L. 2014. Development of a colony hybridization method for the enumeration of total and potentially enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish. *International Journal of Food Microbiology* 186:22-31.
- 39 Yamazaki W, Ishibashi M, Kawahara R & Inoue K. 2008. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC microbiology*, 8:163.
- 40 Han F, Wang F, Ge B. 2011. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (8): 2589-2595.
- 41 Dieckmann R, Strauch E. & Alter T. 2010. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Journal of Applied Microbiology*, 109(1):199-211.
- 42 Heitmann I, Jofre L, Hormazabal JC, Olea A, Vallebuena CL & Valdes Cl. 2005 Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infectología*. 22(2):131-144.
- 43 US-FDA. USA Food and Drug Administration. *Vibrio*. In CFSAN (ed.), *Bacteriological Analytical Manual Online* May 2004. USFDA 2004. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-9.html>
- 44 FONDECYT 1990765/1999 : Importancia de las bacterias viables pero no cultivable en las Vibriosis marinas y en la producción de toxinas asociadas a Marea Roja.
- 45 Ansedo-Bermejo J., Gavilan R., Triñanes J., Espejo t.R., Martínez-Urtaza M. Origins and colonization history of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in South America. *Mol. Ecol.* 2010. Sept ; 19(18) :3924-37. doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04782.
- 46 Vianna, J.A., Cortes, M., Ramos, B., Sallaberry-Pincheira, N., González-Acuña, D., Dantas, G.P.M. et al. 2014. Changes in abundance and distribution of Humboldt Penguin *Spheniscus Humboldt*. *Marine Ornithology* 42: 153–159.
- 47 González-Escalona N, Cachicas V, Acevedo C, Rioseco M, Vergara J, Cabello F. et al. Comparative Study *Vibrio parahaemolyticus* diarrhea, Chile, 1998 and 2004. *Emerg Infect Dis*. 2005 Jan;11(1):129-31. doi: 10.3201/eid1101.040762.
- 48 Balakrish N, Hormazabal J C. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. *Rev Chil Infect* 2005; 22 (2): 125-30.
- 49 Nishibuchi, Tanguchi, Tadashi Misawa, Vanna Khaeomanne-lam, Takeshi Honda, and Toshio Miwatani, 1989. *Infection and Immunity*, Sept. 1989, p. 2691-2697 Vol. 57, No. 9 0019-9567/89/092691-07\$02.00/0 Copyright © 1989. Cloning and Nucleotide Sequence of the Gene (*trh*) Encoding the Hemolysin Related to the Thermostable Direct Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*.
- 50 Wagatsuma. On the medium for haemolytic reaction. *Media Circle*, 13:159-162. 1956

- 51 ILSI, International Life Science Institute. Coordinador taller: ILSI/FAO/FDA /ISP workshop. Selección y aplicación de métodos para la detección y enumeración de *Vibrio parahaemolyticus* desde moluscos bivalvos. Nishibuchi N, Karunasagar , Jones J. 2- 5. Diciembre 2015. ScMALAM, Instituto de Salud Pública de Chile.
- 52 Okada, N., Iida, T., Park, K.S., Goto, N., Yasunaga, T., Hiyoshi, H. et al 2009. Identification and characterization of a novel type III secretion system in trh-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level. *Infection and Immunity*, 77: 904-913.
- 53 Baker-Austin, C., Triñanes, J., Hartnell, R., Taylor, N., Siitonen, A. & Martínez-Urtaza, J. 2012. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature Climate Change*, 3: 73-77.
- 54 Lupin H., Cachicas V., Costarica L., Rivera I., Evaluación de Riesgo Microbiológico (ERM) por presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en bivalvos en la X Región de Chile. 2008. XXX (30 th) Congreso Chileno de Microbiología 2008. N°71: pg 21.
- 55 Pinto C, Aranda N, Aranda C, Alvarez N, Vidal M & V. Cachicas. *Vibrio parahaemolyticus* totales y patogénicos asociados a ola de calor en sur de Chile 2013. P26 .XI Jornadas Científicas 2013. Instituto de Salud Pública de Chile. 22-24 Mayo 2013.