

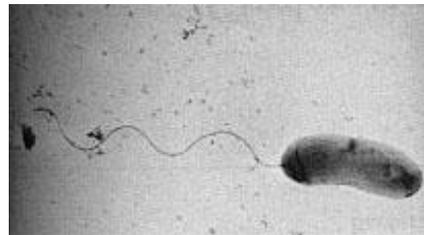
Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIREANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

## MONOGRAFÍA *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae*

### 1-El microorganismo y su interrelación con el ser humano

El género *Vibrio* incluye diversas especies de bacilos Gram negativos, oxidasa positivos, anaerobios facultativos, cuya célula tiene forma de coma y un flagelo polar. La mayoría de especies habita en agua salada y muchos son bioluminiscentes. Incluye varios patógenos, entre los que destacan *V.cholerae*, que es el agente del



cólera, *V.parahaemolyticus*, que provoca toxiinfecciones alimentarias y *V.vulnificus* que provoca toxiinfecciones alimentarias por ingestión de pescado y marisco contaminados y graves infecciones de heridas, es halófilo y lactosa positivo. Hay algunas especies de vibrios que se encuentran en playas, rocas y maderas en contacto con agua salina semi estancada, y que son patógenas al introducirse en una herida, muchos de estos casos terminan con septicemias y muertes, basta una apertura en la piel para que causen cuadros de gravedad en uno de cada cuatro infectados. Otros Vibrio causa de toxiinfecciones son: *V.cholerae* no 01 (no cólera), *V.vulnificus* (mortalidad del 50% por bivalvos crudos ingeridos y del 20% por heridas infectadas con él), *V.fluviatilis* (de ostras), *V.minicus* (de ostras), *V.hollisae* (pescado frito, desecado o salado). Este último no se aísla en Agar TCBS. *V.alginolyticus*, aparte de infectar heridas y provocar otitis e infecciones en los ojos, es el responsable de la potente neurotoxina del pez globo. El aislamiento de *Vibrio spp.* suele ser difícil, por lo que se emplean medios selectivos para su crecimiento utilizando como característica su pH de crecimiento (entre 8-9) y contenido en sales. Son muy abundantes en el ambiente, especialmente en aguas superficiales y marinas. Poseen antígenos flagelares H (serológicamente uniformes en este género) y somáticos O.

*Vibrio parahaemolyticus* son halófilos (incapaces de crecer con menos de 20 g/l de sal, a diferencia de *V.cholerae*), beta hemolíticos. Causa la más frecuente intoxicación alimentaria en Japón, a causa del pescado crudo. También provoca diarreas del viajero en costas cálidas, donde es ubicuo. La enfermedad se resuelve sola en 2-5 días. Afecta al pescado, crustáceos y moluscos, sobre todo en verano. La dosis de infección es de un millón por gramo y puede darse en pescado mal refrigerado. Todo pez, crustáceo o molusco crudo (tellinas, ostras...) en nuestras costas debe considerarse contaminado. La mayoría de capturas de pescado (hasta el 96%) y marisco (100% de cocinas) costeros en verano contienen *V.parahaemolyticus*, lo cual no ocurre el resto del año. La acidificación producida por el vinagre o el zumo de limón acaban con gran parte de sus células. La cepa Kanagawa tiene una hemolisina termoestable, por lo

que los productos del mar cocinados pero previamente mal refrigerados, pueden ocasionar toxiinfección. También puede provocar infecciones (otitis, infecciones en heridas...) por baño en aguas marinas contaminadas por él.

***Vibrio cholerae* O:1 ElTor** y el más reciente ***Vibrio cholerae* O:139 Bengala**, son los agentes del cólera. No es halófilo, es más típicamente continental. Tiene forma de coma, actualmente se le subdivide en base a una tipificación serológica teniendo en cuenta las características del antígeno O. Se divide en 6 serotipos que van del 1 al 6. Las afecciones definidas como cólera son atribuidas al serotipo 1, aunque los otros serotipos también provoquen síndromes coleriformes, frecuentemente con difusión epidémica. El cólera es una acción diarreica aguda acompañada de vómitos y calambres abdominales. Está caracterizada por una pérdida masiva de líquidos y electrolitos: si no se trata puede causar colapso circulatorio y muerte en un solo día. La infección suele ser transmitida por agua y alimentos (ej. verduras bañadas con aguas contaminadas con heces de individuos ya atacados por el cólera, peces que actúan como reservorio...). Parece ser un parásito exclusivamente humano (el virulento biotipo clásico no hemoliza los hematíes de carnero del agar sangre, pero sí provoca hemólisis si se emplea sangre humana; lo cual no ocurre con el pandémico biotipo El Tor), su efecto se explica por una potente enterotoxina que provoca una pérdida catastrófica de agua por ósmosis (hasta 20 L de agua al día). Otras especies producen afecciones similares al cólera como *V. fluvialis*, *V. furnisi*, *V. gollisiae* y *V. mimicus*.

## **2-Los tipos de productos donde la legislación exige su búsqueda o recuento, así como otros tipos de productos donde a nuestro criterio, sería recomendable analizarlos**

-*V.parahaemolyticus* debe buscarse (según legislación española y europea, actualizada en 2021) en los siguientes **alimentos**: agua de mar envasada. El Reglamento CE 2073:2005 de 15 de Noviembre menciona la necesidad de establecer métodos fiables para detección de *V.parahaemolyticus* y *V.vulnificus* en pescados y mariscos, porque no se comercializarán alimentos que no sean seguros. AESAN ofrece varias publicaciones al respecto para el control de especies patógenas de *Vibrio spp.* en productos importados en puestos fronterizos.

-*V.cholerae* en nuestro país se busca en aguas continentales en brotes, zonas geográficas con problemas endémicos a raíz de la epidemia de 1971 (ej: río Ebro, los peces siguen siendo reservorio) y en la llamada “ruta de migración subsahariana” que pasa por España.

## **3-Los métodos oficiales para su detección/recuento**

-Siguiendo la ISO 8914 y la ISO 21872, es común enriquecer en Agua de Peptona Alcalina-Salina (*V.parahaemolyticus*, *V.vulnificus*) o en Agua de Peptona Alkalina (*V.cholerae*) y estriar el Agar TCBS (donde *V.cholerae* crece con colonias amarillas por fermentación de la sacarosa y *V.parahaemolyticus* con colonias azules, sobre el fondo verde-botella del medio) y en TSAT, donde *V.cholerae* y *V. vulnificus* crecen con colonias incoloras mientras *V.parahaemolyticus* crece con colonias rojas. Las colonias deben pasarse a un Nutrient Agar especial e identificarse con TSI.

**TCBS:** *Vibrio cholerae* tipo El Tor forma colonias amarillas por fermentación de la sacarosa (naranjas si se añadió TTC) con viraje del medio a amarillo. Toda prueba posterior debe realizarse desde colonias repicadas en Nutrient Agar-Vibrio DMT126 o de lo contrario se obtendrán falsos negativos. Para evitar falsos positivos, recordar que a diferencia de las Enterobacterias, *Vibrio cholerae* es oxidasa positivo, a diferencia de los Coliformes, es lactosa negativo (aunque indol +) y a diferencia de otros *Vibrio*, no crece con >6% (60 g/l) de ClNa, pudiendo crecer en absoluta ausencia de ClNa. Ciertas cepas de *Vibrio cholerae* se detectan mejor incubando a aproximadamente 28°C, temperatura más acorde con su reservorio natural (peces). *Vibrio parahaemolyticus* no fermenta la sacarosa (excepto cepas especiales, que crecen en TCBS amarillas con centro verde) y crece con colonias verde-azuladas sin virar el medio, incluso añadiendo TTC. Es oxidasa +, Lactosa-, Indol + y crece hasta con 80 g/l de ClNa, no creciendo sin su presencia y teniendo su óptimo crecimiento con 30 g/l. *Vibrio alginolyticus* fermenta la sacarosa y crece en TCBS con grandes colonias amarillas (naranjas con TTC), virando el medio a amarillo. Es oxidasa +, Lactosa- y crece hasta con 100 g/l de ClNa, no creciendo sin su presencia y teniendo su óptimo crecimiento con 40 g/l. Se distingue de *V. parahaemolyticus* porque en TSAT crece con colonias blancas y pequeñas, ocasionalmente con centro rojo, mientras éste crece con grandes colonias totalmente rojas. *Vibrio vulnificus* no fermenta la sacarosa y crece con colonias verde-azuladas en TCBS. Es oxidasa +, Lactosa + y crece hasta con 60 g/l de ClNa, no creciendo sin su presencia. También se distingue de *V. cholerae* por ser a menudo Lactosa +.



*Vibrio cholerae* (colonias amarillas)  
*Vibrio parahaemolyticus* (colonias azul-verdosas)

*Vibrio cholerae* tipo El Tor forma colonias amarillas por fermentación de la sacarosa (naranjas si se añadió TTC) con viraje del medio a amarillo. Toda prueba posterior debe realizarse desde colonias repicadas en Nutrient Agar-Vibrio DMT126 o de lo contrario se obtendrán falsos negativos. Para evitar falsos positivos, recordar que a diferencia de las Enterobacterias, *Vibrio cholerae* es oxidasa positivo, a diferencia de los Coliformes, es lactosa negativo (aunque indol +) y a diferencia de otros *Vibrio*, no crece con >6% (60 g/l) de ClNa, pudiendo crecer en absoluta ausencia de ClNa. Ciertas cepas de *Vibrio cholerae* se detectan mejor incubando a aproximadamente 28°C, temperatura más acorde con su reservorio natural (peces). *Vibrio parahaemolyticus* no fermenta la sacarosa (excepto cepas especiales, que crecen en TCBS amarillas con centro verde) y crece con colonias verde-azuladas sin virar el medio, incluso añadiendo TTC. Es oxidasa +, Lactosa-, Indol + y crece hasta con 80 g/l de ClNa, no creciendo sin su presencia y teniendo su óptimo crecimiento con 30 g/l. *Vibrio alginolyticus* fermenta la sacarosa y crece en TCBS con grandes colonias amarillas (naranjas con TTC), virando el medio a amarillo. Es oxidasa +, Lactosa- y crece hasta con 100 g/l de ClNa, no creciendo sin su presencia y teniendo su óptimo crecimiento con 40 g/l. Se distingue de *V. parahaemolyticus* porque en TSAT crece con colonias blancas y pequeñas, ocasionalmente con centro rojo, mientras éste crece con grandes colonias totalmente rojas. *Vibrio vulnificus* no fermenta la sacarosa y crece con colonias verde-azuladas en TCBS. Es oxidasa +, Lactosa + y crece hasta con 60 g/l de ClNa, no creciendo sin su presencia. También se distingue de *V. cholerae* por ser a menudo Lactosa +.

**TSAT**, medio disponible en pocos proveedores, como MICROKIT. *Vibrio parahaemolyticus* crece con colonias de 2-3 mm y color rojo oscuro, por la reducción del TTC a formazán. Confirmar con TSI Agar: *Vibrio parahaemolyticus* provoca pico rojo, fondo amarillo, sin ennegrecimiento ni gas. En TSAT, *Vibrio alginolyticus* crece con colonias rojas o blancas, pero muy grandes y lobuladas. *Vibrio cholerae* y *V. vulnificus* crecen con colonias incoloras-crema.



*Vibrio parahaemolyticus* (colonias rojas)

**Nutrient Agar-Vibrio** medio ISO 8914 que evita la obtención de falsos negativos, propia de otros medios al identificar las especies de *Vibrio*, disponible en pocos proveedores, como MICROKIT.

#### 4-Los métodos alternativos que mejoran la rapidez de los resultados y la robustez del análisis

MICROKIT ha desarrollado en sus 31 años de investigaciones, diversos medios de cultivo y kits para *Vibrio spp.*:

**Vibrio parahaemolyticus Selective Agar y Broth** (medios con suficiente sal para evitar el crecimiento de *V.cholerae*)



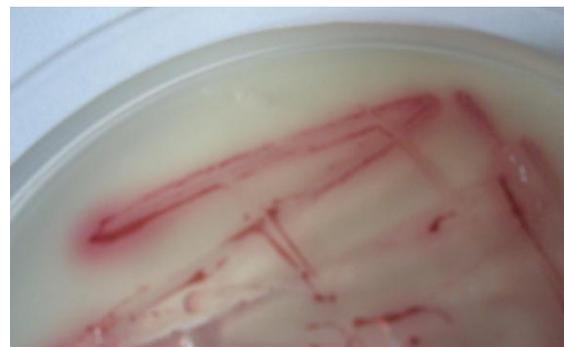
Izquierda: Azul, negativo  
Derecha: Verde, *Vibrio parahaemolyticus*.

*Vibrio parahaemolyticus*, colonias azules con halo incoloro

**MPT Agar y MPT Broth** (medios con factores doping que optimizan el mantenimiento de *V.cholerae* en ceparios durante años)

**Crioteca-MAR** con caldo criogénico marino para el mejor mantenimiento congelado de los *Vibrio spp.* marinos

**Cromokit-Vibrio Agar**, el medio cromogénico para *Vibrio spp.*. Los requerimientos de sales de los *Vibrios* marinos (35-37 g/L) son muy diferentes a las de *V.cholerae* (10 g/L), pero hay una zona común en la que ambos pueden crecer bien: 25 g/L. Añadiendo además a este medio dos cromógenos, podemos conseguir un solo medio para ambos tipos de *Vibrio* y además distinguirlos: *V.cholerae* crece con colonias rojas y *V.parahaemolyticus* con colonias verde-azuladas. Este es el medio empleado también en las **DryPlates-Vibrio**.



Cromokit Vibrio Agar. Arriba: *V.cholerae*, púrpura  
Abajo: *V.parahaemolyticus*, azul-verdoso



**Vibrio cholerae P/A Kit** para 100 mL de muestra de agua, vira de verde a amarillo en caso positivo; o su versión cromogénica, que vira de paja a rojizo en caso positivo con menor proporción de falsos positivos.



**Vibrio parahaemolyticus P/A Kit** para 100 mL de muestra de agua, vira de azul a verde en caso positivo

Se ha demostrado que un pre-enriquecimiento en **TSB** seguido del enriquecimiento en Alkaline Saline Peptone Water obtiene un 50% menos de falsos negativos de *V.parahaemolyticus* que la falta de ese pre-enriquecimiento.

Para la **confirmación**, para evitar falsos positivos, basta recordar que a diferencia de las Enterobacterias, *Vibrio cholerae* es oxidasa positivo, a diferencia de los Coliformes, es lactosa negativo (aunque indol +) y a diferencia de otros Vibrio, no crece con >6% (60 g/l) de ClNa, pudiendo crecer en absoluta ausencia de ClNa. Ciertas cepas de *Vibrio cholerae* se detectan mejor incubando a aproximadamente 28°C, temperatura más acorde con su reservorio natural (peces continentales).

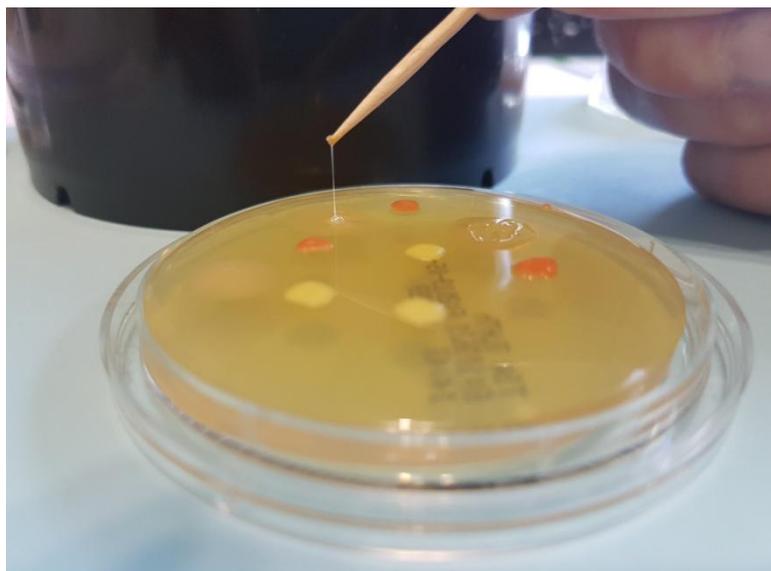
La prueba de la **oxidasa** es muy sencilla: basta con raspar las colonias con la punta de la tira, que virará a azul si es positiva, ya que son aerobios estrictos. Las tiras de MICROKIT están estabilizadas y no se ponen azules con el oxígeno del aire.



La colonias oxidasa positivas provocan viraje de la tira a azul oscuro

A veces pueden crecer algunos Gram positivos, generando confusión; el primer paso para descartar falsos positivos debe ser la inmediata prueba del **Neogram** directa en las colonias, descartando las que no filantan, ya que *Vibrio spp.* es Gram negativo y por tanto filanta.

Para confirmar *Vibrio cholerae* existen **antisueros** polivalentes y el monovalente Bengala O139



Neogram: colonia de Gram -: filanta.en unos segundos Si fuese Gram +, la colonia no filamentaría

### **5-Cómo vemos el futuro en la detección de este grupo**

La búsqueda de Vibrios patógenos en alimentos del mar (y quizás incluso en playas), debería ser obligada por Ley.