

## Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR

### Evaluation of the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) estuarine-wild from southern Sinaloa and northern Nayarit by microbiological analysis and PCR

Rodríguez-Camacho, J.C., Méndez-Gómez, E.\*; Rivas-Montaño, A.M., Cortés-Ruiz, J.A.

Instituto Tecnológico de Mazatlán, Calle Cosario 1 No. 203, Col. Urias, C.P. 82070, Mazatlán, Sinaloa, México.

#### RESUMEN

Debido a la continua incidencia de intoxicaciones humanas ocurridas en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, las cuales son atribuidas al consumo de camarón crudo, de mayo a diciembre de 2012, se evaluó la posible presencia de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico en muestras de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*; Boone, 1931), muestreando mensualmente en 3 esteros y un centro de venta, analizándolas mediante pruebas bioquímicas y moleculares, utilizando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de especie y de toxicidad, empleando los oligos nucleótidos genéticos; *tlh*, *tdh*, y *trh*. Los casos positivos se contabilizaron mediante la técnica del Número Más Probable (NMP). Siete de las 32 muestras, resultaron positivas a *Vibrio parahaemolyticus*, pero negativas a los trazadores de toxigenia. El NMP se encontró debajo del límite establecido en la NOM-242-SSA1-2009, concluyendo que el camarón en el período y sitios muestreados, no representaron un riesgo para contraer enfermedades gastrointestinales relacionadas con *Vibrio parahaemolyticus*.

#### PALABRAS CLAVE

Camarón, *V. parahaemolyticus*, pruebas bioquímicas, PCR, riesgo gastrointestinal.

#### ABSTRACT

Given the incidence of human poisonings attributed to raw shrimp consumption in southern of Sinaloa and northern of Nayarit in recent years, white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was sampled from three wild-estuaries where it's been captured and one sample was taken from a sale center in order to determine the possible presence of toxigenic *Vibrio parahaemolyticus*, from May to December of 2012. Samples were analyzed by Biochemical test and Polymerase Chain Reaction (PCR), they were also tested for the specific an toxicological identification, using molecular oligo nucleotides markers *tlh*, *tdh* and *trh*. The number of positives results were recorded to a table of most probable number (MPN). The number of samples positive for *V. parahaemolyticus*, weren't toxigenic and it was demonstrated that they were below the limit established in the Mexican Official Standard NOM-242-SSA1-2009. In conclusion, the present study revealed that consumption of raw shrimp from the dates and sites sampled did not show to be a risk for human gastrointestinal diseases.

#### KEY WORDS

Shrimp, *V. parahaemolyticus*, biochemical tests, PCR, gastrointestinal health risk.

#### Información del artículo

Recibido: 4 de Septiembre de 2013

Aceptado: 11 de Noviembre de 2013

#### \*Autor corresponsal:

Méndez-Gómez, E. Instituto Tecnológico de Mazatlán, Calle Cosario 1 No. 203 Col. Urias C.P. 82070. Mazatlán, Sinaloa, México. Correo electrónico: evaristo3@hotmail.com

## Introducción

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria entérica, cuyo hábitat natural son las aguas marinas, ya que requiere sal para su desarrollo. En época de calor se encuentra en las aguas litorales y coloniza a animales del plancton (Lizárraga et al., 2009), filtradores como ostras y mejillones (da Silva, 2005), peces (Aliaga et al., 2010) y camarón (Dulanto, 2013), mientras que durante las épocas frías se encuentra en los sedimentos marinos (Heitmann et al., 2005). Esta bacteria es afectada por los cambios en la temperatura, salinidad y disponibilidad de nutrientes, estando el rango de temperatura para su desarrollo entre los 21-37°C (Da Silva, 2005 y Blackmore, 1999) y la salinidad entre los 5-30 g L<sup>-1</sup> (Matherne, 2009).

Esta bacteria es causante de gastroenteritis asociada al consumo de productos marinos contaminados, crudos o mal cocinados o con una manipulación y almacenamiento inadecuado (Balakrish y Hormazabal, 2005, Díaz y Valerio, 2002, Daniels et al., 2000). Se manifiesta por la presencia de diarrea acuosa, en ocasiones con sangre, dolor abdominal, náusea, vómito, y en algunos casos fiebre, dolor de cabeza y escalofríos. Según la Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). El periodo de incubación es de 5 a 96 h, y la duración de los síntomas de 1 a 7 días (COFEPRIS, 2010). No se tiene certeza alguna sobre la dosis infectante requerida para provocar un cuadro gastroentérico y en consecuencia, los brotes epidémicos tienen frecuencias y características que varían ampliamente según la región (Amárale, 2006).

En el año 1953, en Japón, se identificó al *V. parahaemolyticus* como el causante de un brote de intoxicación alimentaria ocurrida en Isaka, que afectó a 272 personas, de las cuales, 20 fallecieron por el consumo de sardina cruda contaminada con esta bacteria (Paris, 2005).

Un clon pandémico de *V. parahaemolyticus* serotipo O3:K6, emergió en todo el mundo en 1996. Las cepas de ese serotipo causaron brotes en Taiwán desde 1996 hasta 1999; este mismo clon pandémico se expandió de Asia a Rusia, Mozambique, Estados Unidos de Norte América, Canadá y Chile (Silva et al., 2008), llegando a México en el año de 2004, cuando se presentaron en la región sur del estado de Sinaloa más de 1,250 casos de gastroenteritis que fueron atribuidos al consumo de camarones crudos, provenientes del sistema lagunar Huizache-Caimanero, reportado por Cabanillas et al., (2006), quienes verifica-

ron su presencia en muestras de heces humanas, camarones, agua y sedimentos.

El Camarón por su volumen se encuentra en el 2º lugar de la producción pesquera en México; sin embargo, por su valor, lo encontramos en el primer lugar. La tasa media de crecimiento anual de la producción en los últimos 10 años es de 6.24 %, lo cual se debe al crecimiento de la actividad acuícola con este crustáceo, por lo que desde el punto de vista de las exportaciones de las especies pesqueras, se encuentra en el lugar número uno, siendo sus principales destinos los Estados Unidos de Norte América, Japón y Francia (CONAPESCA, 2011).

La pesquería de camarón en la zona del Golfo de California, es una de las más importantes a nivel nacional. Dentro de las diferentes especies de camarón que se capturan en esta zona, destaca la producción de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*), representando el 6.19 % (2,500 t anuales) de la producción anual total en México; destacando a nivel nacional como zonas de importante actividad en la extracción y cultivo de este camarón, los estados de Sinaloa y Nayarit asociado a esteros, lagunas, y alta mar, formando parte de la pesquería mono-específica más importante, cuya producción es ampliamente comercializada en el mercado nacional e internacional (Ortiz, 2011).

El consumo de camarón crudo puede constituirse en un riesgo potencial para la salud del consumidor, debido a que las características del marisco y las zonas de ubicación litoral, favorecen la incorporación e incluso el crecimiento de microorganismos además de la adquisición de toxinas (Secretaría de Salud, 2009).

A nivel mundial, las infecciones gastrointestinales siguen siendo una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad. El consumo de mariscos crudos, es uno de los vectores principales de las llamadas Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) (Chávez e Higuera, 2003).

Debido al incremento en la producción y comercialización de camarón silvestre y de cultivo, ha aumentado el interés por prevenir la propagación de enfermedades, situación que solamente se puede lograr mediante el establecimiento de una vigilancia frecuente y permanente que permitan la detección oportuna de patógenos, prevenir daños a la salud del consumidor y reducir pérdidas económicas por el deterioro del camarón. La

aplicación de programas de vigilancia permanente, permiten además de establecer medidas preventivas para proteger los sistemas productivos, el asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos (CONAPESCA, 2010).

A través de la COFEPRIS, se ha promovido la implementación de nuevas estrategias como la aplicación de buenas prácticas sanitarias, orientadas a minimizar el impacto de los agentes infecciosos, estrategias que plantean entre otras cosas, la vigilancia y detección preventiva, con fines de prevención y/o reducción de riesgos sanitarios.

Desde 1988, en México se han empleado técnicas de vigilancia, que aunque efectivas, hoy en día se consideran no prácticas, por la cantidad de tiempo que estas demandan para obtener un resultado oportuno; dichas técnicas son los análisis microbiológicos (pruebas bioquímicas) y serológicos, y se encuentran establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, sin embargo, con la aparición de técnicas moleculares, basadas en la identificación de genes o segmentos específicos, mediante el empleo de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), es posible la identificación de microorganismos de una manera eficiente, rápida y económica (Aguirre y Lara, 2011; Castro, 2009).

La técnica de PCR para la especie de *V. parahaemolyticus* se basa en el uso de oligonucleótidos que se identifican como *tlh*, *tdh* y *trh* (genes indicativos de la especie y toxicidad) los cuales están relacionados con la proteína con actividad hemolítica (*tdh*) o la hemolisina termoestable directa relacionada (*trh*) (Ortega, 2011, Alam *et al.*, 2009 y Cárdenas, 2009).

El objetivo de esta investigación fue el evaluar la presencia o ausencia *V. parahaemolyticus* en camarón blanco (*L. vannamei*) silvestre y estuarino, capturado en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, y en muestras obtenidas en un expendio de venta al menudeo y mayoreo; empleando pruebas bioquímicas, la técnica de PCR con los oligos trazadores: *tlh*, *tdh* y *trh* con el fin de comparar la precisión entre ambas técnicas, y simultáneamente se cuantificó al *V. parahaemolyticus* con la técnica del número más probable.

## Materiales y Métodos

La presente investigación se realizó en cuatro puntos de muestreo, tres de los cuales fueron los

cuerpos de agua denominados; Sistema Lagunar Hui-zache-Caimanero (Sur del estado de Sinaloa); Laguna Pescadero y Laguna San Pedro (Norte del estado de Nayarit) efectuando muestreos mensuales de mayo a diciembre del 2012, obteniendo un total de 32 muestras de camarón blanco (*L. vannamei*) silvestre estuarino y el cuarto se estableció en un centro de venta al menudeo y medio mayoreo de camarón, ubicado en el centro de la ciudad de Mazatlán, Sinaloa. Este último punto de muestreo se definió con el propósito de establecer la posible contaminación microbiológica post-captura debido al manejo del camarón.

Las muestras de camarón fueron colectadas directamente en las lagunas de los esteros mediante atarraye (arte de pesca) con la ayuda de los pescadores de zona, aplicando rigurosamente el criterio de protección de la muestra contra contaminación secundaria desde el momento de la captura, transporte y almacenaje, señaladas en la norma mexicana NOM-242-SSA1-2009.

Se recolectaron 200 g de camarón y se midieron los parámetros de salinidad y temperatura del agua en cada punto de muestreo. Las muestras de camarón fueron preservadas para su traslado y siembra microbiológica en hielo, por un tiempo no mayor de 6 horas.

### a) Preparación de la muestra

Se desarrolló la metodología establecida en la NOM-242-SSA1-2009-México, que consiste en colocar 200 g de la muestra de camarón en un vaso de licuadora con 200 g de solución buffer de fosfatos (PBS) estéril y con pH ajustado a 7.2, en una proporción 1:1, procediendo a homogenizar la muestra durante 2 minutos a alta velocidad. A partir de este homogenizado se prepararon diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ .

Las diluciones se sembraron por triplicado en tubos de ensayo estériles con 10 mL de Agua Peptonada Alcalina (APA), ajustado a un pH de 7, se incubaron a 35°C entre 18 a 24 h. Al término de la incubación, los tubos que desarrollaron turbidez, fueron considerados presuntamente positivos a *V. parahaemolyticus*, realizándose una resiembra en placas con Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), tomando 1 µL de cada dilución que se extendió mediante la técnica de rastrillo. Las placas fueron incubadas a 35°C entre 18 a 24 h y se procedió a contabilizar las colonias sospechosas a *V. parahaemolyticus*.

b) Procesamiento de la muestra para la Identificación de *Vibrio parahaemolyticus*

Análisis microbiológico: De las placas con medio de cultivo TCBS, fueron seleccionadas 3 colonias sospechosas a *V. parahaemolyticus* para su aislamiento en medio Triptona con 3 % de NaCl, incubándolas a 35°C entre 18 a 24 h. Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para la identificación de *V. parahaemolyticus*: Oxidasa, Agar Hierro Triple Azúcar, Agar Kligler, Agar Triptona, Agar para evaluar la capacidad de Oxidación-Fermentación, Agar Gelatina, Agar Gelatina con 3 % de NaCl, y pruebas con los aminoácidos Ornitina, Lisina y Arginina (MacFaddin, 2003).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

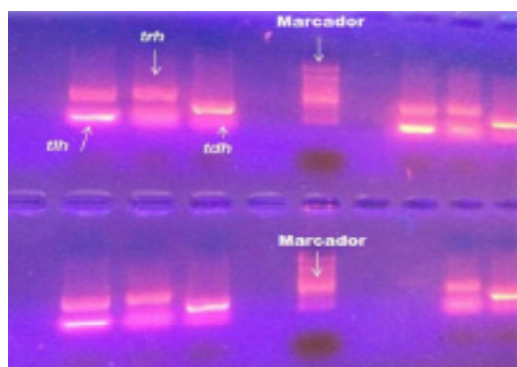
• Aislamiento de ADN

La técnica empleada se basa en el procedimiento descrito por Gómez-Gil y Lizárraga-Partida (2011), que consiste en tomar 1 mL de todas las diluciones y réplicas de los tubos con muestra de camarón sembrados en APA que desarrollaron turbidez y fueron agitados en un vortex a 6,000 rpm durante 1 min. Enseguida los tubos con las muestras se sometieron a calentamiento en un ThermoBlock por 5 min a 95-100°C, y después se colocaron en hielo durante 5 min, con el objetivo de separar los ácidos nucleicos de los restos celulares, la muestra se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min., simultáneamente se preparó una mezcla maestra conteniendo los oligonucleótidos específicos encargados de llevar a cabo la hibridación con los segmentos de los genes que se buscan, y que se agrega a todos y cada uno de los tubos a examinar.

Para el análisis de PCR se usaron: 6.19 µL de agua para PCR con conductividad máxima de 18µΩcm<sup>-1</sup>, 2.5 µL de solución buffer, 0.25 µL de desoxinucleótido trifosfato (DNTP's), los cuales son los reactivos que requiere la enzima Taq polimerasa para polimerizar los fragmentos específicos de cada segmento de gen, 1.25 µL de *Primer F* y 1.25 µL de *Primer R*, que son los encargados de que la enzima polimerasa comience la reacción, 0.06 µL de la solución de la enzima denominada Taq polimerasa termoestable para amplificar secuencias cortas de ADN y por último 1 µL del ADN de la muestra.

Para realizar la identificación de los fragmentos de los genes trazadores de especie y toxicidad se incluyeron dos

controles; un control positivo con ADN de las cepas control de referencia *V. parahaemolyticus* CAIM 1772 proporcionada por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) unidad Mazatlán y un control negativo, sin los segmentos del ADN específico. En la (Figura 1) se muestra la respuesta positiva al gel con los oligonucleótidos *tlh*, *tdh* y *trh*. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador Marca Bio Products, modelo Select Cycler. Los ciclos y temperaturas empleadas en estas pruebas fueron los siguientes: Primero la muestra fue desnaturalizada a 94 °C por 10 min, enseguida se realizaron 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 min, seguida de un alineamiento a 72 °C por 2 min y por último se efectuó una extensión final a 72 °C por 10 min.



**Figura 1. Luminiscencia positiva a la luz ultravioleta de los Marcadores, *tlh*, *trh* y *tdh* mediante electroforesis en gel de agarosa, empleando la cepa CAIM 1772. Protocolo de PCR: 94°C/10'→35(94°C /1')→Tm/1'→72°C/2' 72°C/10'.**

Al terminar la replicación del ADN, la muestra fue sometida a electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con solución buffer TAE 1X que contiene: TRIS base (2-amino-2(hydroxymethyl)-1,3 propanodiol), ácido acético glacial y reactivo EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético). Se colocaron en las unidades del gel de agarosa, las muestras a las que se les incluyó un marcador de peso molecular de 100 a 3,000 pares de bases. Las muestras positivas al oligonucleótido *tlh*, específico para *V. parahaemolyticus* fueron analizadas para la búsqueda de los oligonucleótidos determinantes de las toxinas *tdh* y *trh*.

C) Cuantificación de *V. parahaemolyticus* por NMP

Se cuantificó la presencia de la bacteria *V. Parahaemolyticus* de acuerdo al procedimiento estable-

**Tabla 1.**  
**Primers utilizados para *V. parahaemolyticus*, propuestos por**  
**Gómez-Gil y Lizárraga-Partida (2011).**

| Gen        | Primer       | Secuencia (5'-3')                 | Tm | Tamaño (bp)* | Cita  |
|------------|--------------|-----------------------------------|----|--------------|---|
| <i>tlh</i> | <i>tl-f</i>  | AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG   | 58 | 450          | Bej <i>et al.</i> , 1999                      |
|            | <i>tl-r</i>  | GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC   |    |              |   |
| <i>tdh</i> | <i>L-tdh</i> | GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC    | 58 | 269          | Bej <i>et al.</i> , 1999,<br>Nishibuchi, 1995 |
|            | <i>R-tdh</i> | TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC   |    |              |   |
| <i>trh</i> | <i>trh-f</i> | TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT   | 58 | 500          | Bej <i>et al.</i> , 1999                      |
|            | <i>trh-r</i> | CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G |    |              |   |

\*Pares de bases de nucleótidos.

cido para la técnica del NMP descrita en la NOM-224-SSA1-2009 con modificaciones propuestas por Gómez-Gil y Lizárraga-Partida, (2011), la cual consiste en contabilizar los resultados positivos a la PCR en los 12 tubos de las cuatro diluciones y tres repeticiones y confrontarlos en la tabla estadística de probabilidad correspondiente a las diluciones utilizadas.

#### D) Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados empleando la herramienta estadística denominada Prueba de bondad de ajuste (Tabla de Contingencia), ya que los datos a analizar corresponden a datos no paramétricos. Para ello se empleó una matriz de 2x4; donde el 2 corresponde a las dos metodologías empleadas y el 4 a las cuatro estaciones de muestreo. La fórmula empleada para este análisis fue la siguiente:

$$\chi^2 = \sum \sum \frac{(f_{ij} - f_{ij}^A)^2}{f_{ij}}$$

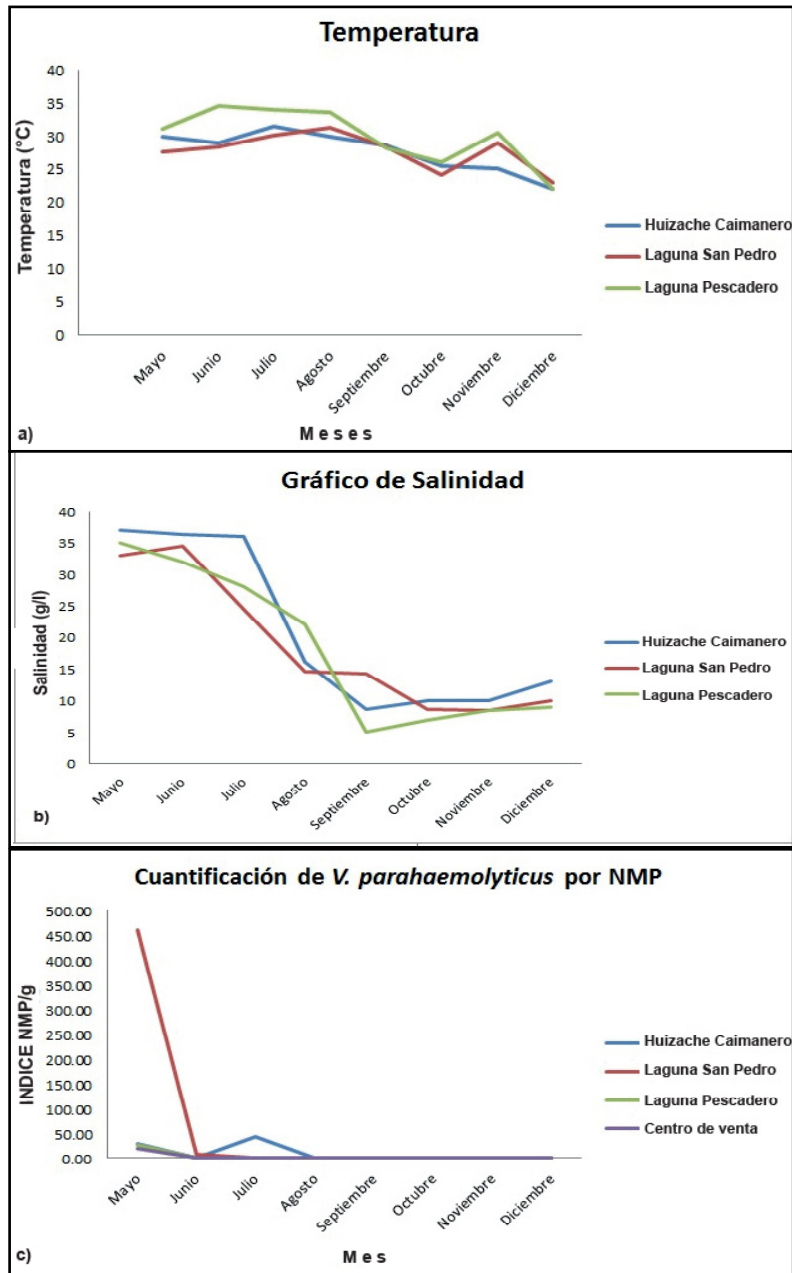
El valor resultante  $\chi^2$  se llevó a la tabla de distribución de Chi cuadrada empleando un  $\alpha = 0.05$ .

## Resultados y Discusión

### a) Temperatura y Salinidad

En esta investigación se registraron los parámetros de salinidad y temperatura en cada una de las zonas muestreadas, observándose que las temperaturas más altas se registraron durante los meses de mayo, junio, julio y agosto de 29.9 a 34.5 °C. En lo que se refiere a la salinidad, las más altas se presentaron durante los meses de mayo y junio variando desde los 34.5 a los 84 g L<sup>-1</sup>, con lo cual se observa que estos parámetros (temperatura y salinidad) pueden estar involucrados en el desarrollo de esta bacteria, ya que durante estos meses se presentó la bacteria de *V. parahaemolyticus* en las muestras analizadas de camarón blanco (*L. vannamei*).

Nuestros resultados coinciden con lo reportado por la FAO (2003), Dabanach (2009); Rodríguez *et al.*, (2010) y Gavilán y Martínez (2011) quienes mencionan que las infecciones por *V. parahaemolyticus* se relacionan con los cambios físicos, químicos y biológicos del ambiente, que van a modular su presencia y abundancia mediante un equilibrio entre crecimiento y depredación, ya que las variaciones en las condiciones ambientales y ecológicas del medio, repercuten sobre la dinámica biológica de estos microorganismos, favoreciendo o limitando su abundancia y promoviendo la aparición de infecciones, cuando las condiciones ambientales permiten el desarrollo de estos organismos en altas cantidades en alimentos marinos de consumo. El número de *V. parahaemolyticus* aumenta a medida que la temperatura del agua se eleva, lo cual explica, en parte, el aumento de casos de intoxicación en los meses de verano (Figura 2).



**Figura 2.** a) Gráfica de Temperatura; b) Salinidad y; c) NMP en muestras de camarón blanco (*L. vannamei*) recolectadas en cuatro estaciones de muestreo ubicadas en sistema lagunar Huizache-Caimanero, Laguna San Pedro, Laguna Pescadero y Centro de venta, de mayo a diciembre 2012.

b) Presencia o ausencia de *V. parahaemolyticus* (Método microbiológico).

Se aislaron un total de 384 colonias sospechosas a *V. parahaemolyticus* de las muestras analizadas, de las cuales 43 resultaron positivas para *V. parahaemolyticus*; registrándose durante el mes de mayo en las cuatro estaciones muestreadas, mientras que en el mes de junio, se detectó solamente en la Laguna de Pescadero y Laguna de San Pedro; en el Sistema Lagunar Huizache-Caimanero, solamente la muestra del mes de julio resultó positiva (Tabla 2). Los resultados de esta investigación difieren con los obtenidos por Aguilar (2007), quien realizó estudios en el sistema lagunar Huizache-Caimanero y no detectó la presencia de *V. parahaemolyticus*.

c) Evaluación de la Presencia o ausencia de *V. parahaemolyticus* mediante PCR.

Los resultados señalaron la presencia de *V. parahaemolyticus* en las muestras correspondientes a los meses de mayo, junio y julio del 2012, identificada con el marcador *t1h* (Tabla 3). Por otra parte, los oligonucleótidos específicos *tdh* y *trh*, empleados para determinar la toxicidad de la bacteria, fueron negativos para todas las muestras (Figura 3), coincidiendo con los resultados reportados por Cabanillas *et al.*, (2006), pero contrario a lo que reportaron Gómez *et al.*, (2006) en muestras obtenidas en la misma zona que este trabajo, quienes detectaron la bacteria durante el mes de Mayo del 2006 y positiva al gen *tdh* (implicado en la toxigenia), y le atribuyeron el primer brote de gastroenteritis por *V. parahaemolyticus* en el sur de Sinaloa y Norte de Nayarit.

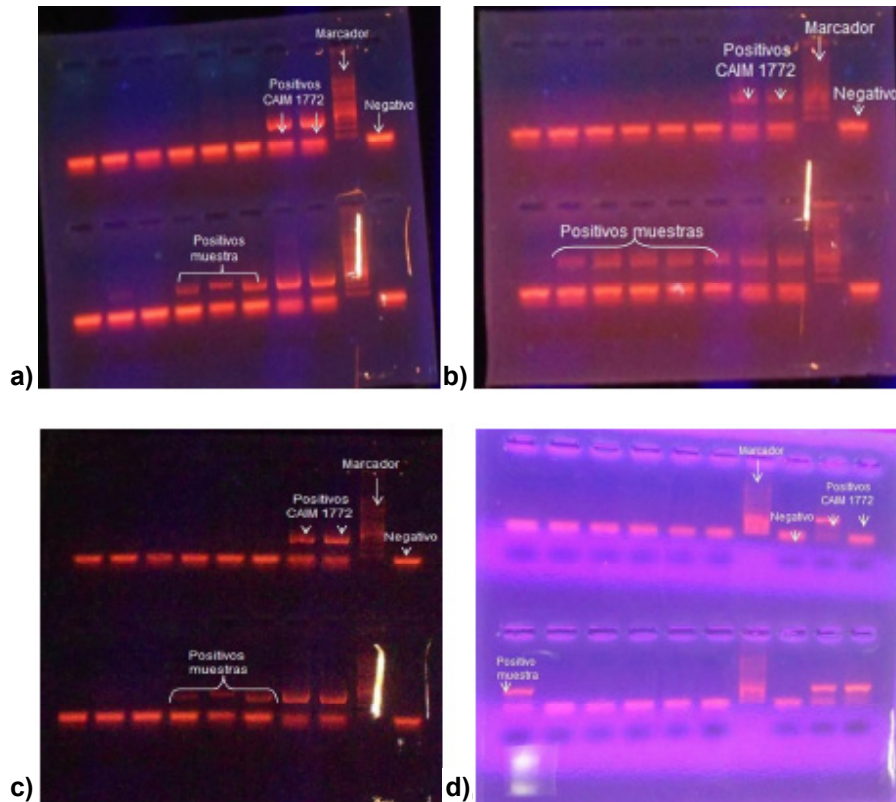
**Tabla 2.**  
Respuesta a la evaluación de la presencia de *V. parahaemolyticus* en las muestras de camarón blanco *L. vannamei* empleando el método microbiológico (Pruebas bioquímicas).

| Mes        | Colonias aisladas | Positivos a <i>V. parahaemolyticus</i> por estación de muestreo |                     |                 |                 |
|------------|-------------------|---|---------------------|-----------------|-----------------|
|            |                   | Huizache-Caimanero  | Laguna de San Pedro | Laguna Pescador | Centro de Venta |
| Mayo       | 12                | 7/12  | 6/12                | 7/12            | 5/12            |
| Junio      | 12                | 0/12  | 6/12                | 5/12            | 0/12            |
| Julio      | 12                | 7/12  | 0/12                | 0/12            | 0/12            |
| Agosto     | 12                | 0/12  | 0/12                | 0/12            | 0/12            |
| Septiembre | 12                | 0/12  | 0/12                | 0/12            | 0/12            |
| Octubre    | 12                | 0/12  | 0/12                | 0/12            | 0/12            |
| Noviembre  | 12                | 0/12  | 0/12                | 0/12            | 0/12            |
| Diciembre  | 12                | 0/12  | 0/12                | 0/12            | 0/12            |

**Tabla 3.**  
Resultados de los marcadores utilizados en la detección de *V. parahaemolyticus* por la técnica de PCR.

| Mes        | Estación de muestreo/ presencia o ausencia de <i>V. parahaemolyticus</i> |            |            |                     |            |            |                 |            |            |                 |            |            |
|------------|--|------------|------------|---------------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|-----------------|------------|------------|
|            | Huizache-Caimanero   |            |            | Laguna de San Pedro |            |            | Laguna Pescador |            |            | Centro de Venta |            |            |
|            | <i>t1h</i>   | <i>trh</i> | <i>tdh</i> | <i>t1h</i>          | <i>trh</i> | <i>tdh</i> | <i>t1h</i>      | <i>trh</i> | <i>tdh</i> | <i>t1h</i>      | <i>trh</i> | <i>tdh</i> |
| Mayo       | +  | -          | -          | +                   | -          | -          | +               | -          | -          | +               | -          | -          |
| Junio      | -  | -          | -          | +                   | -          | -          | +               | -          | -          | -               | -          | -          |
| Julio      | +  | -          | -          | -                   | -          | -          | -               | -          | -          | -               | -          | -          |
| Agosto     | -  | -          | -          | -                   | -          | -          | -               | -          | -          | -               | -          | -          |
| Septiembre | -  | -          | -          | -                   | -          | -          | -               | -          | -          | -               | -          | -          |
| Octubre    | -  | -          | -          | -                   | -          | -          | -               | -          | -          | -               | -          | -          |
| Noviembre  | -  | -          | -          | -                   | -          | -          | -               | -          | -          | -               | -          | -          |
| Diciembre  | -  | -          | -          | -                   | -          | -          | -               | -          | -          | -               | -          | -          |

(+) Presencia de *V. parahaemolyticus* (-) ausencia de *V. parahaemolyticus*



**Figura 3.** Respuesta Luminiscente a la luz ultravioleta de geles de agarosa positivos a *t1h* (indicador de especie) en las muestras colectadas el mes de mayo: a) Huizache-Caimanero, b) Laguna de San Pedro, c) Laguna Pescador y d) Centro de venta, empleando la cepa CAIM 1772 como control positivo.

#### d) Análisis estadístico

Con los resultados obtenidos, se elaboró una tabla de contingencia de 2x4 empleando únicamente los resultados que dieron positivo a cada una de las metodologías, sumándose todos los resultados positivos de cada estación de muestreo en el periodo de mayo a diciembre, esto con la finalidad de comparar las metodologías de PCR y análisis microbiológico (pruebas bioquímicas). Los resultados indican que no existe diferencias significativas entre los resultados obtenidos con las dos metodologías empleadas para determinar la ausencia o presencia de *V. parahaemolyticus*. Por lo que es factible emplear cualquiera de las dos, pero es necesario recordar que la utilización de las técnicas moleculares como las pruebas de PCR empleadas en este trabajo proporciona resultados de una manera más rápida y precisa, con el mismo nivel de confiabilidad.

#### e) Cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* por la técnica del NMP

El mayor NMP/g de *V. parahaemolyticus* se registró en la muestra del mes de mayo en la Laguna de San Pedro, con un índice de 460 NMP/g., en el mes de junio se presentó en la Laguna de Pescadero con un NMP/g de 28, mientras que en julio, solamente se presentó la bacteria en el Sistema Lagunar Huizache-Caimanero con un valor de 43 NMP/g (Tabla 4).

La Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, establece para crustáceos frescos, un límite máximo de  $10^4$  NMP/g de *V. parahaemolyticus*, por lo que todos los valores obtenidos en este estudio, se encontraron dentro del límite especificado.



**Tabla 4.**  
Resultados de la cuantificación de *V. parahaemolyticus* por la técnica del NMP descrita en la NOM-224-SSA1-2009.

| Mes/Estación | Huizache-Caimanero | Laguna San Pedro | Laguna Pescadero | Centro de Venta |
|--------------|--------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Índice NMP/g |                    |                  |                  |                 |
| Mayo         | 29                 | 460              | 2.3              | 21              |
| Junio        | <0.3               | 9.3              | 28               | <0.3            |
| Julio        | 43                 | <0.3             | <0.3             | <0.3            |
| Agosto       | <0.3               | <0.3             | <0.3             | <0.3            |
| Septiembre   | <0.3               | <0.3             | <0.3             | <0.3            |
| Octubre      | <0.3               | <0.3             | <0.3             | <0.3            |
| Noviembre    | <0.3               | <0.3             | <0.3             | <0.3            |
| Diciembre    | <0.3               | <0.3             | <0.3             | <0.3            |

### Conclusiones

Se detectó la presencia *V. parahaemolyticus* mediante las pruebas bioquímicas y PCR, durante el mes de mayo en los cuatro puntos de muestreo, mientras que en el mes de junio se detectó en la Laguna de Pescadero y Laguna de San Pedro. En el mes de julio en el Sistema Lagunar del Huizache-Caimanero, meses en los que también se registraron las mayores salinidades, de 32 a los 37 g L<sup>-1</sup> respectivamente.

Las cepas analizadas fueron negativas a los genes *tdh* y *trh* relacionados con la toxicidad.

En el conteo mediante NMP, se registraron valores por debajo de los límite máximo permitido en la Norma Oficial

Mexicana NOM-242-SSA1-2009 de 10<sup>4</sup> NMP/g para esta bacteria, por lo que el camarón muestreado en la Laguna Pescador, Laguna de San Pedro, Sistema Huizache-Caimanero y centro de venta en Mazatlán en esas fechas, no presentó un riesgo de transmisión de *V. parahaemolyticus*.

Los resultados obtenidos en esta investigación sobre la identificación y conteo de *V. parahaemolyticus* empleando pruebas bioquímicas y PCR, para cada muestra analizada, son coincidentes en resultados, con la excepción de que las pruebas bioquímicas convencionales establecidas en la Norma, no pueden discernir sobre la toxicidad de la cepa en cuestión, pues requiere de pruebas adicionales, mientras que la PCR cuenta con la ventaja de que brinda respuestas de especie y toxigenia en un corto períodos de tiempo.

### Literatura citada

- Aguilar G.E. 2007. Evaluación de la presencia o ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de aguas superficiales de esteros de Mazatlán Sinaloa. (Tesis de licenciatura) Instituto Tecnológico de Mazatlán.
- Aguirre G.G. y Lara F.M. 2011. Biología molecular, herramienta para identificar bacterias que afectan al camarón de cultivo. Revista Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológico CONACYT-Campeche. 3: 35-38.
- Alam M., Chowdhury W.B., Bhuiyan N.A., Islam A., Hasan N.A., Nair G.B. *et al.* 2009. Serogroup, virulence, and genetic traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the estuarine ecosystem of Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*; 75: 6268-74.
- Aliaga R., 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 Herediana*, Perú; 21: 135-149.
- Amarales O.L. 2005. Circular de vigilancia epidemiológica de brote de *Vibrio parahaemolyticus*. Gobierno de Chile, Ministerio de Salud, Subsecretaría de Salud Pública, División de Planificación Sanitaria, Depto. Epidemiología. 2006; Circular No. 241.
- Balakrish N.G. y Hormazabal O. 2005. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic. *Chilean Journal*; 22: 125-130.
- Bej A.K., Patterson D.P., Brasher C.W., Vickery M.C.L., Jones D.D., Kaysner C.A. 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: 215-225.

- Boone, L. 1931. Crustacea from Panama and Canal Zone. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 63: 137-189.
- Cabanillas, B., Llaugas, M., Romero, R., Espinoza, A., García, G., Nishibushi, M., et al. 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in México. *FEMS Microbiol. Lett.* (265) 76–80.
- Cárdenas, A.B. 2009. Evaluación a la exposición a *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio cholerae* toxigénicos por el consumo de ostión crudo en Mazatlán, Sinaloa (Tesis Maestría). Mazatlán, Sinaloa: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.
- Castro, L. y Jonathan, L. 2009. Desarrollo y análisis del sistema conjunto PCR/Dot Blot para la detección del virus de la Necrosis hipodérmica y Hematopoyética infecciosa. (Tesis de licenciatura). Ecuador: Escuela superior politécnica del litoral. Facultad de ingeniería marítima y ciencias del mar.
- Chávez, S.C. e Higuera, C.I. 2003. Manual de buenas prácticas de producción acuícola de camarón para la inocuidad alimentaria. [Monografía en internet]. México. Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental. México. En: [www.anfacal.org/media/Biblioteca\\_Digital/Acuicultura/JM-Manual-Camaron.pdf](http://www.anfacal.org/media/Biblioteca_Digital/Acuicultura/JM-Manual-Camaron.pdf)
- Comisión Federal para la prevención contra riesgos sanitarios (COFEPRIS). 2010. Evaluación de riesgo y plan de control de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos. 2-4.
- CONAPESCA. 2010. Anuario estadístico de acuicultura y pesca [Monografía en internet]. México, D.F. Comisión nacional de acuicultura y pesca. [Consultado en junio 2012]. En: [http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_2010](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2010)
- CONAPESCA. 2011. Anuario estadístico de acuicultura y pesca [Monografía en internet]. México, D.F. Comisión nacional de acuicultura y pesca. [Consultado en julio 2012]. En: [www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario\\_2012](http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/wb/cona/anuario_2012)
- Da Silva, L.V.A. 2005. Control de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* en ostiones. (Tesis de Doctorado). Luisiana Estados Unidos: Universidad del Estado de Luisiana.
- Dabanch, P.J., Herrera, C.D., Pavés, A.V., Veas, P.N., Braun, J.S., Porte, T.L. 2009. Bacteriemia por *Vibrio Parahaemolyticus*. Reporte de caso y revisión de la literatura. *Revista Chilena*. 26: 360-362.
- Daniels, N.A., Mackinnon L., Bishop R., Altekruise S., Ray B., Hammond R.M. et al. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*; 181: 1661-1666.
- Diario Oficial de la federación: Norma Mexicana NOM-242-SSAI-2009. "Productos y Servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados".
- Díaz, J. y Valerio, E.M. 2002. Diarrea por *Vibrio parahaemolyticus* primer caso reportado en Roma. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*. 37: 1-3.
- Dulanto, G.J.R. 2013. Identificación rápida de especies del género *Vibrio* asociados con el cultivo de "langostino blanco" *Litopenaeus vannamei* por amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). (Tesis de Licenciatura). Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- FAO. 2003. Evaluación de riesgos de *Campylobacter* spp. en pollos para asar y *Vibrio* spp. en mariscos. Informe de una consulta mixta FAO/OMS de expertos Bangkok, Tailandia. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 22-45.
- Florida Department of Health. Blackmore, C. 1999. *Vibrio parahaemolyticus*. [Monografía en internet]. Florida, EUA. [Consultado en 09 de Octubre del 2013]. En: [http://www.doh.state.fl.us/Disease\\_ctrl/epi/htopics/reports/vib\\_para.pdf](http://www.doh.state.fl.us/Disease_ctrl/epi/htopics/reports/vib_para.pdf)
- Gavilán, G.R. y Martínez, U.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: 109-115.
- Gómez-Gil, B. 2006. Evaluación de las condiciones fisicoquímicas y microbiológicas del complejo lagunar Huizache-el Caimanero, Sinaloa. Tercer Foro Estatal de Ciencia y Tecnología Sinaloa, investigación para el desarrollo. 8-9; Culiacán, Sinaloa.
- Gómez-Gil, R.B. y Lizárraga, P.L. 2011. Análisis de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* en productos pesqueros por método combinado de microbiología (NMP) y biología molecular. Versión 2.1.
- Heitmann, G., Jofre, M., Hormazabal, O., Olea, N., Vallebuonas, S., Valdés, H. 2005. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Chilena de Infecciones*. 22(2): 131-140.
- Lizárraga, O.M.L, Mendez, G.E., Rivas, M.A., Vargas, H.E., Portillo, L.A., González, R.A., et al. 2009. Association of *Vibrio cholerae* with plankton in coastal areas of Mexico. *Environmental microbiology*; 11: 201-208.
- MacFaddin, J.F. 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra Edición, Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana. 33-411.

- Matherne, B.W. 2009. Populations of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in Breton sound and Barataria Bay. (Masters thesis). Louisiana EUA: Louisiana State University.
- Nishibuchi, M. y Kaper, J.B. 1995. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. *Infection and Immunity*. 63: 2093-99.
- Ortega, S.E. 2011. Detección molecular de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico en ostiones extraídos de la bahía de Mazatlán, Sinaloa y boca de Camichín, Nayarit. (Tesis Licenciatura). Mazatlán, Sinaloa: Instituto Tecnológico de Mazatlán
- Ortiz, E.A. 2011. Impacto socioeconómico de la pesca de camarón en las lagunas costeras. Memorias de la III Reunión de la Sociedad Mexicana de Pesquerías. 148 pp.
- Paris, M.E. 2005. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. Cuadernos Medico Sociales. 45: 43-47.
- Rodríguez, F.E, Bosch, N.A., Cepeda, S.A., Domínguez, R.L., Otero, C.A., Zurera, C.G., *et al*. 2010. Informe del comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre los criterios microbiológicos para las especies patógenas del género *Vibrio* aplicable, como medidas adicionales de control de inspección fronteriza a productos pesqueros importados. Revista del Comité científico de la AESAN 12: 23-25.
- Secretaria de Salud. 2007-2012. Programa de acción específico. Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios. México, D.F. [consultado en Mayo del 2012]. En: [www.cofepris.gob.mx/cofepris/Documents/.../prgaccion.pdf](http://www.cofepris.gob.mx/cofepris/Documents/.../prgaccion.pdf)
- Silva, W., Olea A., Cachicas, C., Fernández, O., Ibáñez, C., Hormazabal, C., *et al*. 2008. Instituto de salud pública. Manual de procedimiento: aislamiento, identificación y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Chile, Departamento de Salud Ambiental. 4-45.

**Como citar este artículo:** Rodríguez-Camacho, J.C., Méndez-Gómez, E., Rivas-Montañó, A.M., Cortés-Ruiz, J.A. (2014). Evaluación de la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*) silvestre estuarino en el sur de Sinaloa y norte de Nayarit, mediante análisis microbiológico y PCR. *Revista Bio Ciencias* 2(4): 282-292.

