

Aislamiento microbiológico de *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero en la ciudad de Puebla

Rojas Ruíz Norma E.*
Muñoz Zurita Guillermo**
Gárate Vélez Lorena*
González Montesinos Diana V.*
Del Pozo González María F.*

Microbiological isolation of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp samples in the city of Puebla

Fecha de aceptación: septiembre 2013

Resumen

INTRODUCCIÓN. *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus* son bacterias, consideradas como patógenas para el ser humano. *Vibrio cholerae* es el agente causal del cólera y *V. parahaemolyticus*, es responsable de brotes de gastroenteritis aguda ocasionada por el consumo de mariscos y otros alimentos marinos crudos o mal cocidos.

OBJETIVO. Determinar la presencia de las bacterias *Vibrio cholerae* y *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero de 20 establecimientos en la ciudad de Puebla.

MATERIAL Y MÉTODO. Se pesaron tres gramos de camarón, fueron adicionados en tubos con 10 ml de agua estéril, se realizaron diluciones 1/10 de las muestras y fueron sembradas en medio de cultivo selectivo agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS), las cajas Petri fueron incubadas durante 24 horas y se determinó el número de unidades formadoras de colonias de los distintos microorganismos presentes.

RESULTADOS. Se identificó la presencia de *Vibrio cholerae* en 13 de las muestras y *V. parahaemolyticus* en todas las muestras. *V. parahaemolyticus* se aisló en una mayor cantidad con un máximo valor de 2×10^4 ufc, en cambio para *V. cholerae* el valor máximo obtenido fue de 4×10^3 ufc.

CONCLUSIONES. Los métodos microbiológicos, son una herramienta importante en la determinación de la calidad microbiológica de los alimentos, en este caso nos proporcionaron información con respecto a la presencia de *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, a los que estamos expuestos al consumir camarón coctelero sin cocimiento o desinfección.

Palabras clave: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemoliticus*, camarón coctelero, medio TCBS.

Abstract

INTRODUCTION. The bacteria *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* are considered to be pathogenic to humans. *Vibrio cholerae* is the causative agent of cholera and *V. parahaemolyticus*, is responsible for outbreaks of acute gastroenteritis caused by the consumption of shellfish and other seafood raw or undercooked.

OBJECTIVE. To determine the presence of the bacteria *Vibrio cholerae* and *V. parahaemolyticus* in samples of shrimp of 20 commercial establishments, where is sold for consumption in the city of Puebla.

MATERIAL AND METHOD. We weighed 3 grams of shrimp, which were added to tubes containing 10 ml of sterile water, then dilutions were made 1/10 of the samples, which were inoculated in Agar selective culture medium with Thiosulfate, citrate, bile salts and sucrose (TCBS), the Petri dishes were incubated for 24 hours and then proceeded to determine the number of colony forming units of the different microorganisms present.

RESULTS. We identified the presence of *V. cholerae* in 13 samples and *V. parahaemolyticus* in all samples. *V. parahaemolyticus* was isolated in a greater amount with a maximum value of 2×10^4 cfu, in contrast to *V. cholerae* maximum value obtained was 4×10^3 cfu.

CONCLUSION. The microbiological methods are an important tool for determining the microbiological quality of food, in this case provided information regarding the presence of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* to which we are exposed to eating raw shrimp or properly disinfected.

Keywords: *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahemoliticus*, shrimp, TCBS Agar.

*Universidad Politécnica Metropolitana de Puebla. Ingeniería en Biotecnología.

**Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, Pue.

Correspondencia: Guillermo Muñoz Zurita.

Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

13 Sur Núm. 2702 Puebla; Puebla, México.

Dirección electrónica: guimuzu2003@yahoo.com

Introducción

El género *Vibrio* está compuesto por más de 35 especies, sin embargo, sólo algunas especies son patógenas para el ser humano; tales como: *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*.¹ Los microorganismos pertenecientes al género *Vibrio*, son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, cuyo hábitat natural son los ambientes acuáticos marinos y estuarios, ya que estos microorganismos requieren una cantidad considerable de sales, estos ambientes resultan ideales para su desarrollo. Se ha observado que la multiplicación de los microorganismos aumenta a medida que la temperatura del agua se eleva, lo que explica, en parte, el aumento de casos en los meses templados o de verano.²

V. cholerae es el agente causal del cólera, se ha estimado que *V. cholerae* produce de tres a cinco millones de casos de diarreas y más de 100,000 muertes anualmente.^{3,4}

En México el cólera representó, en el periodo 1991 a 1997, un problema de salud pública al registrarse un promedio de 6,556 casos anuales decreciente.⁵ La mayor incidencia fue reportada en 1995 con un número de casos de 8,162, a partir del año 2001 se mostró una disminución marcada en su incidencia (cuadro 1).

Los estudios muestran que *V. cholerae*, puede desarrollarse en un rango de temperaturas que oscilan entre los 16 y 42°C, con un óptimo de 37°C y en condiciones de pH de 6.8 a 10.2, con un pH óptimo de 7.0 a 8.0.⁶

Cuadro 1
Casos e incidencia de cólera en México 1991- 2012*

Año	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2010	2011	2012
Casos	1088	2356	2690	4075	8162	11091	16430	45892	6556	5	1	1	1	1
Incidencia **	3.2	9.4	12.5	4.5	17.9	1.2	2.5	0.1	0.01	0.005	0.0001	0.0001	0.0008	0.0008

Fuente: SINAVE/DGE.SS. Sistema de Vigilancia Epidemiológica de cólera.

*A la semana 23. **Por 100 mil habitantes

Diversos estudios señalan que el hábitat natural de *V. cholerae*, es el ambiente acuático, dónde puede estar asociado tanto a sustratos vivos como a factores abióticos, se le ha podido aislar tanto en ambientes marinos, como en regiones templadas o tropicales, en lagos y ríos, en moluscos y crustáceos; también se le ha asociado con copépodos del plancton, otros del zooplancton, raíces de lirio acuático y algas.⁷

Debido a que se ha asociado la presencia de varias especies de bacterias del género *Vibrio* a diversos organismos acuáticos, principalmente bentónicos filtradores, es posible que estos organismos al consumirse algunos de ellos de manera cruda o sin haberse sometido a altas temperaturas, podrían ser organismos que funcionen como vectores de vibrios patógenos para el ser humano.

En relación con este punto, un estudio mostró que en las costas del Golfo de México *V. vulnificus* alcanza concentraciones de hasta 1×10^6 ufc g⁻¹ de ostión, con temperaturas mayores a 20°C y salinidades de 5 a 20‰. En el Pacífico noroeste de los Estados Unidos, al registrarse un incremento de temperatura entre 1 a 5°C asociado con “El Niño”, se produjeron altos niveles de *V. parahaemolyticus* en ostión de 1.1×10^4 ufc g⁻¹, un evento similar se reportó para la bahía de Galveston, Texas.⁸

Se ha observado que el número de bacterias de *V. cholerae* decrece en relación con la disminución de la temperatura del agua a menos de 20°C.

Un estudio llevado a cabo en Perú hace evidente la existencia de una relación del clima con el cólera, con base en el número de casos de cólera reportados en Perú entre

1997 y el año 2000, se observó una correlación significativa entre la incidencia de la enfermedad y el incremento de la temperatura del mar a lo largo de la costa de Perú. Esta relación clima-cólera en 1997–98, incluye el año de la presencia del fenómeno meteorológico de El Niño, el cual contribuyó al incremento de la temperatura del agua de las costas de Perú.⁹

La enfermedad del cólera inicia con la ingestión de agua o alimentos contaminados, después de superar la barrera ácida del estómago, la bacteria colonizará el epitelio del intestino delgado, en este proceso intervienen varios factores, como las adhesinas y la producción de enzimas hidrolíticas, entonces es secretada la toxina colérica producida por los vibrios adheridos, a través de la membrana externa bacteriana, al ambiente extracelular y se introduce a la célula, la toxina colérica alterará el transporte de iones, ocasionando la diarrea de tipo secretor que caracteriza el cuadro clínico del cólera, con la subsecuente pérdida de agua y electrolitos.^{10,11}

Otra de las especies del género *Vibrio* que es patógeno para el hombre, es *V. parahaemolyticus*, un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, halófilo, y cuyo reservorio al igual que el de *V. cholerae*, también son las aguas con alta concentración de sal. Es responsable de brotes de gastroenteritis aguda por ingestión de mariscos y otros alimentos marinos crudos o mal cocidos, para causar enfermedad son suficientes inóculos infectantes aproximados de 1×10^4 bacterias por gramo de marisco. Ocasionalmente también se le ha descrito asociado con la infección de heridas y sepsis.¹²⁻¹⁵

V. parahaemolyticus fue identificado por primera vez como agente de enfermedad transmitida por alimentos, en Japón en el año 1950, en relación con un brote asociado con el consumo de sardinas.¹⁶ Desde entonces, se ha identificado como causa frecuente del síndrome diarreico agudo en países desarrollados y en vías de desarrollo.¹⁵

Una característica de las cepas patógenas de *V. parahaemolyticus* es la producción de una toxina conocida como hemolisina directa termoestable (TDH), la cual es producida por aproximadamente 95% de las cepas y es considerada como un factor de virulencia determinante para la producción de enfermedad en el ser humano.¹⁷⁻¹⁸

Debido a la importancia médica de los microorganismos patógenos *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, es relevante llevar a cabo el análisis microbiológico de alimentos que se consumen principalmente crudos o precocidos, como son los camarones coxteros, con el objetivo de determinar la presencia de dichos microorganismos.

Material y método

En el presente estudio se realizó el muestreo al azar de 20 establecimientos ubicados en la ciudad de Puebla, en los cuales se realiza la venta de camarón coxtero, conocido también como de pacotilla. Las muestras de camarón fueron transportadas en hielo al laboratorio para ser procesadas de la siguiente manera: se pesaron 3 gramos de camarón, los cuales fueron adicionados en tubos que contenían 10 ml de agua estéril, posteriormente se realizaron diluciones 1/10 de las muestras, y se sembraron en medio de cultivo selectivo agar con tiosulfato, citrato, sales biliares y sacarosa (TCBS), que es el medio que se prefiere para el aislamiento de *V. cholerae*. Las cajas Petri fueron incubadas durante 24 horas y posteriormente se procedió a determinar el número de unidades formadoras de colonias de los distintos microorganismos presentes.

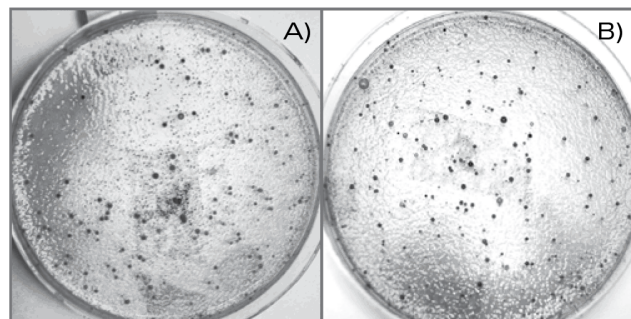
Resultados

Al realizar el análisis microbiológico de las muestras de camarón coxtero, los resultados indicaron que fue posible determinar la presencia de las bacterias *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* (figura 1).

En el caso de *V. cholerae*, el microorganismo fue detectado en 13 de las 20 muestras analizadas, es decir en un 65%, y sólo 7 de las muestras, fueron negativas para el aislamiento de esta bacteria. En cambio la bacteria *V. parahaemolyticus* fue aislada en el 100% de las muestras analizadas.

El ambiente marino proporciona las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de diferentes especies de *Vibrio*, nuestros resultados indican la alta prevalencia del agente infeccioso *V. cholerae* en alimentos de origen marino, en este caso los camarones coxteros, de esta bacteria la menor cantidad de unidades formadoras de colonias encontradas para las muestras analizadas fue de 1.4×10^2 ufc/ml, en cambio la mayor cantidad resultó ser 4×10^3 ufc/ml (cuadro 2).

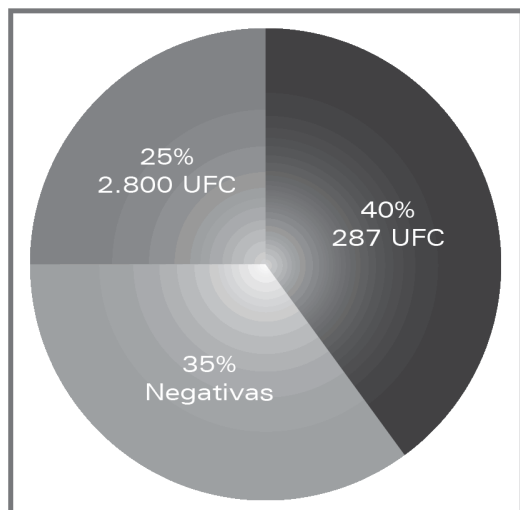
Figura 1
Colonias en medio de cultivo TCBS de los microorganismos aislados a partir de muestras de camarón coxtero. A) *V. cholerae* y B) *V. parahaemolyticus*



Cuadro 2
Aislamiento de *V. cholerae* en muestras de camarón coxtero

Número de muestra	ufc de bacterias aisladas/ml
1	Negativa
2	1.6×10^3
3	4×10^3
4	4×10^2
5	3×10^2
6	1.4×10^3
7	2×10^2
8	1.4×10^2
9	4×10^3
10	Negativa
11	3×10^3
12	Negativa
13	1.4×10^2
14	Negativa
15	1.6×10^2
16	7.8×10^2
17	Negativa
18	Negativa
19	1.8×10^2
20	Negativa

Gráfica 1
Promedio en ufc de *Vibrio cholerae* en muestras de camarón coctelero



Cuadro 3
Aislamiento de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero

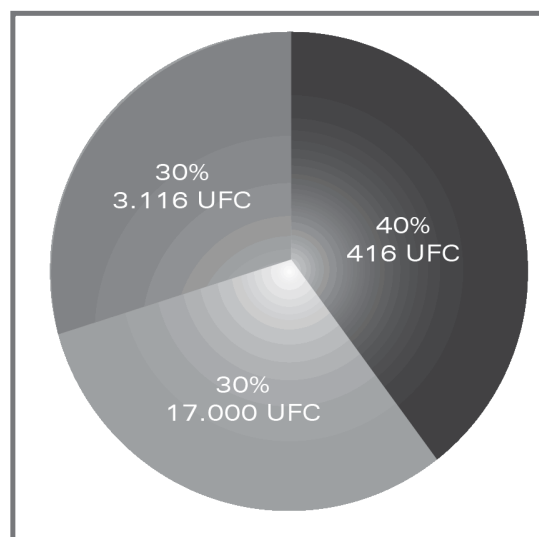
Número de muestra	ufc de bacterias aisladas/ml
1	6×10^2
2	1.2×10^2
3	6×10^3
4	1.6×10^3
5	4×10^3
6	1.5×10^4
7	$8. \times 10^2$
8	1.8×10^3
9	5.6×10^2
10	1.4×10^2
11	2×10^4
12	1.5×10^2
13	8×10^2
14	1.6×10^2
15	4×10^3
16	1.4×10^4
17	1.8×10^4
18	1.9×10^4
19	1.6×10^4
20	1.3×10^3

De las muestras analizadas, en las que se detectó la presencia de *V. cholerae*, el 25% obtuvieron un promedio de 2800 ufc/ml, el 40% obtuvo 287 ufc/ml y el 35% resultaron negativas para el aislamiento de esta bacteria (gráfica 1).

En el caso de *V. parahaemolyticus*, estuvo presente en todas las muestras analizadas, siendo la menor cantidad aislada de 1.2×10^2 y la mayor de 2×10^4 ufc/ml. Mostrando una diferencia de un orden de magnitud con respecto a la mayor cantidad de bacterias aisladas de *V. cholerae* (cuadro 3).

Los resultados indicaron que de las 20 muestras positivas para la bacteria *V. parahaemolyticus*, el 30% obtuvo un valor promedio de 17,000 ufc/ml, el otro 30% un promedio de 3116 ufc/ml, y finalmente el 40% restante obtuvo una cantidad de 416 ufc/ml. Estos resultados ponen de manifiesto la alta prevalencia de *V. parahaemolyticus* en las muestras analizadas (gráfica 2).

Gráfica 2
Promedio en ufc de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón coctelero



El aislamiento de las bacterias *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus* en alimentos de origen marino, como son los camarones cocteleros, pone de manifiesto la necesidad de tomar medidas preventivas al ingerirlos, tales como el adecuado cocimiento y la desinfección, con la finalidad de evitar enfermedades gastrointestinales ocasionadas por su consumo inmediato o en estado precocido.

Discusión

V. cholerae y *V. parahaemolyticus* son agentes infecciosos cuyo hábitat natural es el ambiente marino, se les ha aislado frecuentemente en mariscos, en esta investigación se aislaron de camarones cocteleros; los resultados indicaron que la prevalencia de *V. parahaemolyticus*, fue mayor a la de *V. cholerae* en las muestras analizadas.

Para el caso de *V. cholerae* los resultados indicaron que la menor cantidad aislada fue de 1.4×10^2 ufc/ml, en cambio la mayor cantidad resultó ser 4×10^3 . Se considera que para desencadenar la enfermedad es necesario consumir una cantidad de aproximadamente 1×10^4 bacterias por gramo de marisco,¹³ es decir que la cantidad encontrada en las muestras de camarón analizadas, no contienen la cantidad suficiente infectiva para generar la enfermedad, sin embargo, si estos alimentos se almacenan en condiciones inadecuadas de temperatura, es posible que se reproduzcan en un plazo de aproximadamente 60 minutos y alcancen la cantidad de 1.6×10^4 .

La baja temperatura es un factor fundamental en la disminución del crecimiento de *Vibrio sp.*, no obstante para el caso de *Vibrio parahaemolyticus* se ha encontrado que ha sido capaz de sobrevivir a temperaturas de -18°C durante un periodo de 7 semanas.¹⁹ Esto corrobora los resultados obtenidos en esta investigación, ya que fue posible aislar a este microorganismo desde 1.2×10^2 hasta 2×10^4 ufc/ml, a partir de muestras que se encontraban mantenidas a baja temperatura para su conservación y venta.

Es conocido que la cocción a temperaturas de 65°C o mayores, matará a los microorganismos presentes en los mariscos, pero particularmente en el caso del camarón

coctelero, se consume preferentemente de la manera en la que lo venden en las pescaderías, el cual se encuentra en un estado precocido, lo cual incrementa el riesgo de consumir este tipo de alimento contaminado con *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*.

Conclusión

El uso de los métodos microbiológicos de cultivo, sigue siendo una herramienta importante para la determinación de la calidad microbiológica de los alimentos, en el presente estudio nos proporcionó información de la cantidad existente de los microorganismos *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, en el camarón coctelero, a los que estamos expuestos al consumirlo de manera inmediata; aunque se considera en general, que los crustáceos y pescados no acumulan el vibrión en cantidad importante para causar infección, pueden alcanzar grandes cantidades al dejarse sin adecuada refrigeración por unas pocas horas, resaltando la importancia de consumir estos alimentos cocidos o desinfectados de manera adecuada, con la finalidad de evitar el brote de enfermedades.

Referencias

1. Thompson FL, Iida T, Swings J. "Biodiversity of Vibrios". *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68(3): 403-431.
2. Hernández C, Ulloa J, Vergara JA, Espejo R, Cabello F. "*Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile." *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1081-1088.
3. Weil AA, Ivers LC, Harris JB. "Cholera: lessons from Haiti and beyond". *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14: 1-8.
4. Dick MH, Guillemin M, Moussy F, Chaignat CL. "Review of two decades of cholera diagnostics –how far have we really come?" *PLOS Negl Trop Dis* 2012; 6: 1-8.
5. Comité Nacional de Vigilancia Epidemiológica: Aviso epidemiológico: Cólera: Confirmación de caso de cólera CoNaVe/2012/01/COLERA 14/junio/2012. Disponible en: http://www.facmed.unam.mx/deptos/salud/vigilanciaepidem/alerta_colera_04jul2012.pdf.
6. "Laboratory Methods for the Diagnosis of *Vibrio cholerae*". Centers for Disease Control and Prevention. Disponible en: <http://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>.
7. Constantin MG, Mozumder KP, Grim JC, Hasan AN, Niamul NM, Alam M, Sack BR, Huq A, Colwell RR. "Role of zooplankton diversity in *Vibrio cholerae* population dynamics and in the incidence of Cholera in the Bangladesh sundarbans." *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (17): 6125–6132.
8. Colwell R. R. "Global climate and infectious diseases: The cholera paradigm". *Science*. 1996; 274: 2025-2031.
9. Gil AI, Louis RV, Rivera NG, Lipp E, Huq A, Lanata FC, Taylor ND, Russek CE, Choo Pun N, Sack BR, Colwell RR. "Occurrence and distribution of *Vibrio cholerae* in the coastal environment of Peru." *Environ. Microbiol.* 2004; 6(7): 699–706.
10. Robles EL, García ER, Torres LJ. "Toxinas de *Vibrio cholerae*. Una revisión". *Rev. Mex. de Patología Clínica*. 1999; 46(4): 254-259.
11. Lencer WL. "Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial mucosal interactions. *V. cholerae*: invasion of the intestinal epithelial barrier by a stably folded protein toxin." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001; 280: G781-G786.
12. Heitmann G I, Jofré ML, Hormázabal OJ, Olea NA, Vallebuona SC, Valdés HC. "Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*." *Rev Chil Infect*. 2005; 22 (2): 131-140.
13. Hernández C, Ulloa J, Vergara J A, Espejo R, Cabello F. "*Vibrio parahaemolyticus* infections and algal intoxications as emergent public health problems in Chile". *Rev Méd Chile* 2005; 133: 1081-1088.
14. Collier D N. "Cutaneous infections from coastal and marine bacteria". *Dermatologic Therapy*. 2002; 15:1-9.
15. Dabanch PJ, Herrero CD., Pavéz AC, Veas PN, Braun JS, Porte TL. "Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura". *Rev. Chil. Infect*. 2009; 26 (4): 360-362.
16. Daniels N A, Mackinnon L, Bishop R, Altekruse S, Ray B, Hammond R, et al. "*Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998". *J Infect Dis* 2000; 181: 1661-1666.
17. Su YC, Liu C. "*Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety". *Food Microbiol*. 2007; 24: 549–558.
18. Zamora PD, Quiñónez RE. "Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*." *Rev Digital Universitaria*. 2005; 6(4): 1-9.
19. Paris M. E. "Intoxicación por *Vibrio Parahaemolyticus*." *Cuad Méd Soc (Chile)*. 2005; 45: 43-47.