

# Crecimiento y sobrevivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en ostión americano (*Crassostrea virginica*) almacenado en refrigeración

Argel Flores-Primo, D en C,<sup>(1)</sup> Violeta T Pardío-Sedas, D en C,<sup>(1)</sup> Karla López-Hernández, D en C,<sup>(1)</sup> Leonardo Lizárraga-Partida, D en C,<sup>(2)</sup> Roxana Uscanga-Serrano, QC.<sup>(1)</sup>

Flores-Primo A, Pardío-Sedas VT, López-Hernández K, Lizárraga-Partida L, Uscanga-Serrano R. Crecimiento y sobrevivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en ostión americano (*Crassostrea virginica*) almacenado en refrigeración. *Salud Publica Mex* 2015;57:211-218.

## Resumen

**Objetivo.** Cuantificar las densidades de *Vibrio parahaemolyticus* en ostión americano (*Crassostrea virginica*) almacenado en refrigeración. **Material y métodos.** Se almacenaron 320 ostiones a 7 °C durante nueve días y se determinaron las densidades totales y patogénicas mediante la técnica NMP-PCR. **Resultados.** Se observaron densidades de *V. parahaemolyticus* *tlh+* en los días 0, 3 y 6 de almacenamiento con 1.134, 2.764 y 0.785 log<sub>10</sub> NMP/g, respectivamente, y en los días 0 y 3 la densidad patogénica *trh+* con 0.477 y 0.519 log<sub>10</sub> NMP/g, respectivamente; las densidades patogénicas *tdh+* (0.519 log<sub>10</sub> NMP/g), *tdh+/trh+* (0.519 log<sub>10</sub> NMP/g) y *tdh+/orf8+* (-0.444 log<sub>10</sub> NMP/g) se detectaron al tercer día de almacenamiento. **Conclusión.** Los resultados sugieren que el crecimiento de *V. parahaemolyticus* y la ocurrencia de genes patogénicos a 7 °C involucran cambios en la expresión génica como una respuesta al estrés por frío. Esto contribuye a la sobrevivencia y virulencia de *V. parahaemolyticus*, lo cual representa un riesgo a la salud pública.

Palabras clave: *Vibrio parahaemolyticus*; ostión; patogenicidad; refrigeración; México

Flores-Primo A, Pardío-Sedas VT, López-Hernández K, Lizárraga-Partida L, Uscanga-Serrano R. Growth and survival of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in American oyster (*Crassostrea virginica*) under cold storage. *Salud Publica Mex* 2015;57:211-218.

## Abstract

**Objective.** To quantify *Vibrio parahaemolyticus* densities in American oyster (*Crassostrea virginica*) under cold storage. **Materials and methods.** 320 oysters were stored at 7 °C for nine days and total and pathogenic densities were determined by the NMP-PCR methodology. **Results.** *V. parahaemolyticus* *tlh+* densities were observed on 0, 3, and 6 days of storage at 1.134, 2.764 and 0.785 log<sub>10</sub> NMP/g, respectively, and pathogenic density *trh+* on 0 and 3 days at 0.477 and 0.519 log<sub>10</sub> NMP/g, respectively; the pathogenic densities *tdh+* (0.519 log<sub>10</sub> NMP/g), *tdh+/trh+* (0.519 log<sub>10</sub> NMP/g), and *tdh+/orf8+* (-0.444 log<sub>10</sub> NMP/g) were detected on day 3 of storage. **Conclusion.** The results suggest that *V. parahaemolyticus* growth and pathogenic genes occurrence at 7 °C involve changes in the genetic expression as a cold shock response, favoring *V. parahaemolyticus* survival and virulence, representing a health risk.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; oyster; pathogenicity; refrigeration; Mexico

- (1) Programa de Maestría en Ciencia Animal, Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana, Veracruz, Veracruz, México.  
(2) Biotecnología Marina, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, México.

Fecha de recibido: 16 de octubre de 2014 • Fecha de aceptado: 18 de marzo de 2015

Autora de correspondencia: Dra. Violeta T. Pardío Sedas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Av. Miguel Ángel de Quevedo s/n, col. Unidad Veracruzana. 91710 Veracruz, Veracruz, México.  
Correo electrónico: vpardio@uv.mx, vpardio@yahoo.com.mx

*Vibrio parahaemolyticus* es una bacteria halofílica autóctona y abundante en ecosistemas marinos y estuarinos, distribuida en todas las aguas costeras del mundo y asociada con varias especies de mariscos comestibles.<sup>1</sup> Ha sido reconocida como uno de los patógenos emergentes de transmisión alimentaria más importante y agente causal principal del incremento en brotes de infección por el elevado consumo de pescados y mariscos crudos, mal cocidos o mal manipulados, particularmente ostiones.<sup>2-4</sup> *V. parahaemolyticus* causa gastroenteritis aguda, caracterizada por náuseas, vómitos, calambres intestinales y fiebre baja con un periodo de incubación de 4 a 96 h. La diarrea inflamatoria es generalmente acuosa y en ocasiones sanguinolenta.<sup>5</sup> La septicemia y la muerte ocurren raramente, sin embargo, la infección puede causar septicemia y ser fatal en pacientes con condiciones médicas preexistentes como daño hepático y renal, diabetes o trastornos del sistema inmune.<sup>6</sup>

El mecanismo de infección al hombre por *V. parahaemolyticus* no está completamente definido. Diversos estudios señalan que su patogenicidad está relacionada con cepas que producen dos hemolisinas: una hemolisina directa termoestable (TDH) que causa la disrupción de los microdominios lipídicos, lo que favorece la invasión bacteriana, codificada por el gen *tdh*,<sup>7</sup> y la hemolisina termoestable relacionada (TRH), codificada por el gen *trh*, el cual presenta una secuencia nucleótida 68% homóloga con el gen *tdh* y que desempeña un papel significativo en la enfermedad.<sup>8,9</sup> Mientras que ambos genes son marcadores patogénicos, el gen *tlh* (hemolisina termolábil) es un marcador especie-específico para *V. parahaemolyticus*.<sup>10</sup> Los estudios realizados en diferentes regiones del mundo han mostrado que los genes *tdh* y *trh* están presentes en 90-99.8% de los aislamientos de las cepas clínicas, mientras que solamente de 0.2 a 10% de los aislamientos ambientales son potencialmente patogénicos.<sup>11,12</sup> Asimismo, se han reportado cepas pandémicas del serotipo *V. parahaemolyticus* O3:K6 en muestras clínicas y ambientales. Los serotipos más infecciosos contienen la secuencia distintiva *toxRS<sub>new</sub>* (operón que contiene una secuencia única que codifica proteínas reguladoras de genes asociados con virulencia), así como los genes *tdh* y *orf8* (fago filamentoso asociado) con la ausencia del gen *trh*.<sup>13,14</sup> Estas cepas pandémicas han sido reportadas en muestras ambientales y clínicas de diversos países como Asia<sup>16</sup>, Japón, India y Bangladesh,<sup>17-19</sup> España, Italia y Francia,<sup>12,20,21</sup> Estados Unidos,<sup>14</sup> Chile y México.<sup>22,15</sup> Esta diseminación actual se ha vinculado con brotes de enfermedades humanas causadas por *V. parahaemolyticus* debido a un incremento de cepas más patogénicas y pandémicas, lo cual, a su vez, se ha relacionado con la elevación de la temperatura

superficial del mar en las zonas costeras del mundo.<sup>1</sup> Estas infecciones pueden persistir durante el año en las zonas tropicales.<sup>23</sup>

En México, los ostiones son moluscos muy populares con una alta demanda, por lo que son cosechados intensivamente en las diversas lagunas y esteros, entre las que destaca el Sistema Laguna Mandinga (SLM). En 2013, Veracruz produjo 45% (19 422 ton) de la producción nacional de ostión (42 945 ton).<sup>24</sup> Debido a que la calidad del ostión decae rápidamente, la industria ha buscado procesos para minimizar la ocurrencia de patógenos y extender su vida de anaquel, entre los que destacan la refrigeración, comúnmente utilizada para preservar los ostiones en concha y en pulpa.<sup>25</sup> La norma NOM-242-SSA1-2009<sup>26</sup> establece que los ostiones deben mantenerse en refrigeración a 7 °C hasta por siete días para asegurar la calidad para su consumo. Sin embargo, la inocuidad de los ostiones puede estar comprometida debido a que las cepas de *V. parahaemolyticus* varían en su habilidad para sobrevivir y crecer bajo temperaturas de refrigeración. *V. parahaemolyticus* enfrenta las bajas temperaturas modificando diversos parámetros celulares, fenómeno conocido como respuesta al shock por frío.<sup>27</sup> Los resultados de estudios recientes de los autores de este artículo muestran las mayores densidades de cepas patogénicas durante primavera e invierno.<sup>28</sup> Dados la capacidad de *V. parahaemolyticus* de adaptarse a bajas temperaturas y el riesgo a la salud que representa la presencia de este patógeno en el ostión debido a su consumo en crudo, el presente trabajo tuvo por objeto evaluar la presencia de las densidades totales (*tlh*+) y patogénicas (*tdh*+, *trh*+, *orf8*+) de *V. parahaemolyticus* en ostión americano (*Crassostrea virginica*) durante el almacenamiento refrigerado a 7 °C, para determinar el efecto de esta temperatura en el crecimiento y sobrevivencia de *V. parahaemolyticus* por el riesgo a la salud pública que su consumo representa.

## Material y métodos

Área de estudio y colección de muestras. El proyecto del que formó parte este estudio fue evaluado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y está en acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NMX-FF-001-SCFI-2009<sup>29</sup> para productos de la pesca y la acuicultura-ostión en concha vivo. Los ostiones se recolectaron de bancos en producción de un área de extracción ostrícola cercana a asentamientos humanos ubicados en la Laguna Grande del SLM durante enero y marzo de 2013. El SLM se ubica en el suroeste del estado de Veracruz y fluye de forma paralela a la costa del Golfo de México entre 19°02' N y 96°06' W en Alvarado, Veracruz, México.<sup>30</sup> El clima de la región es tropical, la época de secas comprende parte del

invierno y la primavera (temperatura promedio 24.4°C); la época de lluvias incluye el verano y parte del otoño (temperatura promedio 25.2°C), y la estación de nortes comprende parte del otoño y el invierno (temperatura promedio 20.0°C).<sup>31</sup>

En la estación de invierno, mediante buceo, se recolectó un total de 320 ostiones vivos de tamaño medio legal (7-8 cm de largo NMX-FF-001-SCFI-2011),<sup>29</sup> que se transportaron al laboratorio en hieleras.<sup>32</sup> Se lavaron y eliminaron los balanos y residuos de algas adheridas a las conchas y se descartaron los animales muertos. Posteriormente, 80 ostiones se depositaron en cuatro contenedores y se almacenaron a 7 °C de acuerdo con la NOM-242-SSA1-2009.<sup>33</sup>

**Enumeración de Vibrio parahaemolyticus.** Los ostiones se analizaron por duplicado a los 0, 3, 6 y 9 días de almacenamiento. La metodología empleada para el aislamiento y cuantificación de *V. parahaemolyticus* se realizó por NMP-PCR (número más probable – reacción en cadena de la polimerasa) de acuerdo con Flores y colaboradores.<sup>28</sup> Los aislamientos presuntivos de *V. parahaemolyticus* se confirmaron mediante la presencia del gen *tlh* especie-específico. La presencia del gen *tlh* y de los genes *tdh* y *trh* se determinó mediante PCR multiplex según Bej y colaboradores<sup>8</sup> y la presencia del gen *orf8* se determinó por separado de acuerdo con Myers y colaboradores.<sup>14</sup> Las secuencias de los iniciadores empleados se presentan en el cuadro I. Las densidades

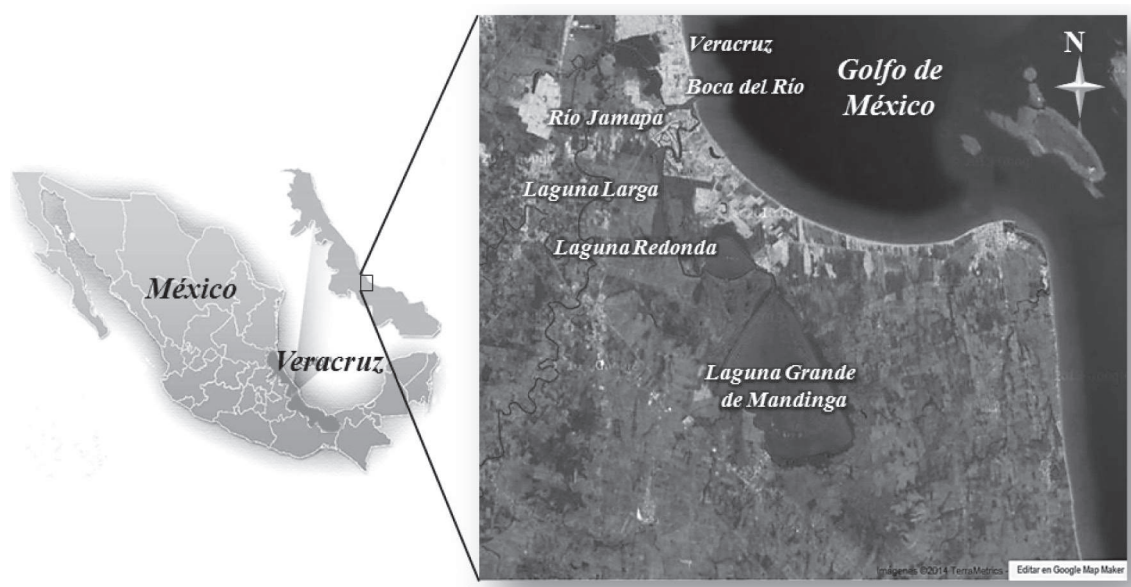
no patogénicas, patogénicas y potencialmente pandémicas de *V. parahaemolyticus* fueron calculadas usando los resultados positivos de PCR después de la confirmación de las colonias presuntivas, empleando las tablas del NMP correspondientes al intervalo de confianza a 95% y los resultados se expresaron como *V. parahaemolyticus* NMP/g de ostión.<sup>34</sup>

**Análisis estadístico.** Los valores de NMP de las densidades de *V. parahaemolyticus* se transformaron en  $\log_{10}$  y se analizaron por Anova para detectar diferencias a través del tiempo de almacenamiento. Para fines estadísticos, las muestras indeterminadas (ND = no detectado) se consideraron como la mitad del límite de detección en el ostión (0.15 NMP/g). El análisis estadístico se realizó mediante el software estadístico XLSTAT 2014 versión 2.05 (Addinsoft SARL) a un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

## Resultados

Las figuras 2 y 3 muestran la amplificación de los genes no patogénicos *tlh+*, patogénicos *tdh+*, *trh+*, *tdh+/trh+* y potencialmente pandémico *orf8+* de *V. parahaemolyticus* aislados de ostiones almacenados a 7 °C.

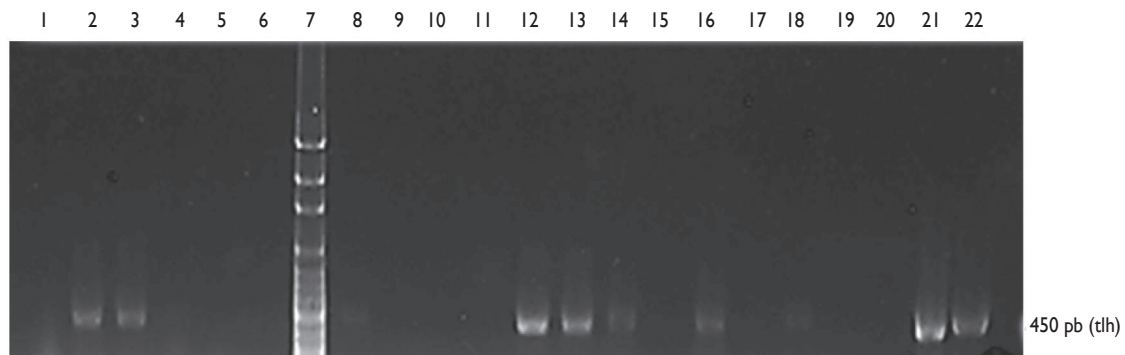
En el cuadro II se presentan las densidades totales, patogénicas y potencialmente pandémicas del *V. parahaemolyticus* encontradas durante el almacenamiento a 7 °C durante nueve días. Las muestras del tiempo 0 (ostiones frescos) mostraron una densidad media de *V. parahaemolyticus*



**FIGURA I. LOCALIZACIÓN DE LA REGIÓN DE ESTUDIO Y MAPA DEL SISTEMA LAGUNAR MANDINGA. LAS MUESTRAS DE OSTIÓN FUERON COLECTADAS DE BANCOS EN PRODUCCIÓN DE LA LAGUNA GRANDE. VERACRUZ, MÉXICO, 2013**

**Cuadro I**  
**INICIADORES UTILIZADOS PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LAS VARIEDADES NO PATOGENICAS Y PATOGENICAS DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* AISLADAS EN OSTIÓN AMERICANO (*CRASSOSTREA VIRGINICA*) COSECHADO EN LOS MESES ENERO-MARZO DE 2013 DE LOS BANCOS EN LA LAGUNA GRANDE DEL SISTEMA LAGUNAR MANDINGA, Y ALMACENADO A 7° C. VERACRUZ, MÉXICO, 2013**

gen	Secuencia	Cepas positivas	Fuente
<i>tlh</i>	<b>tl-f</b> AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG <b>tl-r</b> GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	CAIM 1772	Referencia 8
<i>tdh</i>	<b>L-tdh</b> GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC <b>R-tdh</b> TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	CAIM 1772	Referencia 8
<i>trh</i>	<b>trh-f</b> TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT <b>trh-r</b> CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G	CAIM 1772	Referencia 8
<i>orf8</i>	<b>F-O3MM824</b> AGG ACG CAG TTA CGC TTG ATG <b>R-O3MM1192</b> CTA ACG CAT TGT CCC TTT GTA G	CAIM 1400	Referencia 14



\* PCR *tlh*: Carril 1: blanco (sin ADN); Carriles 2, 3, 8, 12-14, 16 y 18: muestras *tlh* positivas; Carriles: 4-6, 9-11, 15, 17 y 19: muestras negativas; Carril 7: marcador de ADN (100 pb); Carril 20: control negativo (*V. vulnificus* CAIM 610); Carriles 21 y 22: controles positivos (*V. parahaemolyticus* CAIM 1772)

‡ El número de la derecha 450 pb indica el tamaño del producto de amplificación correspondiente al fragmento interno del gen *tlh*

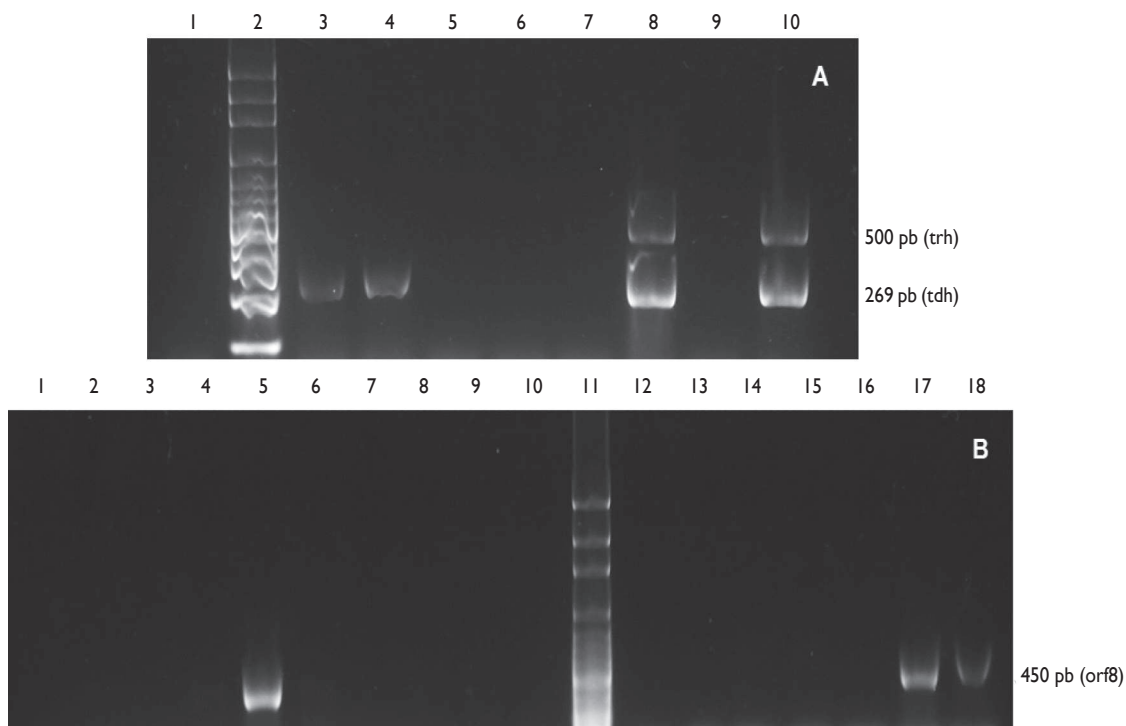
**FIGURA 2. PERFIL ELECTROFORÉTICO DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* NO PATOGENICO AISLADO DE OSTIÓN AMERICANO (*CRASSOSTREA VIRGINICA*) COLECTADO DE LA LAGUNA GRANDE DE MANDINGA, Y ALMACENADO A 7° C. VERACRUZ, MÉXICO, 2013\*‡**

*molyticus tlh+* de  $1.134 \log_{10}$  NMP/g y el gen patológico *trh+* de  $0.477 \log_{10}$  NMP/g. A los tres días de almacenamiento, la densidad media de *V. parahaemolyticus tlh+* se incrementó significativamente a  $2.764 \log_{10}$  NMP/g y se detectaron densidades de genes patológicos *tdh+*, *tdh-/trh+* y *tdh+/trh+* en  $0.519 \log_{10}$  NMP/g, respectivamente, y *tdh+/orf8+* en  $-0.444 \log_{10}$  NMP/g. Al día seis de almacenamiento, la densidad de *V. parahaemolyticus tlh+* disminuyó significativamente a  $0.785 \log_{10}$  NMP/g y no se detectó la presencia de genes patológicos ( $-0.824 \log_{10}$  NMP/g). Al día nueve de almacenamiento, no se

detectó la presencia de *V. parahaemolyticus tlh+* ni de cepas potencialmente patológicas.

## Discusión

La amplificación de los genes no patológicos *tlh+*, patológicos *tdh+* y *trh+* y potencialmente pandémico *orf8+* de *V. parahaemolyticus* aislados de ostiones almacenados a 7 °C representa un problema de salud debido al riesgo potencial por el consumo de ostión crudo en la región.



\* (A) PCR *tdh/trh*. Carril 1: blanco (sin ADN); Carril 2: marcador de ADN (100 pb); Carriles 3 y 4: muestras *tdh* positivas; Carril 8: muestra *tdh/trh* positivas; Carriles 5-7: muestras negativas; Carril 9: control negativo (*V.vulnificus* CAIM 610); Carril 10: control positivo (*V.parahaemolyticus* CAIM 1772). (B) PCR *orf8*. Carril 1: blanco (sin ADN); Carril 5: muestra *orf8* positiva; Carriles 2-4, 6-10, 12-15: muestras negativas; Carril 11: marcador de ADN (100 pb); Carril 16: control negativo (*V.vulnificus* CAIM 610); Carriles 17 y 18: controles positivos (*V.parahaemolyticus* CAIM 1400)

‡ Los números de la derecha 269, 500 y 369 pb indican el tamaño de los productos de amplificación correspondientes a los fragmentos internos de los genes *tdh*, *trh* y *orf8*, respectivamente

**FIGURA 3. PERFILES ELECTROFORÉTICOS DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS PATOGENICO AISLADO DE OSTIÓN AMERICANO (CRASSOSTREA VIRGINICA) COLECTADO DE LA LAGUNA GRANDE DE MANDINGA, Y ALMACENADO A 7 °C.\*‡ VERACRUZ, MÉXICO, 2013**

**Cuadro II**  
**VARIACIÓN DE LA DENSIDAD PROMEDIO (LOG<sub>10</sub> NMP/G) DE V. PARAHAEMOLYTICUS TOTAL (TLH<sup>+</sup>) Y PATOGENICO (TDH<sup>+</sup>, TRH<sup>+</sup>, TDH<sup>+</sup>/TRH<sup>+</sup> Y TDH<sup>+</sup>/ORF8<sup>+</sup>) EN EL OSTIÓN AMERICANO COSECHADO EN LOS MESES ENERO-MARZO DE 2013 DE LOS BANCOS EN LA LAGUNA GRANDE DEL SISTEMA LAGUNAR MANDINGA Y ALMACENADO A 7 °C. VERACRUZ, MÉXICO, 2013**

Tiempo de almacenamiento (días)	Densidad (media y rango del log <sub>10</sub> NMP/g)				
	<i>tlh</i> <sup>+</sup>	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>-</sup>	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>trh</i> <sup>+</sup>	<i>tdh</i> <sup>+</sup> / <i>orf8</i> <sup>+</sup>
0	1.134* (0.792-1.322)	-0.824 <sup>#</sup>	0.477* (-0.824-0.477)	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>
3	2.764‡ (1.806-3.041)	0.519* (0.477-0.556)	0.519* (0.477-0.556)	0.519* (0.477-0.556)	-0.444* (-0.824-0.444)
6	0.785§ (-0.824-0.785)	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>
9	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>	-0.824 <sup>#</sup>

\*‡§# Medias con diferentes literales son estadísticamente diferentes (p<0.05) a través del tiempo para cada gen

Las densidades detectadas de *V. parahaemolyticus* *tlh+* y *trh+* al inicio del almacenamiento (tiempo 0) (1.133 y 0.477 log<sub>10</sub> NMP/g) fueron similares a las reportadas en la época de invierno por Flores y colaboradores<sup>28</sup> en 2012 en la misma zona de extracción y estación del año, con densidades de *V. parahaemolyticus* *tlh+*, *tdh+* y *orf8+* de 1.477, 1.197 y 0.773 log<sub>10</sub> NMP/g, respectivamente. El aislamiento de *V. parahaemolyticus* en dos años consecutivos indica que la bacteria es endémica en el SLM. Se ha reportado que las densidades totales y patogénicas de *V. parahaemolyticus* en el ambiente son significativamente más altas en primavera y en verano que en invierno.<sup>35</sup> Las densidades patogénicas de *V. parahaemolyticus* *trh+* detectadas durante el invierno sugieren que estas cepas son tolerantes a las bajas temperaturas y su ocurrencia en el ostión es probablemente debido a que la temperatura del agua en el SLM en invierno (25.7 °C) es adecuada para el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, considerando que la temperatura mínima de crecimiento de la especie es 5 °C.<sup>36</sup> Los vibrios de interés clínico son aislados con menor frecuencia cuando la temperatura de los ambientes acuáticos es menor de 10 °C.<sup>6</sup> La producción de estos factores de virulencia está regulada fuertemente por la temperatura, por lo que son inducidos cuando la temperatura del agua es >20 °C,<sup>37</sup> como se presenta regularmente a lo largo del año en las aguas tropicales.<sup>28</sup> Deepanjali y colaboradores<sup>23</sup> observaron que la temperatura del agua en las regiones costeras tropicales de India (25-35 °C) fue siempre óptima para el crecimiento de *V. parahaemolyticus* en los ostiones.

Como se aprecia en el cuadro II, a los tres días de almacenamiento, la densidad de *V. parahaemolyticus* *tlh+* y *trh+* se incrementó y se detectaron los genes *tdh+*, *tdh+/trh+* y *tdh+/orf8+*, los cuales no fueron detectados al inicio del almacenamiento. Estos resultados indican que la presencia de los genes patogénicos después de un descenso en la temperatura desempeña un papel en la adaptación para crecer a bajas temperaturas. Wu<sup>38</sup> reportó que las cepas de *V. parahaemolyticus* en el ostión almacenado a 5 °C durante 10 días sobrevivieron pero no crecieron, mientras que a 8 °C las cepas sobrevivieron y crecieron. Otro estudio demostró que, si la temperatura del agua del área de cosecha era >20 °C, la densidad media era mayor, observándose un descenso significativo (0.8 log UFC/g) de *V. parahaemolyticus* en el ostión naturalmente contaminado después de 14 días a 3 °C.<sup>39</sup> Los estudios de Burnham y colaboradores<sup>40</sup> indican que la sensibilidad al estrés por frío depende principalmente de la temperatura, la cepa y la duración del almacenamiento.

Los escasos estudios realizados a la fecha sugieren que *V. parahaemolyticus* exhibe respuestas fisiológicas complejas a una reducción abrupta en la temperatura, que involucran un patrón de expresión génica denomi-

nado *respuesta al shock* o *estrés por frío*, y que involucra la inducción de proteínas de shock por frío y proteínas de acondicionamiento al frío. Esta respuesta incrementa la sobrevivencia a bajas temperaturas mediante un proceso dependiente de la translación.<sup>27,41</sup> Yang y colaboradores<sup>27</sup> reportaron la sobreexpresión de cinco genes (VP2536, VP0446, VP0372, VP3048 y VP2536) que codifican hemolisinas en *V. parahaemolyticus* aunque no observaron cambios transcripcionales en las hemolisinas TLH y TDH, por lo que los resultados del presente estudio indican que la ocurrencia de los genes patogénicos detectados en el día 3 a 7 °C involucra cambios en la expresión génica como una respuesta al estrés por frío, lo que contribuye a la virulencia y sobrevivencia de *V. parahaemolyticus*. Estos resultados son preocupantes, especialmente si se considera el extendido uso de bajas temperaturas para almacenar y conservar los ostiones y otros mariscos.

Al día seis del almacenamiento solamente se detectó la ocurrencia de *V. parahaemolyticus* *tlh+* y al día nueve no se detectó crecimiento de ninguna cepa, lo cual podría indicar un efecto represor catabólico de la temperatura sobre el crecimiento de *V. parahaemolyticus*. Las razones pueden ser la muerte celular, o bien, que al descender la temperatura en el ostión, las células de *V. parahaemolyticus* entraron en un estado viable pero no cultivable (VBNC); la habilidad de producir hemolisinas no se ve afectada por el estado VBNC, por lo que, cuando las condiciones vuelvan a ser las adecuadas como al interior de un huésped, pueden manifestar nuevamente su virulencia.<sup>42</sup> Mizunoe y colaboradores<sup>43</sup> observaron que células de *V. parahaemolyticus* sometidas a 4 °C alcanzaron el estado VNBC en 12 días y señalaron que no se puede depender de la temperatura de refrigeración para destruir microorganismos, aun bajo la temperatura adecuada. En este contexto, la habilidad de *V. parahaemolyticus* para crecer a 7 °C, la presencia de genes patogénicos y la resistencia al frío de las células VBNC deben llamar la atención del riesgo que *V. parahaemolyticus* representa para la industria ostrícola.

La norma oficial NOM-242-SSA1-2009<sup>33</sup> establece que el límite máximo de *V. parahaemolyticus* en los moluscos bivalvos debe ser 10<sup>4</sup> NMP/g de muestra. Incluso cuando las densidades de *V. parahaemolyticus* *tlh+* detectadas en los ostiones cumplen con la regulación, la presencia de cepas potencialmente patogénicas representa un riesgo a la salud pública y, más aún, no están consideradas en la regulación. Por ende, el uso de las densidades totales de *V. parahaemolyticus* como un indicador de contaminación es incierto, especialmente para detectar la posibilidad de un incremento en la virulencia y estimar el riesgo del crecimiento postcosecha.

Por lo anterior, los resultados de este estudio son alarmantes debido a que las especies patogénicas deben

estar ausentes en el ostión para que éste se considere apto para su consumo. Cabe señalar que la presencia de *V. parahaemolyticus* patogénico es suficiente para poder generar afectaciones importantes a la salud humana debido al cuadro clínico que desencadenan y al crecimiento exponencial en el huésped. La variedad patogénica de *V. parahaemolyticus* orf8+, gen que codifica una proteína de adherencia que incrementa la habilidad del patógeno para adherirse a las células intestinales o la superficie del plancton,<sup>44,45</sup> ha sido relacionada con el serotipo pandémico más infeccioso, el O3:K6, lo que implicaría un alto riesgo de un brote de la enfermedad como ya ha sucedido en otras regiones del mundo.<sup>36</sup>

## Conclusiones

Durante el almacenamiento refrigerado a 7 °C se observó un incremento de las densidades de *V. parahaemolyticus* no patogénico desde el inicio hasta el día 6 de almacenamiento y la detección de densidades patogénicas en el tercer día, lo que indica que estas cepas podrían estar mejor adaptadas a las bajas temperaturas. Los presentes resultados indican que la refrigeración por sí misma no limita el crecimiento de este patógeno y que existen diferentes comportamientos en respuesta al frío específicos de las cepas de *V. parahaemolyticus*, los cuales varían en su habilidad para sobrevivir y crecer bajo esta temperatura de refrigeración. Esto impacta en la inocuidad del alimento.

Aun cuando las densidades totales de *V. parahaemolyticus* en los ostiones cumplieron con las regulaciones mexicanas, la presencia de las cepas patogénicas representa un problema de salud pública, especialmente porque no están incluidas en la regulación vigente, por lo que ambas deberían ser monitoreadas.

Debido a que sólo una pequeña proporción del ostión en el mercado mexicano es actualmente sujeta a cualquier proceso postcosecha, es necesario modificar los métodos de conservación para limitar el crecimiento de *V. parahaemolyticus* en los ostiones que aseguren su inocuidad. Más aún, a pesar de su percepción nutritiva y saludable, el ostión está clasificado como un alimento de alto riesgo a nivel mundial, por lo que la vigilancia de *V. parahaemolyticus* en los moluscos bivalvos es crucial para generar datos más confiables para estimar riesgos, comprender mejor los cambios en el riesgo por el consumo de este tipo de alimento y para proteger la salud pública.

## Agradecimientos

El presente trabajo se realizó en el marco del programa del Conacyt de Apoyos Complementarios para la Con-

solidación Institucional de Grupos de Investigación, modalidad de Retención, con número de expediente 173957. Los autores agradecen al Dr. Leonardo Lizárraga-Partida y al grupo VibrioMex por proveer los controles CAIM 1772, CAIM 1400 y CAIM 610, necesarios para la realización de las pruebas moleculares.

*Declaración de conflicto de intereses.* Los autores declararon no tener conflicto de intereses.

## Referencias

1. Turner JF, Malayil L, Guadagnoli D, Cole D, Lipp EK. Detection of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* with respect to seasonal fluctuations in temperature and plankton abundance. *Environ Microbiol* 2014;16:1019-1028.
2. Martínez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Varela-Pet J, Trinanés J, Pazos Y, García-Martin O. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain. *Appl Environ Microb* 2008;74:265-274.
3. Pal D, Das N. Isolation, identifications and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fish samples in Kolkata. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010;14:545-549.
4. Velázquez-Roman J, León-Sicairos N, Flores-Villaseñor H, Villafañá-Rauda S, Canizalez-Román A. Association of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 present in the coastal environment of Northwest Mexico with cases of recurrent diarrhea between 2004 and 2010. *Appl Environ Microb* 2012;78(6):1794-1803.
5. Heitmann I, Jofré L, Hormázabal JC, Olea A, Vallebuona C, Valdés C. Revisión y recomendaciones para el manejo de diarrea por *Vibrio parahaemolyticus*. *Rev Chil Infect* 2005;22(2):131-140.
6. Igbinosa EO, Okoh A. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. *Res Microbiol* 2008;159:495-506.
7. Matsuda S, Kodama T, Okada N, Okayama K, Honda T, Andlida T. Association of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin with lipid rafts is essential for cytotoxicity but not hemolytic activity. *Infect Immun* 2010;78:603-610.
8. Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tlh*, *tdh* and *trh*. *J Microbiol Methods* 1999;36:215-225.
9. Zhang XH, Austin B. Haemolysins in *Vibrio* species. *J Appl Microbiol* 2005;98:1011-1019.
10. Nordstrom JL, Vickery MCL, Blackstone GM, Murray SL, DePaola A. Development of a multiplex real-time PCR assay with an internal amplification control for the detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oysters. *Appl Environ Microb* 2007;73:5840-5847.
11. Su Y, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol* 2007;24:549-558.
12. Martínez-Urtaza J, Lozano-Leon A, Varela-Pet J, Trianes J, Pazos Y, García-Martin O. Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the Rias of Galicia, Spain. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:265-274.
13. Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M, Iwanaga M, Garg P, Rammamurthy T, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and *toxRS* sequence analyses. *J Clin Microbiol* 2000;38:578-585.
14. Myers ML, Panicker G, Bej AK. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico. *Appl Environ Microb* 2003;69:2194-2200.

15. Cabanillas-Beltrán H, Llausás-Magaña E, Romero R, Espinoza A, García-Gasca A, Nishibuchi M, et al. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiol Lett* 2006;265:76-80.
16. Ma C, Deng X, Ke C, He D, Liang Z, Li W, et al. Epidemiology and etiology characteristics of foodborne outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus* during 2008–2010 in Guangdong province, China. *Foodborne Pathog Dis* 2014;11:21-29.
17. Bhuiyan NA, Ansaruzzaman M, Kamruzzaman M, Alam K, Chowdhury NR, Nishibuchi M, et al. Prevalence of the Pandemic Genotype of *Vibrio parahaemolyticus* in Dhaka, Bangladesh, and Significance of Its Distribution across Different Serotypes. *J Clin Microbiol* 2002;40:284-286.
18. Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, Chowdhury A, Yatsuyanagi J, Ohtomo Y, et al. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in seafood and the coastal environment in Japan. *Appl Environ Microb* 2003;69:3883-3891.
19. Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Dutta B, Takeda Y, Sack DA. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:39-48.
20. Quilici ML, Robert-Pillot A, Picart J, Fournier JM. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1148-1149.
21. Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Canonico C, Potenziani S, Santarelli S, et al. *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. *Diagn Microb Infect Dis* 2010;66:452-455.
22. Cabello C, Espejo R, Hernandez MC, Riosco ML, Ulloa J, Vergara JA. *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 epidemic diarrhea, Chile, 2005. *Emerg Infect Dis* 2007;13(4):655-656.
23. Deepanjali A, Sanath KH, Karunasagar I, Karunasagar I. Seasonal variation in abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* bacteria in oyster along the Southwest Coast of India. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:3575-3580.
24. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (Conapesca). [sitio de internet] Anuario Estadístico de Acuicultura y Pesca de 2013. [consultado el 28 de septiembre de 2014] Disponible en: <http://www.conapesca.sagarpa.gob.mx/>
25. Andrew LS. Strategies to control *Vibriosis* in molluscan shellfish. *Food Prot Trends* 2004;24:70-76.
26. Secretaría de Salud (SSA) [sitio en internet]. Gobierno de México. NOM-242-SSA1-2009. 2012 [consultado el 17 de junio de 2014]. Disponible en: <http://dof.gob.mx/>
27. Yang L, Zhou D, Liu X, Han H, Zhan L, Guo Z, et al. Cold-induced gene expression profiles of *Vibrio parahaemolyticus*: a time-course analysis. *FEMS Microbiol Lett* 2009;291:50-58.
28. Flores-Primo A, Pardío-Sedas V, Lizárraga-Partida L, López-Hernández K, Uscanga-Serrano R, Flores-Hernández R. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolated from American oyster harvested in the Mandinga Lagoon System, Veracruz, Mexico: Implications for food safety. *J Food Protect* 2014;77(7):1069-1077.
29. Secretaría de Economía (SE), Gobierno de México [sitio en internet]. NMX-FF-001-SCFI-2009 [consultado en 2014] Disponible en: <http://www.economia.gob.mx/>
30. Contreras-Espinosa F, Castañeda O. Las lagunas costeras y estuarios del Golfo de México: Hacia el establecimiento de índices ecológicos. En: Caso M, Pisanty I, Ezcurra E, comps. Diagnóstico Ambiental del Golfo de México. México: SEMARNAT/INE/INECOL/HARP Institute, 2004:628.
31. Comisión Nacional del Agua (Conagua) [sitio en internet]. Reporte del clima en México. Reporte Anual 2012. [consultado en 2013] Disponible en: <http://www.conagua.gob.mx/>
32. Secretaría de Salud (SSa) [sitio en internet]. Gobierno de México. NOM-109-SSA1-1994. 2012 [consultado el 17 de junio de 2014]. Disponible en: <http://portal.salud.gob.mx>.
33. Secretaría de Salud (SSa) [sitio en internet]. Gobierno de México. NOM-242-SSA1-2009. 2012 [consultado el 17 de junio de 2014]. Disponible en: <http://dof.gob.mx/>
34. United States Department of Agriculture (USDA). Most Probable Number Procedure and Tables. MLG Appendix 2.05. Athens (GA): Laboratory Quality Assurance Staff (LQAS), 2014, junio 29.
35. Duan J, Su Y. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in two Oregon oyster-growing bays. *J Food Sci* 2005;70(1):M58-M63.
36. Ceccarelli D, Hasan NA, Huq A, Colwell RR. Distribution and dynamics of epidemic and pandemic *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors. *Front Cell Infect Microbiol* 2013;3:1-9.
37. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Rev Microbiol* 2007;5:355-362.
38. Wu C. Cold adaption behaviors of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (tesis). Louisiana (EE.UU.): Louisiana State University, 2007.
39. Gooch JA, DePaola A, Bowers J, Marshall DL. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *J Food Protect* 2002;65(6):970-974.
40. Burnham VE, Janes ME, Jakus LA, Supan J, DePaola A, Bell J. Growth and survival differences of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains during cold storage. *J Food Sci* 2009;74(6):M314-M318.
41. Lin C, Yu RC, Chou CC. Susceptibility of *Vibrio parahaemolyticus* to various environmental stresses after cold shock treatment. *Int J Food Microbiol* 2004;92:207-215.
42. Johnston MD, Brown MH. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *J Appl Microbiol* 2002;92:1066-1077.
43. Mizunoe Y, Wai SN, Ishikawa T, Takada A, Yoshida S. Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiol Lett* 2000;186(1):115-120.
44. Nasu H, Iida T, Sugahara T, Yamaichi Y, Park KS, Yokoyama K, et al. A filamentous phage associated with recent pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains. *J Clin Microbiol* 2000;38:2156-2161.
45. Chao G, Jiao X, Zhou X, Yang Z, Huang J, Pan Z, et al. Serodiversity, pandemic O3:K6 clone, molecular typing and antibiotic susceptibility of foodborne and clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates in Jiangsu, China. *Foodborne Pathog Dis* 2009;6:1021-1028.