

Método para la detección y cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* en el proceso de camarón

Cabanillas-Mata I.J.¹, López Álvarez E.E.¹, Ávila-Quezada G.², Paredes-Aguilar M.C.¹, Martínez Borraz A.¹, Noriega - Orozco L.¹

¹ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carr. Al Varadero Nacional km 6.6, Col. Las Playitas, Guaymas, CP 85480 Sonora, México. ² Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Chihuahua, 31000, México. Autor de correspondencia: Lnoriega@ciad.mx

Palabras Clave; mariscos, congelado, inocuidad, contaminación, NMP-PCR

Introducción

Las enfermedades transmitidas por alimentos asociadas a bacterias patógenas son un problema creciente a nivel mundial. Como muchos otros alimentos, los pescados y mariscos están asociados a la mayoría de las bacterias patógenas comunes, pero también a todas aquellas que se encuentran de forma natural en los ambientes marinos, como *Vibrio parahaemolyticus* [1]. El camarón es uno de los productos marinos más importantes en términos de valor comercial y que además muestra un patrón de consumo creciente a nivel mundial. Por otro lado, *V. parahaemolyticus* es el principal agente causal de enfermedades gastrointestinales asociadas al consumo de mariscos [2]. La detección de este patógeno durante el proceso antes de llegar al consumidor es importante para garantizar la inocuidad del producto y el cumplimiento de normatividad nacional e internacional. Actualmente, la mayor parte de los criterios sanitarios para productos marinos incluyen la detección y cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus*. Misma que varía para la parte comestible de los crustáceos frescos, refrigerados o congelados desde 100 NMP/g en Europa a 1×10^4 MPN/g en EE.UU. y México.

La importancia del desarrollo de métodos confiables y rápidos para detectar y cuantificar patógenos en alimentos que ayuden a garantizar la inocuidad del producto es indiscutible. Los métodos tradicionales dependientes de cultivo requieren de mucho tiempo para la identificación. Pues, normalmente necesitan etapas de enriquecimiento y aislamiento de colonias antes de llegar a la identificación bioquímica y serológica de la bacteria. Todo este proceso, en el caso de *V. parahaemolyticus* y otros patógenos, puede llegar a durar hasta dos semanas. En términos de tiempo, éstos métodos no siempre son adecuados para la industria procesadora de alimentos. El uso de metodologías independientes de cultivo como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación bacteriana es común en laboratorios de investigación. También, han sido incluidas, por algunos países como opción en los métodos oficiales para la identificación de colonias previamente asiladas, como en el caso de especies patógenas de *Vibrio* [3]. Actualmente, el uso de PCR en tiempo real (qPCR) para detectar y cuantificar patógenos es una opción muy precisa [2], pero que requiere de equipo muy costoso y no es una opción real para análisis de rutina en la industria pesquera. Por otro lado, los métodos basados en la amplificación del ADN por PCR de punto final combinados con una etapa de enriquecimiento, son más sensibles, específicos y rápidos que las metodologías tradicionales de cultivo, por lo que pueden ser una opción para los análisis de rutina para la industria de productos marinos.

La metodología del número más probable (NMP) [3,4] ha sido ampliamente utilizada para la cuantificación de bacterias patógenas en alimentos, agua y muestras ambientales [1]. Además, puede detectar tanto niveles altos como muy bajos de bacterias viables. Teóricamente, los métodos cualitativos tradicionales y dependientes de cultivo, se puede volver cuantitativos al combinarlos con el método del NMP. Este combinado con PCR se ha reportado para la cuantificación de algunas especies de *Vibrio*, partiendo de la extracción de DNA de un cultivo puro y fresco de TSA (agar soya tripticasa) o crecimiento en APW (agua peptonada alcalina) para la identificación, [1,5], sin referencia a la efectividad del método o su límite de detección. Por lo tanto, el principal objetivo de este trabajo fue establecer y probar en muestras de camarón, agua y ambiente de proceso, una metodología basada en NMP-PCR que le permita a la industria

camaronera la identificación y cuantificación de *V. parahaemolyticus* de forma rápida y eficiente que lo ayude a mantener la inocuidad del producto y cumplir con la normatividad nacional e internacional.

Metodología

El método analítico propuesto para la identificación y cuantificación de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón, agua y superficies de proceso se basó en el número más probable (NMP) descrito en el BAM (Bacteriological Analytical Manual) [4], y PCR. Se estandarizaron las condiciones de PCR, se determinaron los límites de detección para matrices de camarón y búfer con y sin enriquecimiento, y finalmente se probó en muestras colectadas en diferentes etapas del proceso de camarón congelado. Se utilizó como control positivo *V. parahaemolyticus* (CAIM 320), y *Escherichia coli* (ATCC 95922) como control negativo.

Identificación por PCR: La solución de trabajo para la identificación por PCR utilizó células bacterianas completas, tomando 20 µL de crecimiento bacteriano en agua peptonada alcalina (APW), se mezclaron con 50 µL de agua estéril. Para la identificación de *V. parahaemolyticus* se utilizó el par de primer Vptl-450F: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG y Vptl-450R: GCTACTTTCTAGCATTCTCTGC, que amplifican un segmento del gen de la hemolisina termolábil (*tl*) de 450 pb [6]. Para la PCR se utilizó un volumen de reacción de 50 µL, conteniendo en cada tubo de reacción (concentración final) 1X búfer para PCR (Flexi buffer PROMEGA), 1.75 mM de MgCl₂ (PROMEGA), 0.2 mM de cada uno de los dNTP's (PROMEGA), 0.04 U Taq polimerasa (PROMEGA) y 2 pM de cada primer (Vptl 450F y Vptl 450R) (PROMEGA), adicionándose 10 µL de templado y el resto de agua destilada estéril. La amplificación de *V. parahaemolyticus* se realizó de acuerdo a las condiciones reportadas por Leon-Robles y colaboradores [1]. Los fragmentos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (30 min, 100V) y SYBR Safe como colorante.

Límite de detección para matriz de búfer y músculo de camarón: por triplicado, se realizaron diluciones seriadas a partir de una solución ajustada a 0.5 McFarland con (1.5×10^8 UFC/mL de *V. parahaemolyticus*) para obtener diluciones desde 1.5×10^6 a 0.0015 UFC/mL en búfer de fosfatos y búfer de fosfatos salino estériles. Para el caso de la matriz de camarón, 25 g de músculo de camarón fueron homogenizados en 225 mL de APW y esterilizados (121°C/15 min), a partir de este homogenizado estéril se prepararon diluciones seriadas. Se inocularon series de tres tubos con APW para ambas matrices y se incubaron a 35°C por 24 horas. Simultáneamente, se utilizó un mL de cada dilución para el recuento en placa de células viables en agar tripticosa soya (TSA) e incubaron bajo las mismas condiciones, además de analizarse por PCR cada dilución de manera directa sin enriquecimiento. Posterior a la incubación, una alícuota de cada tubo (con o sin crecimiento) fue analizada por PCR bajo las condiciones antes descritas.

Análisis de muestras del proceso de camarón: Se colectaron 24 muestras de diferentes puntos del proceso de camarón congelado: 15 de camarón, 3 agua de lavado y 6 de superficies inertes. Las muestras de superficie fueron colectadas por la técnica de hisopo en 100cm² [7]. A su arribo al laboratorio fueron analizadas como se describió anteriormente utilizando 25 g o 25 mL, considerando seis diluciones seriadas. La cuantificación se realizó por la técnica de NMP [4]. Adicionalmente las muestras fueron analizadas de acuerdo al Manual Analítico Bacteriológico (BAM), utilizando TCBS (Agar Tiosulfato citrato bilis sacarosa) para la selección de colonias.

Resultados y Discusión

Las condiciones de reacción y el límite de detección para una reacción de PCR puede verse influenciado por diferentes factores tales como: matriz de muestra, método de extracción del ADN, primers, condiciones de PCR, presencia de inhibidores, entre otros factores. Los resultados de la estandarización de la PCR se muestran en la Figura 1, donde se observa una banda de 450 pb. Esta banda se observó en la cepa control y en todas las muestras positivas. Las condiciones de prueba se establecieron para dos matrices diferentes:

tejido de camarón para muestras de producto y búfer para muestras de agua y superficies de contacto de procesamiento.

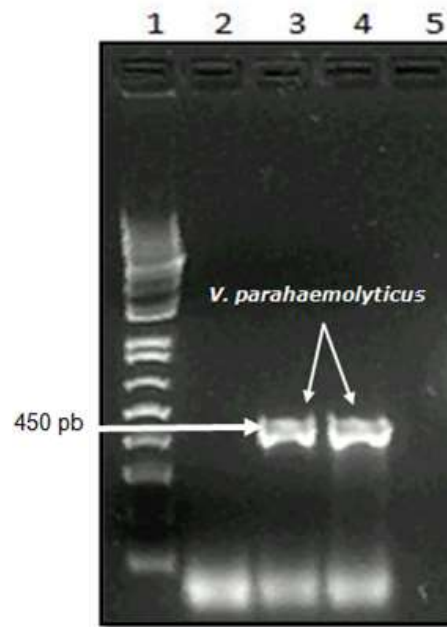


Figura 1: Identificación de *V. parahaemolyticus* por PCR, donde líneas: 1) Marcador (1Kb); 2) Control negativo *E. coli* ATCC 95922; 3) *V. parahaemolyticus* CAIM 320; 4) *V. parahaemolyticus* de camarón y 5) blanco.

El uso de solución de búfer para determinar el límite de detección de bacterias viables fue para simular las condiciones de muestras de agua y superficies de contacto, por recolectarse esta última en este medio. Mientras que el homogenizado de músculo de camarón, para la matriz de músculo de camarón. La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos, observándose que el enriquecimiento de la muestra en APW, aumenta la sensibilidad del método y disminuye en tres órdenes el límite de detección. Esto indica que la etapa de enriquecimiento es necesaria para lograr una mayor y adecuada sensibilidad por el método propuesto de NMP-PCR. Además, se observó el mismo nivel de detección para ambas matrices (camarón y búfer), por lo que la matriz de camarón no afecta la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y se pueden utilizar las mismas condiciones para el análisis de producto, agua y superficies de contacto. Con el método propuesto de NMP-PCR se logró detectar una concentración mínima de 1.5 bacterias viables de *V. parahaemolyticus*/g o mL. Otros autores han reportado la detección por PCR de entre 1 y 2.5 UFC/mL partiendo de cultivos puros de esta bacteria [8].

El método propuesto en este estudio, puede identificar y cuantificar los niveles de *V. parahaemolyticus* si al menos 1.5 bacterias de *V. parahaemolyticus* por g o mL están presentes en el agua, superficies inertes de proceso o en el tejido de camarón, para poder ser detectadas por PCR y cuantificadas por el NMP. Por lo tanto, la combinación de métodos moleculares y dependientes del cultivo (MPN-PCR) puede usarse para determinar y cuantificar bacterias viables en camarones, agua y muestras de superficies de contacto directo. Por otro lado, una de las principales ventajas de la técnica propuesta, combinando técnicas dependientes de cultivo y moleculares, es que permite optimizar recursos y tiempo. El método propuesto puede obtener resultados en 30 horas o menos, con lo que se estima una reducción de aproximadamente el 80% del tiempo, e incluso disminución en los costos (datos no mostrados).

Tabla 1. Células viables de *V. parahaemolyticus*, inoculadas en búfer o matriz de músculo de camarón y detectadas por PCR antes y después del enriquecimiento en agua peptonada alcalina (APW) [banda característica (+); ausencia de banda (-)].

Número de bacterias viables /mL	Resultado PCR sin enriquecimiento en APW	Resultado PCR con enriquecimiento en APW	
	Búfer	Buffer (n=3)	Shrimp (n=)
1.5 x 10 ⁶	(+)	(+)	(+)
1.5 x 10 ⁵	(+)	(+)	(+)
15 000	(+)	(+)	(+)
1 500	(+)	(+)	(+)
150	(-)	(+)	(+)
15	(-)	(+)	(+)
1.5	(-)	(+)	(+)
0.15	(-)	(-)	(-)
0.015	(-)	(-)	(-)
0.0015	(-)	(-)	(-)
Límite Detección	1500	1.5	1.5

Los resultados de las muestras analizadas para *V. parahaemolyticus* por el método propuesto, así como los obtenidos por el método tradicional de cultivo se observan en la Tabla 2. Ninguna de las muestras analizadas dio positiva al analizarla por el método tradicional de cultivo, pues no se detectó ninguna colonia típica o ninguna de las colonias típicas seleccionadas pudo ser identificada por pruebas bioquímicas como *V. parahamolyticus*. Mientras que casi el 80% de las muestras resultaron positivas y pudieron ser cuantificadas para *V. parahamolyticus*, al utilizar el método propuesto de NMP-PCR. Las muestras de agua de lavado y músculo de camarón fueron las que presentaron los valores más altos de esta bacteria, sin sobrepasar los establecidos como máximos por la normatividad mexicana. Las muestras de camarón variaron a lo largo del proceso siendo más bajas las encontradas en el producto final (datos no mostrados), posiblemente por efecto de la congelación, proceso que daña la pared celular de las células bacterianas, que dejan de estar viables y no pueden ser detectadas por este método.

Tabla 2. Muestras positivas y niveles detectados de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón, superficies de contacto y agua de lavado del proceso de camarón congelado por el método NMP-PCR y comparativo con el método tradicional de acuerdo al Manual Analítico Bacteriológico.

Tipo de Muestra	Muestras Analizadas	Muestras positivas (MPN-PCR)	NMP de <i>V. parahaemolyticus</i> / g o mL	Muestras positivas (Método Tradicional)
Camarón	15	14	9.2 – 4300	0
Superficie	6	2	3 – 150	0
Agua	3	3	23 – 1100	0
Total	24	19	---	0

Conclusiones

El límite de detección para la cuantificación de *V. parahaemolyticus* (1.5 UFC/g o mL) fue más sensible al utilizar enriquecimiento en APW, por lo que se incorporó al método NMP-PCR para búfer y músculo de camarón

El método NMP-PCR fue más eficiente para la detección de *V. parahaemolyticus* en muestras de camarón, agua y superficies de contacto que el método tradicional.

El uso de NMP-PCR para la identificación y cuantificación de *V. parahaemolyticus* permite optimizar tiempo y costos, en comparación con la técnica tradicional.

La combinación de NMP y PCR propicia la detección de células viables de *V. parahaemolyticus* y se puede asociar a la inocuidad del producto. Esto es importante pues la detección de bacterias no viables por métodos moleculares no necesariamente representa un riesgo para la salud del consumidor.

Ninguna de las muestras de camarón sobrepasó los límites permitidos de *V. parahaemolyticus* para la parte comestible de crustáceos fresco refrigerados, siendo más bajas en producto terminado por efecto del procesamiento.

Referencias

1. León Robles, A.; Acedo Félix, E.; Gomez-Gil, B.; Quiñones Ramírez, E.I.; Nevárez-Martínez, M.; Noriega-Orozco, L. (2013) Relationship of aquatic environmental factors with the abundance of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal area of Guaymas, Sonora, Mexico. *J. Water Health* **11**(4):700-712.
2. Geng, Y., Tan, K., Liu, L. Sun X.X., Zhao B., Wang J. (13 Agosto, 2019). Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *BMC Microbiol [online]* Vol 19 artículo # 186 <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1562-z>
3. Kaysner, C.A.; DePaola, A. (16 diciembre 2019) BAM Chapter 9: Vibrio [Online]: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070830.htm> Consultado Junio 10, 2021.
4. Blodgett, R. (10 Sept 2020). BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions [online]: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm> Consultado Junio, 05, 2021.
5. Boonyawantang, A.; Mahakarnchanakul, W.; Rachtanapun, C.; Boonsupthip, W. (2012) Behavior of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in prawn in response to temperature in laboratory and factory. *Food Control* **26**(2): 479–485, doi:10.1016/j.foodcont.2012.02.009.
6. Bej, A.K.; Patterson, D.P.; Brasher, C.W.; Vickery, M.C.; 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*. *J. Microbiol. Methods* **36**(3): 215–225.
7. Evancho, G.M.; Sveum, W.H.; Moberg, L.J.; Frank, J.F. (2001) Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*; Downes, F.P., Ito, K., Eds.; 25–36 American Public Health Association: Washington, D.C. ISBN 087553-175-x.
8. Chen, M.; Guo, D.; Wong, H.-C.; Zhang, X.; Liu, F.; Chen, H.; Chen, M.; Liu, B.; Wang, L.; Wu, F.; Feng, L. (2012). Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int. J. Food Microbiol.* **159**(2):122–9, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.012.