

PRESENCIA DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* EN MASA DE OSTIÓN COMERCIALIZADA EN LOCALIDADES AL SURESTE DE CUBA

Yarenis Martínez-Alfonso* y Ma. Isabel Lantero-Abreu

Instituto de Farmacia y Alimento (IFAL), Universidad de La Habana. Ave. 23 No. 21425, La Habana, Cuba.

E-mail: yarenismar@gmail.com

Recibido: 23-10-2018 / Revisado: 15-11-2018 / Aceptado: 10-12-2018 / Publicado: 07-01-2019

RESUMEN

Se evaluó la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en la masa de ostión comercializada en localidades del sureste de Cuba. Las zonas de recolección seleccionadas fueron nombradas A, B y C. Los muestreos realizados en marzo, abril y mayo de 2017 consistieron en agua, masa de ostión en su concha, masa refrigerada y congelada. Se emplearon dos métodos de ensayo: cualitativo (presencia/ausencia) y semicuantitativo (número más probable (NMP)), seguido de la confirmación mediante pruebas bioquímicas seleccionadas. Los resultados mostraron relación entre la baja salinidad del agua a 25 ups (unidades prácticas de salinidad) y mayor concentración de *Vibrio parahaemolyticus* total. Se destaca la masa de ostión refrigerada con el número total de *Vibrio parahemolyticus* de hasta 10² NMP/g. No obstante, este valor no supera la dosis infectiva por ración de ostión servido, se hace necesario velar por la calidad higiénica del producto con vistas a minimizar el riesgo potencial de gastroenteritis.

Palabras clave: ostión, *Vibrio parahemolyticus*, NMP, salinidad, riesgo, gastroenteritis.

ABSTRACT

Presence of *Vibrio parahaemolyticus* in the oyster mass commercialized in localities of southeastern Cuba

The presence of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster mass, commercialized in localities of southeastern Cuba was evaluated. The selected harvest areas were named as A, B and C. Samples were taken in March, April and May of 2017 from water; oyster mass in its shell; and; refrigerated and frozen oyster mass. Two detection test methods were used: qualitative (presence/absence); and semi-quantitative (most probable number (MPN), followed by confirmation through selected biochemical tests. The results showed a relationship between low water salinity (25 practical salinity units); and a higher concentration of total *Vibrio parahaemolyticus*. The chilled oyster mass was found with total number of *Vibrio parahaemolyticus* levels of up to 10² MPN/g. Although this value does not exceed the infection dose of oysters served, it is necessary to ensure the hygiene quality and safety of this product to minimize the potential risk of gastroenteritis.

Keywords: oyster, *Vibrio parahaemolyticus*, MPN, salinity, risk, gastroenteritis.

INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos son reconocidos como alimentos de alto riesgo, principalmente, porque se alimentan por filtración, se encuentran en contacto con el fondo (lodos), y se consumen fundamentalmente crudos. El mecanismo de alimentación favorece la concentración y multiplicación de microorganismos en el intestino y su acumulación en el tejido de estos organismos (1). La exposición a peligros autóctonos del medio acuático de donde provienen, influye en el aseguramiento de la inocuidad del producto final de consumo.

***Yarenis Martínez-Alfonso:** Licenciada en Ciencias Alimentarias (IFAL). Ha trabajado durante ocho años en laboratorios de microbiología de alimentos. Su línea principal de investigación es la evaluación de riesgo microbiológico en alimentos.

Las enfermedades transmitidas por consumo de productos pesqueros, fundamentalmente se relacionan con especies de *Vibrio* (2). En particular, *Vibrio parahaemolyticus* (*Vp*), ampliamente distribuido en ambientes marinos, puede alcanzar concentraciones en el ostión que afectan la salud humana, sobre todo, cuando la temperatura en el proceso post-recolección no es controlada adecuadamente, por lo que puede llegar a poblaciones con diferente susceptibilidad y patrones de consumo.

Las cepas de *Vp* pueden ser patógenas o no. Diferentes rasgos de virulencia han sido asociados a cepas patógenas de *Vp* como causa de enfermedad. Estas incluyen principalmente la habilidad para producir la hemolisina termoestable directa (TDH, en inglés) y TDH-hemolisina relacionada, TRH (TRH, en inglés) (1), aunque, diversos autores plantean en sus estudios que la citotoxicidad y enterotoxicidad de *Vp* patógeno no solo son explicados por estas hemolisinas, lo que sugiere la presencia de otros factores de virulencia que pudieran estar causando la patogenicidad (3).

La gastroenteritis causada por consumo de alimentos contaminados con esta especie es usualmente una enfermedad que se manifiesta con severidad moderada, autolimitada y corta duración, y en raras ocasiones pudiera evolucionar a septicemia o muerte (4).

El ostión es considerado uno de los alimentos de origen marino con propiedades nutritivas bien valoradas. En Cuba, en determinadas regiones se comercializa con gran aceptación el *coctel de ostión*, equivalente a la masa de ostión cruda en salmuera, servido con picante, salsa de puré de tomate y limón.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en la masa de ostión comercializada en localidades del sureste de Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las zonas seleccionadas para la recolección de ostión nombradas A, B y C, se ubican en la costa sur de la región más al este de Cuba. El estudio se desarrolló durante los meses de marzo, abril y mayo de 2017. Se analizaron muestras de agua de la zona de recolección (n=5), masa de ostión en su concha (n=5), masa de ostión refrigerada (n=21) y congelada (n=21).

Se midió la salinidad del agua en cada zona de pesca con un refractómetro óptico de mano ATAGO, modelo S/Mill-E (EQL-01959), y se expresó en unidades prácticas de salinidad (ups).

El aislamiento e identificación de *Vp* se realizó mediante la aplicación de dos métodos en paralelo: cualitativo (presencia/ausencia) (5) y semicuantitativo de número más probable (NMP) (6).

En ambos métodos se utilizó el medio sólido selectivo Agar TCBS (tiosulfato, citrato, bilis y sacarosa). Las colonias con características morfológicas típicas de *Vp* (ATCC 17802) y positivas a la prueba de oxidasa, fueron confirmadas con ensayos bioquímicos disponibles en el laboratorio y orientados en la norma: fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa, L-lisina, arginina, ornitina, crecimiento en agua de peptona (0, 6, 8 y 10 % NaCl), motilidad, indol, y actividad hemolítica en medio Agar Sangre. Los ensayos microbiológicos se realizaron en el laboratorio de microbiología de alimentos del Centro de Investigaciones Pesqueras.

El resultado en el análisis cualitativo se expresó en términos de presencia o ausencia de *Vp* en 25 g o 25 mL de la muestra de ensayo. Los valores de NMP fueron analizados y expresados como NMP de *Vp* total por g de ostión (7).

La prevalencia de cepas positivas de *Vp* total (patógeno y no), se expresó en porcentaje por tipo de muestra (agua y masa de ostión).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Tabla 1 refleja la presencia y concentración de *Vp* por tipo de muestra, así como la salinidad del agua por zona de recolección. La salinidad del agua en las zonas de estudio y en los momentos de muestreo fue de 25, 35 y 43 ups (unidades prácticas de salinidad) respectivamente. El ostión en su concha y el agua de la zona de muestreo, mostraron presencia de *Vp* en correspondencia con los bajos valores de salinidad reportados.

Se considera que en aguas tropicales la salinidad parece ser el factor de mayor influencia en la prevalencia de *Vp* (8), a diferencia de los climas templados, donde la temperatura guarda mayor relación en los meses de

Tabla 1. *Vibrio parahaemolyticus* total por tipo de muestra y salinidad del agua por zona de recolección

Zona de muestreo	Agua		Masa de ostión en su concha	Masa de ostión refrigerada	Masa de ostión congelada
	Salinidad (ups)	P/A <i>Vp</i> 25 mL	NMP <i>Vp</i> total/g (Log ₁₀ NMP <i>Vp</i> total/g)		
			P/A en 25 g		
A (Marzo- Abril- Mayo)	25	NR	3 (0,477)	150 (2,176)	44 (1,643)
			A	P	P
		P	350 (2,544)	640 (2,806)	210 (2,322)
			P	P	P
B (Abril)	43	P	27 (1,431)	290 (2,462)	27 (1,431)
			P	P	P
		A	3 (0,477)	150 (2,176)	19 (1,279)
			A	P	A
C (Mayo)	35	A	3 (0,477)	11 (1,041)	15 (1,176)
			A	A	A

NR: No realizado. P: Presencia. A: Ausencia. NMP: Número Más Probable.

verano fundamentalmente. En climas templados, la mayor abundancia de *Vp* tiene lugar en el verano, cuando se alcanzan temperaturas sobre los 25 °C (9).

La ausencia de *Vp* en masa de ostión congelada y en su concha puede ser explicada por bajas densidades del microorganismo y que además se encuentre en un estado viable pero no cultivable, no siendo posible su detección por el método de ensayo cualitativo empleado. En este sentido, la sensibilidad del método de NMP para recuperar bajos niveles poblacionales del microorganismo en el alimento es generalmente mejor que los métodos por conteo (7).

La presencia reportada en la masa de ostión refrigerada de la zona B pudiera responder a la posibilidad de *Vp* de sobrevivir y crecer a bajas temperaturas. Un estudio sobre crecimiento y sobrevivencia de *Vp* en ostión almacenado en refrigeración indicó la adaptación del mismo para crecer y desarrollar genes patogénicos a bajas temperaturas (7 °C) (10). Otros

autores, reportan sobrevivencia sin crecimiento en ostiones almacenado a 5 °C por 10 días, mientras que a 8 °C sobreviven y crecen (11).

Datos ambientales y epidemiológicos indican que cuando la salinidad supera 35 ups coinciden bajas concentraciones de *Vp* y se presentan pocos casos de enfermedades relacionados con el consumo de moluscos bivalvos (2).

En este estudio coinciden concentraciones elevadas de *Vp* en muestras de ostión, con bajos valores de salinidad en 25 ups, particularmente en la zona A. Mientras, en las zonas consideradas con salinidad elevada (≥ 35 ups) como las zonas B y C, se obtuvieron bajas concentraciones (Fig. 1).

Las muestras de masa de ostión refrigerada representaron las mayores concentraciones de *Vp* total en el orden de 10²/g.

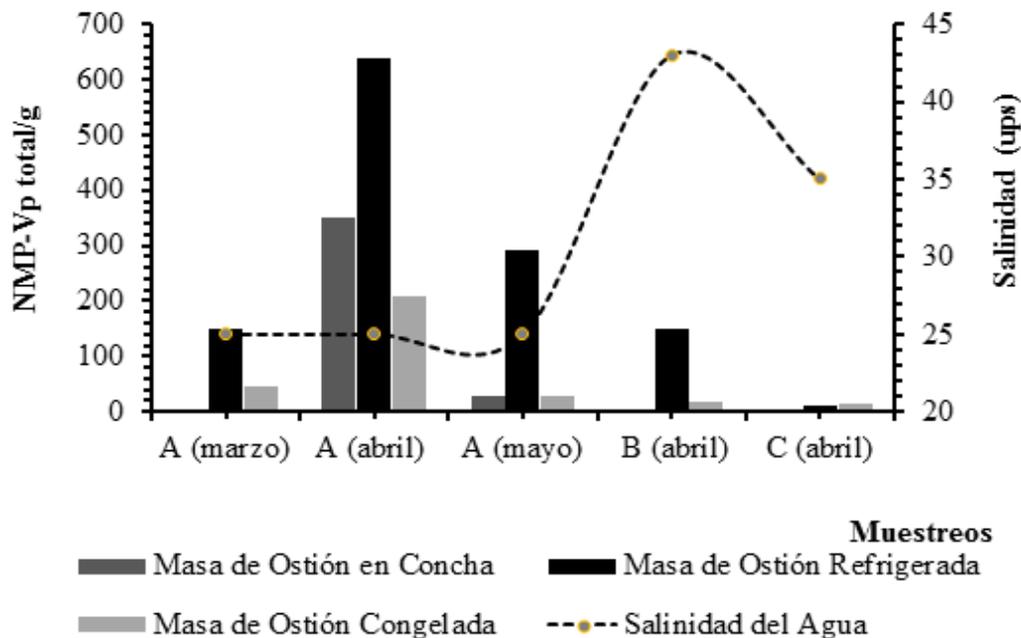


Fig.1. Concentración de *Vibrio parahaemolyticus* y salinidad del agua en las zonas de recolección según el muestreo y tipo de producto.

La ración de ostión considerada de 50 g, permite estimar una dosis ingerida de *Vp* de hasta $3,2 \times 10^4$ (masa de ostión refrigerada) y $1,1 \times 10^4$ (masa de ostión congelada), siempre que no ocurran grandes abusos durante el mantenimiento de la cadena de frío.

Aunque este valor no supera la dosis infectiva del microorganismo (10^5 a 10^7) (12), el método de conservación en refrigeración convierte el producto en un riesgo potencial debido a la adaptabilidad del organismo a bajas temperaturas. Se ha documentado que, en muestras almacenadas en refrigeración a diferentes temperaturas, *Vp* manifiesta cambios fisiológicos en respuesta al denominado «shock o estrés por frío», el cual involucra la inducción de proteínas de acondicionamiento a bajas temperaturas, lo que favorece la sobrevivencia y la ocurrencia de genes de virulencia (*tdh* y *trh*) que fueron detectados en este estudio (10).

En general, se evidencia que por el método cualitativo no fue posible la detección de *Vp* total a concentraciones por debajo o igual a 19 NMP/g, mientras 27 NMP/g fue el valor mínimo a partir del cual se detectó. Cercano a este resultado se encuentra la definición realizada

en el Programa Nacional de Saneamiento de Moluscos (NSSP), sobre los niveles no detectables de patógenos como *Vp*, en menos de 30 NMP/g (13).

Es posible plantear que, de las tres regiones en estudio, la zona A tiene las condiciones más favorables para el crecimiento del microorganismo en cuestión, por tanto, constituye la región de mayor riesgo para la explotación de ostión, al contrario, de las zonas B y C que pueden ser consideradas áreas de menor riesgo.

La Tabla 2 presenta la prevalencia de *Vp* total (patogénicos y no) con respecto a las cepas presuntivas aisladas de agua y masa de ostión. Se destacan porcentajes elevados de prevalencia en las muestras de masa de ostión refrigerada y congelada destinada al consumo, y en particular las provenientes de la zona A (Tabla 2).

La prevalencia podría ser algo menor en países con climas fríos en comparación con climas tropicales. Se destacan países como Noruega, Canadá, e Italia de climas fríos con bajos porcentajes de prevalencia en comparación con Brasil y México de características mayormente cálidas (14, 4). Los países con aislamientos

Tabla 2. Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* total en agua y masa de ostión

Muestras	No. cepas + <i>Vp.</i> /total cepas presuntivas (%)					Por tipo de muestra
	Marzo	Abril	Mayo	Abril	Mayo	
	A			B		C
Agua	NR	2/6 (33)	6/6 (100) 4AS β+	0/0 (0)	0/1 (0)	8/13 (62) 4AS β+
Masa de ostión en su concha	2/10 (20) 1AS β+	11/18 (61) 8AS β+	11/14 (79) 10AS β+	1/11 (9) 1AS β+	1/3 (33) 1AS β+	26/56 (46) 21AS β+
Masa de ostión refrigerada	5/15 (33) 3AS β+	11/13 (85) 8AS β+	14/15 (93) 12AS β+	7/12 (58) 1AS β+	3/15 (20) 3AS β+	40/70 (57) 27AS β+
Masa de ostión congelada	9/15 (60) 8AS β+	12/19 (63) 8AS β+	7/12 (58) 6AS β+	6/11 (55) 2AS β+	4/6 (67) 3AS β+	38/63 (60) 27AS β+

AS: Agar Sangre. Elaborado por la autora a partir de los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos.

de cepas (equivalente a la presencia de hemolisina, TDH) en estos estudios, mostraron bajos porcentajes < 1 % en las muestras de alimentos.

Para el propósito de este estudio, aquellas cepas que presentaron β-hemólisis en medio Agar Sangre se consideraron como una alerta en cuanto a la potencial patogenicidad que representa *Vp* y por lo tanto un llamado a la mejora de la inocuidad del alimento y protección a la salud del consumidor.

En general, diversos factores pudieran determinar la estabilidad de *Vp* en un área específica, que incluye interacciones con las condiciones ambientales, el metabolismo del ostión y las características genéticas del microorganismo (*I*).

Las temperaturas cálidas del agua, la salinidad durante la recolección, el efecto tiempo/temperatura de traslado en la post-recolección, procesamiento y conservación durante la cadena, influyen en la prevalencia de *Vp* y, por lo tanto, en la calidad sanitaria del producto final de consumo.

REFERENCIAS

1. Food and Drug Administration (FDA). Quantitative Risk Assessment on the Public Health Impact of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Raw Oysters. Center for Food Safety and Applied Nutrition. Food and Drug Administration U.S. Department of Health and Human Services 2005. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Food/.../UCM196914.pdf>.

CONCLUSIONES

La salinidad del agua reportada en la zona A con 25 ups, se corresponde con mayores concentraciones de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de ostión, contrario a las bajas concentraciones obtenidas en las muestras provenientes de las zonas B y C con salinidades ≥ 35 ups. Las muestras de masa de ostión refrigerada representaron las mayores concentraciones de *V. parahaemolyticus* total en el orden de 10²/g. La dosis ingerida estimada fue de hasta 10⁴ organismos *V. parahaemolyticus* total/g en la masa de ostión refrigerada y congelada, valor que no supera la dosis infectiva; sin embargo, *V. parahemolyticus* no deja de representar un riesgo potencial de gastroenteritis y un problema de salud pública. La zona A tiene las condiciones ambientales más favorables para el crecimiento de *V. parahaemolyticus*, por tanto, constituye la región de mayor riesgo para la explotación de ostión. Al contrario, las zonas B y C pueden ser consideradas áreas de menor riesgo.

2. Food Agriculture Organization (FAO). Directrices sobre la aplicación de los principios generales de higiene de los alimentos para el control de las especies patógenas de *Vibrio* en los alimentos de origen marino. CAC/GL73 2010. Disponible en: http://www.fao.org/input/download/standards/11565/CXG_73s.pdf.
3. Raghunath P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus*. *Front. Microbiol* 2015; 5(805):1-5. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302984/>. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00805.
4. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). Risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood: Interpretative Summary and Technical Report. Microbiological Risk Assessment 2011. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i2225e.pdf>.
5. ISO 21872-1. Horizontal method for the determination of *Vibrio* spp. — Detection of potentially enteropathogenic *Vibrioparahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. Norma Internacional de Referencia; 2017.
6. San-Cristóbal WS, Olea A, Cachicas CV, et al. Manual de Procedimiento: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Ministerio de Salud-Instituto de Salud de Chile; 2008. Disponible en: http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Vibrio_parahaemolyticus_2008.pdf.
7. Oblinger JL, Koburger JA. Understanding and Teaching the Most Probable Number Technique. En: Tore LB, Smith SC. BIO 207, Seafood microbiology, Compendium for laboratory course 2017. NIFES; 2017. pp. 115-20. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0022-2747-38.9.540?download=true>.
8. 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(7):3575-80. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1169033/>.
9. Bauer A, Østensvik Ø, Florvåg M, Ørmen Ø, Liv-Rørvik, M. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus* in Norwegian Blue Mussels (*Mytilus edulis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(4):3058–61. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/72/4/3058>.
10. 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 Pública de México* 2015; 57(3):211-18. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/spm/v57n3/v57n3a9.pdf>.
11. Chung-Ta Wu. Cold adaption behaviors of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in oysters [Master's Theses 101]. Louisiana State University; 2007. Disponible en: https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/101.
12. Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria (ACHIPIA), Área de Soporte al Análisis de Riesgo. Ficha de Peligros: *Vibrio parahaemolyticus*. Gobierno de Chile; 2017. No. 08, Versión 01. Disponible en: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-08-Vibrio-parah-v01.pdf>.
13. Departamento de Salud & Servicios Humanos de EE.UU. (DSSH). Orientación de controles y peligros de los productos pesqueros y piscícolas, 4ta ed. 2011. Disponible en: https://-eos.ucsf.edu/-EOS_Linked_Documents/-flsgp/-SGR_131_Spanish_FDA_Guide_web.pdf.
14. Lake R, Hudson A, Cressey P. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Institute of Environmental Science & Research Limited Christchurch Science Centre; 2003.