



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
BIOLOGÍA MARINA

“Presencia y Abundancia de Vibrios Toxigénicos en Ostiones del Género
Crassostrea Comercializados en Mazatlán, Sinaloa”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBT. LAURA ELENA MENDOZA JUÁREZ

TUTOR:

Dr. BRUNO GÓMEZ GIL RODRÍGUEZ SALA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL:

Dr. ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNIDAD MAZATLÁN)

Dr. MIROSLAV MACEK
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Dr. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ
INSTITUTO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Dra. ALEJANDRA GARCÍA GASCA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. MAYO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA
UNIDAD ACADÉMICA MAZATLÁN
BIOLOGÍA MARINA

“Presencia y Abundancia de Vibrios Toxigénicos en Ostiones del Género
Crassostrea Comercializados en Mazatlán, Sinaloa”.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

IBT. LAURA ELENA MENDOZA JUÁREZ

TUTOR:

Dr. BRUNO GÓMEZ GIL RODRÍGUEZ SALA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

COMITÉ TUTORAL:

Dr. ALBERTO ABREU GROBOIS
INSTITUTO DE CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA (UNIDAD MAZATLÁN)

Dr. MIROSLAV MACEK
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Dr. LUIS ÁNGEL MALDONADO MANJARREZ
INSTITUTO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

Dra. ALEJANDRA GARCÍA GASCA
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA

MÉXICO, D.F. MAYO 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Posgrado en Ciencias del Mar Unidad Mazatlán por brindarme la oportunidad de formar parte de tan prestigiada casa de estudios como lo es la UNAM.

Agradezco A CONACYT por la beca proporcionada, gracias a la cual pude llevar a cabo mis estudios de maestría.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, por darme la oportunidad de trabajar con él, por transmitirme sus conocimientos y mostrarse siempre accesible y sobre todo por su paciencia y apoyo en todo momento.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Alejandra García Gasca, por su valiosa colaboración, sus consejos y su apoyo en este trabajo.

Agradezco a los sinodales encargados de revisar y corregir esta tesis, Dr. Alberto Abreu, Dr. Miroslav Macek y Dr. Luis Ángel Maldonado Manjarrez. También agradezco al Dr. José Antoni Cruz Barraza por sus consejos y apoyo.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Quiero agradecer al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) Unidad Mazatlán por permitirme utilizar sus instalaciones de forma conveniente para desarrollar esta tesis. Y un agradecimiento especial a la técnico de laboratorio Carmen Bolán Mejía por su gran ayuda durante la etapa de laoratorio.

Agradezco al IBT Julio César Morán Ventura por compartir sus conocimientos de biología molecular y bioinformática; pero sobre todo por su amor, amistad y cariño, y por estar conmigo en los buenos y malos momentos.

Agradezco a mi padre por su amor incondicional, por brindarme la mejor educación posible, por su paciencia y su apoyo en esta y todas las etapas de mi vida.

A Carla Rodríguez por recibirme como parte de su familia y brindarme su apoyo y amistad.

También quiero agradecer a Abigail Lizárraga, Claudia Hernández, Gloria Ceballos, Elia Quintero y Miryam Urquidy, por su amistad incondicional y a Ruth Santana por recibirme siempre en su casa.

Por último agradezco a esas personas que a pesar de haberse marchado pronto dejaron en mí ese deseo de superación y esperanza, a mi madre y mi hermana, a quienes llevaré por siempre en mi corazón,

DEDICATORIA

Te dedico este trabajo papá, por ser el soporte de nuestra familia durante tantos años, y que a pesar de todo me has ayudado a sobreponerme, por no dejar que me derrumbe por tus enseñanzas y consejos, por tu apoyo en todo momento, tu infinita paciencia y perdón ante mis constantes errores. Sé que nunca podré expresarte la gratitud que siento por todo lo que haces por mí; te dedico este trabajo, que es también tuyo, con inmenso cariño y agradecimiento.

Gracias papá.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

DEDICATORIA

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

I.	RESUMEN.....	13
II.	ABSTRACT.....	14
III.	INTRODUCCIÒN.....	15
IV.	ANTECEDENTES	
	<i>Vibrio</i> como agente causal.....	17
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	18
	Prevalencia de <i>V. parahaemolyticus</i> en mariscos.....	19
	Antecedentes de brotes infecciosos.....	19
	Factores de virulencia.....	21
	<i>Vibrio vulnificus</i>	22
	Antecedentes de brotes infecciosos.....	23
	Factores de virulencia.....	23
	<i>Vibrio cholerae</i>	24
	Antecedentes de brotes infecciosos.....	24
	Factores de virulencia.....	26
	Análisis de riesgos microbiológicos.....	28
V.	HIPÓTESIS.....	33

VI. JUSTIFICACIÓN	34
VII. OBJETIVOS	35
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	
Área de estudio	36
Muestreo	37
Metodología del Conteo Total Cultivable.....	38
Procesamiento de la muestra.....	38
Análisis microbiológico mediante CTC	38
Presencia de <i>Vibrio cholerae</i>	39
Presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. cholerae</i>	39
Cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> y <i>V. cholerae</i>	40
Metodología del Número Más Probable	42
Enriquecimiento.....	42
Número Más Probable.....	43
Aislamiento de colonias toxigénicas.....	43
Análisis Molecular	44
Análisis de Riesgos Microbiológicos	48
IX. RESULTADOS	
Área de estudio	49
Muestreo	49
Conteo Total Cultivable	50
Número Más Probable	52
<i>Vibrio cholerae</i>	52

<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	52
<i>Vibrio vulnificus</i>	64
Presencia de Vibrios toxigénicos	72
Aislamiento de colonias toxigénicas.....	78
Análisis de Riesgos Microbiológicos	79
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	82
<i>Vibrio vulnificus</i>	84
X. DISCUSIONES	85
XI. CONCLUSIONES	90
XII. RECOMENDACIONES	93
XIII. BIBLIOGRAFÍA	94
XIV. ANEXO 1	102
XV. ANEXO 2	103
XVI. ANEXO 3	105
XVII. ANEXO 4	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos para realizar PCR	45
Tabla 2. Características de los primers utilizados	45
Tabla 3. Descripción de los genes utilizados en PCR	46
Tabla 4. Controles positivos utilizados en PCR	46
Tabla 5. Resultados del Conteo Total Cultivable.....	51
Tabla 6. Resultados de la encuesta realizada.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Mapa de la ciudad de Mazatlán con la ubicación de los distribuidores de ostiones muestreados	36
Fig. 2: Diagrama de flujo de la metodología de Conteo Total Cultivable	38
Fig. 3: Diagrama de flujo de la metodología del Número Más Probable.....	42
Fig. 4: Electroforesis de controles positivos.....	47
Fig. 5. Porcentaje de colonias amarillas y verdes.....	51
Fig. 6. Porcentaje de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	53
Fig. 7. Porcentaje de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en <i>C. gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	54
Fig. 8. Promedio semanal de <i>V. parahaemolyticus</i>	55
Fig. 9. Promedio y desviación estándar de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	56
Fig. 1. Promedio de <i>tlh+</i> / <i>tdh+</i> / <i>trh+</i> de acuerdo al proveedor.....	57
Fig. 11. Promedio de <i>tlh+</i> / <i>tdh+</i> / <i>trh-</i> de acuerdo al proveedor.....	58
Fig. 12. Promedio de <i>tlh+</i> / <i>tdh-</i> / <i>trh+</i> de acuerdo al proveedor.....	59
Fig. 13. <i>V. parahaemolyticus</i> de acuerdo al probable lugar de origen.....	62

Fig. 14. Promedio de <i>V. parahaemolyticus</i> de acuerdo al probable origen	63
Fig. 15. Porcentaje de <i>Vibrio vulnificus</i>	64
Fig. 16. Porcentaje de <i>Vibrio vulnificus</i> en <i>C. gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	65
Fig. 17. Promedio semanal de <i>V. vulnificus</i>	65
Fig. 18. Promedio y desviación estándar de <i>Vibrio vulnificus</i>	66
Fig. 19. Promedio de <i>vvha+</i> de acuerdo al proveedor.....	67
Fig. 20. <i>V. vulnificus</i> de acuerdo al probable lugar de origen	70
Fig. 21. Promedio de <i>V. vulnificus</i> de acuerdo al probable origen.....	71
Fig. 22. Porcentaje de Vibrios toxigénicos en <i>C. gigas</i> y <i>C. corteziensis</i>	72
Fig. 23. Promedio semanal de Vibrios toxigénicos.....	73
Fig. 24. Promedio y desviación estándar de Vibrios toxigénicos.....	74
Fig. 25. Promedio de Vibrios toxigénicos de acuerdo al proveedor	75
Fig. 26. Vibrios toxigénicos de acuerdo al probable lugar de origen	77
Fig. 27. <i>Vibrio vulnificus</i> aislado en crhomagar	78
Fig. 28. Porcentaje de compradores de ostión.....	79
Fig. 29. Enfermedades gastrointestinales	83

I. RESUMEN

Los moluscos bivalvos son importantes vehículos para la transmisión de vibrios toxigénicos como *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*, los cuales han estado implicados reiteradamente en brotes de enfermedades a nivel mundial. El consumo de estos mariscos generalmente es crudo lo que incrementa el riesgo de enfermar a causa de estos vibrios toxigénicos. La finalidad de este estudio fue estimar el riesgo al que se encuentra expuesta la población de Mazatlán al consumir ostiones crudos, principalmente *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas* provenientes de distribuidores localizados en el puerto. Se analizaron 77 muestras de ostión utilizando la metodología basada en Conteo Total Cultivable (CTC) y otra basada en el Número Más Probable (NMP). Utilizando el programa Risk Ranger, mediante datos obtenidos de una encuesta realizada a los dueños de las comercializadoras de ostiones y datos del Centro de Salud de Mazatlán, se estimó el riesgo al que está expuesta la población. No se encontró presencia de *Vibrio cholerae* en las muestras analizadas. El 60% de las muestras de ostión analizadas resultó positivo para *V. parahaemolyticus* toxigénico. Se estimaron 21,000 probables casos de enfermos por intoxicación con este vibrio. El 62% de las muestras analizadas resultó positivo para *Vibrio vulnificus* toxigénico, debido a que solo afecta a personas inmunocomprometidas y a que la mortalidad por este vibrio es de 50%, se estimaron 27 potenciales casos de enfermar por intoxicación de los cuales habría 13 decesos probables por intoxicación con *V. vulnificus* toxigénico al consumir ostiones crudos en Mazatlán, Sinaloa.

II. ABSTRACT

Molluscan bivalves are an important vehicle for the transmission of toxigenic vibrios such as *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus*, which have been implicated repeatedly in severe outbreaks worldwide. As they are generally eaten raw, the risk of illness is increased. The aim of this work was to estimate the risk to which the population of Mazatlan is exposed when consuming raw oysters, specially *Crassostrea corteziensis* and *Crassostrea gigas* from wholesalers in Mazatlan. 84 samples were analyzed by Total Cultivable Count and by Most Probable Number-PCR. With data obtained from a survey and from the Health office of Mazatlan, it was possible to estimate the risk to which the population is exposed with the Risk Ranger software. *Vibrio cholera* was not found in any of the samples analyzed by these methods. 60% of the oyster samples analyzed were positive for toxigenic *V. parahaemolyticus*. It was estimated that 21,000 probable cases of intoxication could be caused by *V. parahaemolyticus*. 62% of the samples analyzed were positive for *Vibrio vulnificus*, since it only affects immunocompromised persons and its mortality rate reaches to 50%, 27 probable cases of intoxication with this vibrio were estimated of which 13 cases fatal cases could occur as a result of the consumption of raw oysters in Mazatlan, Sinaloa.

III. INTRODUCCIÓN

Los vibrios son bacterias Gram-negativas cuyo hábitat natural son las aguas marinas, estuarinas y salobres.

La familia *Vibrionaceae* se encuentra ampliamente distribuida en ambientes costeros y estuarinos; algunas especies como *Vibrio parahaemolyticus* son comunes en animales acuáticos, especialmente invertebrados. Otras especies como *V. cholerae* son patógenas para los seres humanos; *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, llegan a causar enfermedades tanto a humanos como a animales acuáticos (Austin, 2009).

Los vibrios son transmitidos por alimentos, y están asociados al consumo de mariscos a nivel mundial (Austin, 2009). Los mariscos mal cocidos o crudos pueden ser importantes vehículos para la transmisión de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* toxigénicos; los cuales han estado implicados reiteradamente en brotes de enfermedades (Cavallo y Stabili, 2002).

Existe una relación cercana entre el consumo de mariscos crudos y la ocurrencia de infecciones humanas a nivel intestinal atribuidas a vibrios. Los moluscos son un vehículo de transmisión debido a que son organismos filtradores, lo que resulta en un aumento en la densidad de bacterias (Cavallo y Stabili, 2002).

En el puerto de Mazatlán se comercializan distintos tipos de mariscos, entre ellos los ostiones pertenecientes al género *Crassostrea*, principalmente el llamado ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*) y el ostión de piedra (*Crassostrea gigas*) (Españeira et al., 2010). El consumo de estos productos generalmente es crudo y puede llevarse a cabo en restaurantes o en puestos informales llamados carretas. Estos lugares recurren para abastecerse a comercializadores o depósitos de mariscos, de los cuales sólo algunos venden ostiones.

Se localizaron los depósitos en Mazatlán que se encargan de la distribución de ostiones de manera continua a los negocios informales; además, algunos restaurantes acuden directamente con los pescadores, y existen otros depósitos de mariscos que pueden surtir a los puestos informales pero sólo ocasionalmente.

Determinar la presencia y la abundancia de *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* toxigénicos en ostiones distribuidos en estos negocios es importante para contribuir a la estimación del riesgo que representa el consumo de estos moluscos en la población consumidora de Mazatlán.

IV. ANTECEDENTES

Vibrio como agente causal.

Las bacterias del género *Vibrio* habitan ecosistemas acuáticos marinos y estuarinos (Gopal *et al.*, 2005). Varias especies de *Vibrio* forman parte de la microbiota natural de peces y mariscos (Su y Liu, 2007). Entre las más de 20 especies de vibrios que se sabe están asociadas a enfermedades en humanos, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* son las más importantes (Su y Liu, 2007). Dependiendo de las especies involucradas, las manifestaciones clínicas son diferentes, pueden variar desde gastroenteritis a septicemia e infecciones por heridas. Muchos brotes de enfermedades asociadas al consumo de mariscos han sido reportados a nivel mundial (Gopal *et al.*, 2005).

La principal característica de este grupo de bacterias es su capacidad para producir una seria intoxicación alimentaria asociada con el consumo de pescados o mariscos crudos o mal cocidos que estén contaminados (Espiñeira *et al.*, 2010). Las especies de vibrios patogénicos representan una amenaza a la salud pública como agentes de infecciones humanas esporádicas y epidemias (Gopal *et al.*, 2005); por lo tanto representan un grupo microbiano importante en el ámbito de la seguridad y calidad alimentaria.

El envenenamiento asociado al consumo de mariscos contaminados con vibrios, y en particular con bivalvos crudos o mal cocidos, causa infección intestinal caracterizada por diarrea y calambres abdominales, y pueden estar acompañados por náuseas, vómitos, fiebre y dolores de cabeza severos (Espiñeira *et al.*, 2010).

Vibrio parahaemolyticus.

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria patogénica humana que se encuentra naturalmente en ambientes marinos y ha sido aislada frecuentemente en una variedad de mariscos incluyendo bacalao, sardina, caballa, lenguado, almeja, pulpo, camarones, cangrejo, langosta, vieira y ostras (Su y Liu, 2007).

El consumo de alimentos marinos crudos o mal cocidos, especialmente de mariscos contaminados con *V. parahaemolyticus* puede conducir al desarrollo de gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, dolor de cabeza, vómitos, náuseas, dolores abdominales y fiebre leve (Su y Liu, 2007).

Aunque la gastroenteritis causada por *V. parahaemolyticus* generalmente es limitada, la infección puede ocasionar septicemia que puede poner en riesgo la vida humana y tener implicaciones médicas como enfermedad hepática o desórdenes inmunes (Su y Liu, 2007).

La comprensión completa de los factores patogénicos que causan esta enfermedad no han sido aclarados, lo que sí está claro es que dos factores de virulencia han sido identificados: la hemolisina termoestable directa (TDH) y la hemolisina relacionada a TDH (TRH) (Rosec *et al.*, 2009).

Prevalencia de V. parahaemolyticus en mariscos.

El grado de contaminación por *V. parahaemolyticus* en mariscos crudos se encuentra relacionado con la temperatura del agua de mar (DePaola *et al.*, 2000). Estudios realizados han mostrado que el organismo raramente se detecta en el agua de mar hasta que esta alcanza los 15° C o más (DePaola *et al.*, 2000). Por lo tanto, es más probable detectar *V. parahaemolyticus* en ostiones cosechados en la primavera y el verano, cuando la temperatura superficial del agua es mayor a diferencia del invierno, cuando la temperatura del agua desciende. Aunque la densidad de *V. parahaemolyticus* en ostiones contaminados es usualmente menor de 10³ UFC/g al momento de la cosecha, puede exceder los 10³ UFC/g en ostiones cosechadas en aguas más cálidas y el organismo puede multiplicarse rápidamente en ostiones expuestos a temperaturas elevadas (DePaola *et al.*, 2000).

Antecedentes de brotes infecciosos.

Vibrio parahaemolyticus fue reconocido por primera vez como causa de enfermedades transmitidas por los alimentos en Osaka, Japón en 1951. Esta bacteria causó un brote infeccioso de 272 personas y 20 muertes asociadas al consumo de sardinas. En contraste con los países asiáticos, las infecciones por *V. parahaemolyticus* raramente han sido reportadas en los países europeos (Molero *et al.*, 1989). *V. parahaemolyticus* fue identificado por primera vez como un agente etiológico en Estados Unidos en 1971 después de tres brotes con 425 casos de gastroenteritis asociados al consumo de cangrejo mal cocido (Molenda *et al.*, 1972). Entre 1973 y 1998, se reportaron aproximadamente 40 brotes infecciosos de *V. parahaemolyticus* a los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) (Daniels *et al.*, 2000).

En el verano de 1997, 209 casos de infecciones por *V. parahaemolyticus* asociadas con el consumo de ostiones crudos ocurrieron en la región del Noroeste del Pacífico. En 1998, dos brotes ocurridos en Washington y Texas estuvieron asociados al consumo de ostiones crudos (DePaola *et al.*, 2000).

Catorce pasajeros a bordo de un crucero en Alaska desarrollaron gastroenteritis asociada a *V. parahamolyticus* después de comer ostiones crudos producidos en Alaska en el verano de 2004 (McLaughlin *et al.*, 2005). Más recientemente, un brote de *V. parahaemolyticus* reportando 177 casos ocurridos en el verano de 2006 fue vinculado a ostiones contaminados cosechados en Washington y Columbia Británica (Center for Disease Control, 2006). La aparición de estos brotes indica que la contaminación por *V. parahaemolyticus* en ostiones es un asunto de seguridad en Estados Unidos (Su y Liu, 2007).

Para el caso de México, el brote más reciente de *V. parahaemolyticus* se originó en camarones cosechados en Sinaloa, donde las aguas son cálidas (superiores a 15°C): un reciente estudio realizado por el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. y el Instituto Tecnológico de Tepic, estableció no haber detectado la presencia de este organismo sólo en Nayarit y Sinaloa (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006).

En el sur del estado de Sinaloa, han ocurrido casos esporádicos de diarrea por años durante el verano. Los síntomas de los pacientes se asemejan a los causados por infección con *Vibrio parahaemolyticus*. A finales de Septiembre y principios de Octubre de 2003, menos de 100 casos de diarrea fueron reportados en instalaciones clínicas locales de Mazatlán y El Rosario en esta área. En el mismo periodo en 2004 más de 1220 casos fueron reportados en el área circundante y probablemente más en otros estados donde se comercializan productos acuáticos (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006).

Factores de Virulencia.

Es sabido que la mayoría de las cepas de *V. parahaemolyticus* aislados del medio ambiente o de los mariscos no son patogénicas (Nishibuchi y Kaper, 1995). Las cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* son diferenciadas de las cepas ambientales por su habilidad de producir una hemolisina termoestable directa (TDH), una enzima que puede ocasionar la lisis de los glóbulos rojos en cajas petri con agar Wagatsuma. La actividad hemolítica de TDH, llamada fenómeno de Kanagawa, se ha reportado que está asociada comúnmente con las cepas aisladas de humanos con gastroenteritis, pero rara vez se ha podido aislar del medio ambiente; por esta razón TDH es considerada como uno de los factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* más importantes (Joseph *et al.*, 1982).

A pesar de que las investigaciones epidemiológicas revelaron una fuerte conexión entre el fenómeno de Kanagawa (KP) y la patogenicidad de *V. parahaemolyticus*, las cepas de KP-negativo que no producen TDH, sino hemolisina relacionada a TDH (TRH) han sido aisladas de pacientes enfermos (Honda *et al.*, 1987). Shirai *et al* (1990) examinaron 215 cepas clínicas de *V. parahaemolyticus* aisladas de pacientes con diarrea por la presencia de genes que codifican TDH (*tdh*) y TRH (*trh*) y encontraron que 52 cepas (24.3%) contenían solamente el gen *trh*. Estos resultados indican que TRH es también un factor de virulencia de *V. parahaemolyticus* (Kaper *et al.*, 1984).

Vibrio vulnificus.

La primera descripción del clado designado como *Vibrio vulnificus* fue publicada por Bauman y colaboradores; en un estudio taxonómico de bacterias marinas, De forma subsecuente en 1976 Reichelt y colaboradores realizaron estudios de hibridación ADN-ADN, los resultados mostraron que este clado era una especie diferente que fue llamada entonces *Beneckeia vulnifica*. El nombre actual, *Vibrio vulnificus* fue revivido por Farmer en 1980 para describir un grupo de cepas de *Vibrio* que eran fenotípica y genotípicamente distintas a otras especies de *Vibrio*. Estos organismos se encuentran comúnmente en aguas marinas y estuarinas, y pueden ser aisladas de un amplio rango de condiciones salinas y de temperatura en ostiones, almejas, mejillones y pescados, así como sedimentos y plancton. (Aznar *et al.*, 1994).

Vibrio vulnificus es capaz de causar infecciones severas y a menudo fatales en individuos susceptibles (Harwood *et al.*, 2004). De acuerdo a una revisión reciente, esta bacteria halófila gram-negativa fue aislada por primera vez por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) en Estados Unidos en 1964 y fue confundida al principio con *V. parahaemolyticus* (Strom y Paranjpye, 2000). *V. vulnificus* causa dos tipos de síndromes de enfermedad distintos, septicemia primaria e infección necrotizante por heridas (Blake *et al.*, 1979). Es la principal causa de mortalidad relacionada a alimentos que se ha reportado en el estado de Florida (Jackson *et al.*, 1997). Las enfermedades causadas por *V. vulnificus* se encuentran entre las más severas de todas las infecciones por ingesta de alimentos ya que la tasa de mortalidad por septicemia primaria causada por *V. vulnificus* ha sido reportada como mayor a 50% y la muerte puede ocurrir un día o dos después del comienzo de los síntomas (Harwood *et al.*, 2004).

La mayoría de las personas sanas no corren el riesgo de una infección por *Vibrio vulnificus*. Las personas que están en alto riesgo de contraer una infección incluyen a aquellas con enfermedades al hígado, incluyendo hepatitis, cirrosis y cáncer del hígado; hemocromatosis (enfermedad en la cual el metabolismo del hierro no se lleva a cabo adecuadamente ocasionando una acumulación excesiva del mismo), diabetes mellitus; y aquellas con deficiencias inmunológicas, tales como VIH/SIDA, cáncer, o que están bajo tratamiento médico. Las personas que están bajo medicamento para reducir el nivel de ácido en el estómago o han pasado por cirugía gástrica también están en riesgo (Interstate Shellfish Sanitation Conference, 2007).

Antecedentes de Brotes Infecciosos.

En individuos sanos, *V. vulnificus* puede causar gastroenteritis o infecciones en heridas severas resultando en celulitis necrotizante. Las infecciones por *V. vulnificus* a menudo conducen a septicemia, especialmente en individuos inmuno-comprometidos (Jones y Oliver, 2009).

Vibrio vulnificus es la causa principal de muertes por consumo de mariscos en los Estados Unidos, con aproximadamente 40 casos cada año (Bross *et al.*, 2007). También se han reportado brotes de *V. vulnificus* en Europa y Asia (Lewis *et al.*, 2005).

Factores de Virulencia.

La virulencia de *V. vulnificus* es considerada multifacética y no está bien entendida, ya que se han reportado muchos factores de virulencia para este organismo, incluyendo, una cápsula de polisacáridos, varias enzimas extracelulares, exotoxinas y la habilidad de obtener hierro por transferencia (Gulig *et al.*, 2005).

La exotoxina hemolisina-citolisina, producida por *V. vulnificus*, es el marcador de virulencia más estudiado y es codificada por un gen denominado *vvha* (también

conocido como *cth* o *hha*) (Jackson *et al.*, 1997). La hemolisina-citolisina es una enzima termolábil que lisa los eritrocitos de mamíferos y es citotóxico para una variedad de líneas celulares de tejidos de mamíferos en cultivo (Drake *et al.*, 2007).

Vibrio cholerae.

El cólera es una importante enfermedad entérica, la cual es endémica de diferentes regiones del mundo, e históricamente ha sido causa de pandemias severas. *Vibrio cholerae* es un habitante natural de los ambientes acuáticos, principalmente sistemas estuarinos, y es la causa principal de epidemias de diarreas que amenazan la vida humana (Gubala, 2005).

V. cholerae es un patógeno humano ampliamente estudiado que ha causado epidemias de cólera en el mundo entero y sigue estando presente en muchos países en vías de desarrollo (Gubala, 2005). *Vibrio cholerae* representa un riesgo a la salud pública cuando es ingerido en aguas no tratadas, mariscos crudos o mal cocidos que estén contaminados, o por la exposición de heridas en la piel al agua contaminada. *Vibrio cholerae* es un habitante microbiano autóctono de aguas salobres, ecosistemas estuarinos y áreas costeras; las cepas pueden permanecer en estado cultivable en los ambientes marinos por años (Castañeda *et al.*, 2005).

Antecedentes de brotes infecciosos.

Aunque existen registros de una enfermedad parecida al cólera desde los tiempos de Hipócrates y Buda, e incluso antes (Reidl y Klose, 2002); la historia moderna del cólera comenzó en 1817. En ese tiempo un brote epidémico fue reportado en India,

el cual se expandió posteriormente a lo largo del continente y fue definido como el primer brote pandémico de la enfermedad del cólera en el sureste de Asia.

Cuando la segunda epidemia de cólera llegó a Inglaterra en 1854, el Dr. John Snow demostró cómo los casos de cólera que surgían en un distrito central de Londres podían ser rastreadas a una única fuente de agua potable contaminada; mediante un mapa de las incidencias de la enfermedad pudo demostrar que más de 500 casos ocurridos en 10 días en un radio de 250 yardas se encontraban en el centro de Londres, y que las personas afectadas bebieron agua suministrada por la bomba de Broad Street. Por el método de eliminación John Snow demostró su hipótesis, la cual sostenía que la enfermedad se propagaba al beber en el agua un agente patógeno presente en las excreciones de los enfermos, generando así un círculo infeccioso. (Environmental Health Science Center, 2004).

Durante el siglo XIX sucedieron seis pandemias de cólera, finalizaron en 1923 y afectaron ambos hemisferios (DePaola y Hwang, 1995). En 1961, la séptima pandemia comenzó en Indonesia, después se esparció al subcontinente Indio y el Medio Oriente, migró a África en 1970 y finalmente alcanzó América del Sur a principios de 1990 (Reidl y Klose, 2002). En 1991 la enfermedad se propagó rápidamente en América Latina, que había estado libre de la enfermedad durante más de un siglo, causando casi 400 000 casos notificados y más de 4000 defunciones en 16 países de las Américas durante ese año (Organización Mundial de la Salud, 2014).

El cólera causado por *V. cholerae* toxigénico reapareció en Perú en enero de 1991 y desde entonces se esparció a otros países de América Latina. A partir del 10 de junio de 1993, alrededor de 800 000 casos y 7000 muertes en el hemisferio occidental fueron reportadas a la Organización de Salud Panamericana. En julio de 1991 la cepa

latino americana de *V. cholerae* fue aislada a partir de ostiones y contenido intestinal de pescados durante una investigación de ecología de vibrios (Gubala, 2005). Estos hallazgos condujeron a investigaciones posteriores más intensas de las fuentes potenciales de *V. cholerae* y su prevalencia en mariscos y otros alimentos marinos (DePaola y Hwang, 1995).

En México, el cólera se presentó por primera vez en 1833, siguiendo dos caminos: Nueva Orleans – La Habana – Yucatán y Nueva Orleans – Texas – Coahuila; y resurgió en 1991 como parte de la séptima pandemia, arrojando un total de 2,690 casos, con una tasa de 3.1 por 100 habitantes; durante el segundo año se presentaron 8,162 casos, lo que significó un incremento del 303% con respecto al año anterior; la tasa de incidencia en 1992 fue de 9.4 por cada 100 habitantes (Kumate *et al.*, 1993).

Hasta el 26 de agosto de 1995, se habían reportado 9,105 casos acumulados en el año; el porcentaje de casos de personas hospitalizadas disminuyó, entre 1993 y 1995, de 86% a 45%, lo que significa que más de la mitad de los casos se diagnosticaron en el domicilio del enfermo (Jiménez-Corona *et al.*, 1995).

En 1991 se reportaron 34 defunciones en todo el país, lo que representó una tasa de mortalidad de 0.04; en 1992 las defunciones reportadas fueron 99, con una tasa de mortalidad de 0.11; para 1993 se reportaron 198 defunciones y una tasa de mortalidad de 0.22, y para 1994 se notificaron 56 defunciones, con una tasa de mortalidad de 0.06. Todas estas tasas son por cada 100 habitantes (Secretaría de Salud, 1995).

Factores de Virulencia.

V. cholerae puede ser dividido en dos grupos principales: cepas de los serogrupos O1 y O139 causantes de cólera, y las cepas no-O1, no-O139 que no están

asociadas al cólera (Non Cholera Vibrios) (NCVs). Éstas últimas existen como parte de la microbiota bacteriana normal de las aguas estuarinas y costeras, y han sido consideradas como insignificantes por un largo tiempo (Ottaviani *et al.*, 2009). Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que las NCVs pueden causar casos esporádicos o brotes ocasionales de diarrea en humanos, septicemia aguda e infecciones en la piel mediante la ingestión de mariscos o la exposición a ambientes acuáticos (Blake *et al.*, 1980).

Un amplio número de factores de virulencia han sido asociados a las NCVs; incluyendo principalmente la toxina del cólera (CT) (Ottaviani *et al.*, 2009).

Las cepas patogénicas y epidémicas de *V. cholerae* contienen dos elementos genéticos esenciales, el elemento CTX y la isla de patogenicidad de vibrio (VPI), los cuales están implicados en la codificación de la toxina del cólera (CTX) y el pilus co-regulado por toxina (TCP), respectivamente (Waldor y Mekalanos, 1994).

Análisis de riesgos microbiológicos.

La Comisión Mixta FAO/OMS del Codex Alimentarius (CCA) ha desarrollado en el transcurso de los últimos 10 años el sistema de análisis de riesgos. Desde el Acuerdo sobre la Aplicación de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias (SFS) de la Ronda de Uruguay de negociaciones comerciales, que entró en vigor en 1995, ha crecido la importancia de los análisis de riesgos.

El análisis de riesgos es hoy considerado una parte integral de los procesos de decisión – elaboración del Codex. La CCA ha adoptado las definiciones de los conceptos del análisis de riesgos relacionados con la inocuidad de los alimentos y la declaración de principios respecto a la función de la evaluación de riesgos en materia de inocuidad de los alimentos. Además, en 1999, adoptó los Principios y Directrices para la Evaluación de Riesgos Microbiológicos (CCA, 1999).

La evaluación de riesgos es uno de los componentes del análisis de riesgos, que puede definirse como una estrategia global para el tratamiento de riesgos e incluye también la gestión de riesgos y la comunicación de riesgos. La importancia de combinar estos tres elementos (la evaluación de riesgos, la gestión de riesgos y la comunicación de riesgos), está bien reconocida, pero se requiere también de cierta separación práctica. En relación con la evaluación de riesgos, esa separación asegura que las cuestiones se traten con transparencia y con criterios científicos. La CCA define la evaluación de riesgos como un proceso con bases científicas que consta de los siguientes cuatro pasos:

- a) Identificación del peligro.
- b) Caracterización del peligro.
- c) Evaluación de la exposición.

d) Caracterización del riesgo.

Primer paso: Identificación del peligro.

En el caso de agentes microbianos, el objeto del análisis es identificar los microorganismos o toxinas microbianas de interés para un alimento. La identificación de peligros será predominantemente un proceso cualitativo. Los peligros pueden identificarse a partir de fuentes de datos pertinentes. La información sobre peligros puede obtenerse de la literatura científica, de bases de datos como las de la industria alimentaria, de organismos gubernamentales, de las organizaciones internacionales correspondientes, y de opiniones solicitadas a expertos. Entre la información pertinente se encuentran datos procedentes, por ejemplo, de estudios clínicos, de la vigilancia e investigaciones epidemiológicas, de estudios en animales de laboratorio, de investigaciones sobre las características de microorganismos, de la interacción entre los mismos y su medio ambiente a través de la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo mismo, y de estudios sobre microorganismos y situaciones análogas.

Segundo paso: Caracterización del peligro.

El propósito de esta etapa es proporcionar una descripción cualitativa o cuantitativa de la gravedad y duración de los efectos adversos que pueden resultar de la ingestión de un microorganismo o sus toxinas con los alimentos. Deberá efectuarse una evaluación de la dosis-reacción, si es posible obtener los datos necesarios.

Una característica aconsejable para la caracterización del peligro es, idealmente, que establezca una relación entre dosis y reacción. Para determinar dicha reacción será necesario tener en cuenta los distintos puntos finales, como infección o enfermedad. De no existir una relación conocida entre dosis y reacción se podrían utilizar herramientas

de la evaluación de riesgos como las deducciones de expertos para considerar los distintos factores, como por ejemplo la infectividad, que se precisan para describir la caracterización del peligro. Además, los expertos podrán idear sistemas de clasificación que permitan caracterizar la gravedad y/o duración de la enfermedad.

Tercer paso: Evaluación de la exposición.

La evaluación de la exposición incluye una evaluación de la magnitud de la exposición humana efectiva prevista. En el caso de agentes microbiológicos, la evaluación de la exposición puede basarse en el posible alcance de la contaminación de los alimentos por un microorganismo determinado o sus toxinas, así como en información acerca de la ingesta. La evaluación de la exposición debería especificar la unidad alimentaria en cuestión, por ejemplo, tamaño de la porción consumida en la mayor parte o la totalidad de los casos de enfermedad aguda.

La evaluación de la exposición calcula, dentro de los distintos niveles de incertidumbre, la presencia de agentes patógenos microbiológicos o toxinas microbianas y la posibilidad de que éstos se presenten en los alimentos en el momento de su consumo. Desde el punto de vista cualitativo los alimentos pueden clasificarse según la probabilidad de que el producto esté o no contaminado en su origen; la capacidad del alimento de soportar o no el crecimiento del agente patógeno en cuestión; la existencia de una posibilidad considerable de manipulación indebida del alimento; o el hecho de que éste vaya a someterse a un proceso térmico.

Cuarto paso: Caracterización del riesgo.

La caracterización del riesgo representa la integración de las determinaciones resultantes de la identificación del peligro, la caracterización del peligro y la evaluación de la exposición, a fin de obtener una estimación del riesgo; proporciona una estimación

cualitativa y cuantitativa de la probabilidad y gravedad de los efectos adversos que podrían presentarse en una población dada, incluida la descripción de las incertidumbres asociadas con estas estimaciones. Tales estimaciones pueden evaluarse por comparación con datos epidemiológicos independientes que establecen una relación entre los peligros y la prevalencia de la enfermedad.

La caracterización del riesgo reúne toda la información cualitativa o cuantitativa de las etapas anteriores a fin de proporcionar una estimación de riesgos con base sólida para una población dada. La caracterización del riesgo depende de los datos y opiniones de expertos disponibles. Es posible que el peso de la evidencia obtenida integrando los datos cualitativos y cuantitativos sólo permita efectuar una estimación cualitativa de los riesgos (CCA, 1999).

De acuerdo a la FAO (1999), los ostiones son los mariscos cosechados de forma más abundante en el mundo, y son cultivados en largas camas en aguas tropicales y templadas desde la zona de mareas hasta una profundidad de 30 m.

La FAO y la OMS comenzaron una evaluación del riesgo de *Vibrio* spp. en pescados y mariscos en 2001. Se estableció un grupo especial de redacción formado por expertos para estudiar la información pertinente disponible y realizar una evaluación del riesgo. Su labor se ha examinado en dos consultas de expertos, que han dado orientaciones (FAO, 2005). Básicamente se han realizado las cinco evaluaciones del riesgo:

- *V. parahaemolyticus* en ostiones crudos consumidos en Japón, Nueva Zelanda, Canadá, Australia y Estados Unidos.
- *V. parahaemolyticus* en pescado que es consumido crudo.
- *V. parahaemolyticus* en almejas rojas consumidas en Tailandia.

- *V. vulnificus* en ostiones crudos consumidos en Estados Unidos.
- *V. cholerae* causante del cólera en los camarones de las aguas templadas presentes en el comercio internacional.

V. HIPÓTESIS

Mediante el análisis microbiológico y molecular de muestras de ostiones que se comercializan en la ciudad de Mazatlán será posible estimar el riesgo que tiene la población consumidora de estos bivalvos a enfermar por la presencia de vibrios toxigénicos.

VI. JUSTIFICACIÓN

La compra – venta de mariscos es una de las principales actividades económicas de Mazatlán gracias a su ubicación como puerto (Melchor *et al.*, 1996); por esta razón tanto los habitantes como los turistas, nacionales y extranjeros, se pueden encontrar expuestos a enfermedades infecciosas debidas al consumo de pescados y mariscos provenientes de esta actividad; específicamente cuando estos son consumidos crudos o semi-crudos. Uno de los mariscos comúnmente consumidos en forma cruda en la ciudad de Mazatlán son los ostiones del género *Crassostrea*.

Es importante establecer si en los ostiones que se comercializan en Mazatlán existe la presencia de estas bacterias y cuantificarlas. Estos datos permitieron estimar el riesgo de enfermedad por su consumo. Para lograr esto se analizaron ostiones obtenidos en centros de distribución locales en periodos establecidos como los más importantes, principalmente en las épocas de calor, factor que favorece la proliferación de vibrios toxigénicos (DePaola *et al.*, 2000), sin embargo también se analizaron organismos en temporadas frías.

Con este trabajo se pretende aportar elementos para cuantificar el riesgo de infección por *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, y *Vibrio vulnificus*, debido al consumo de ostiones del género *Crassostrea* en la ciudad de Mazatlán, Sinaloa.

VII. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y cuantificar las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en ostiones (*Crassostrea* spp.) de proveedores de mariscos en el puerto de Mazatlán, Sinaloa durante un año.

Objetivos Específicos.

- 1) Determinar la presencia de cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, y *V. vulnificus* en ostiones (*Crassostrea* spp.) de proveedores de mariscos en el puerto de Mazatlán, Sinaloa.
- 2) Cuantificar las cepas toxigénicas de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en ostiones (*Crassostrea* spp.) de proveedores de mariscos en el puerto de Mazatlán, Sinaloa.
- 3) Contribuir a la estimación de riesgo de infección por consumo de ostión crudo en el puerto de Mazatlán, Sinaloa.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio.

Se obtuvieron ostiones provenientes de cada uno de los comercializadores en el puerto de Mazatlán, Sinaloa (Fig. 1).

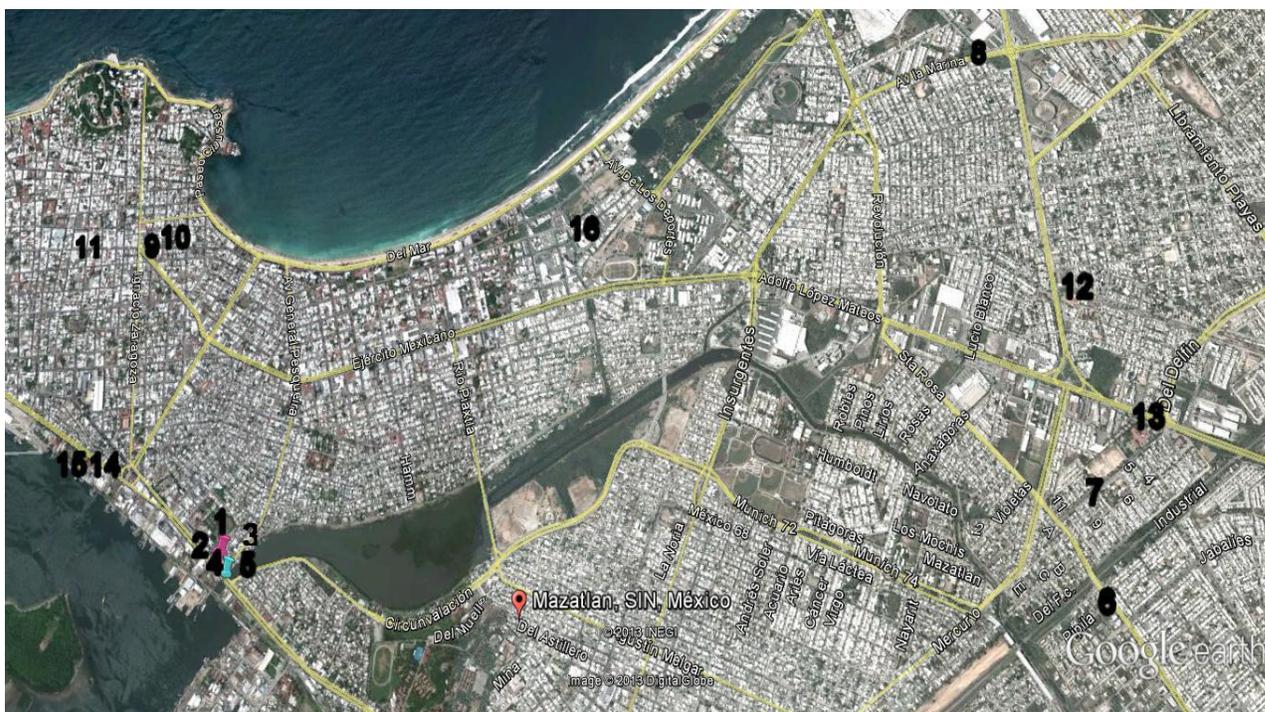


Figura 1: Mapa de la ciudad de Mazatlán donde se muestra la ubicación de los puntos de muestreo. Los números representan el orden en el que fueron muestreados.

Las muestras colectadas se analizaron en un tiempo no mayor a seis horas después de obtenida la muestra.

Se realizó una encuesta a los vendedores para determinar el trato que se le da al producto antes de ser vendido (Anexo 1).

Muestreo.

Se realizaron los muestreos en las siguientes fechas:

- El primer muestreo abarcó del 7 de julio de 2010 al 9 de diciembre de 2010, se tomaron 11 muestras.
- El segundo muestreo abarcó Semana Santa y fue del 17 de febrero de 2011 al 27 de abril de 2011, se tomaron 28 muestras.
- El tercer muestreo abarcó del 25 de julio de 2011 al 18 de agosto de 2011, se tomaron 25 muestras.

Estos tres periodos de muestreo se seleccionaron asumiendo fluctuaciones en la temperatura del agua y ambiental.

El primer y tercer muestreo abarcaron los meses más calurosos del año y la temporada de verano, aunque el primer muestreo abarcó también los meses con temperaturas más frías; y el segundo muestreo abarcó Semana Santa que es la temporada en la que se consume una mayor cantidad de mariscos de acuerdo a la encuesta realizada a los proveedores de ostiones.

El análisis de las muestras se realizó mediante dos metodologías, la primera basada en el método del Conteo Total Cultivable y la segunda basada en el método del Número Más Probable.

Metodología de Conteo Total Cultivable (Fig. 2).

Procesamiento de la muestra.

Se lavaron y desconcharon de 10 a 12 ostiones por muestra para obtener 200 g del contenido de los ostiones (incluyendo el líquido).

Se licuaron durante 3 min para homogeneizar la muestra en condiciones asépticas.

Análisis Microbiológico mediante Conteo Total Cultivable

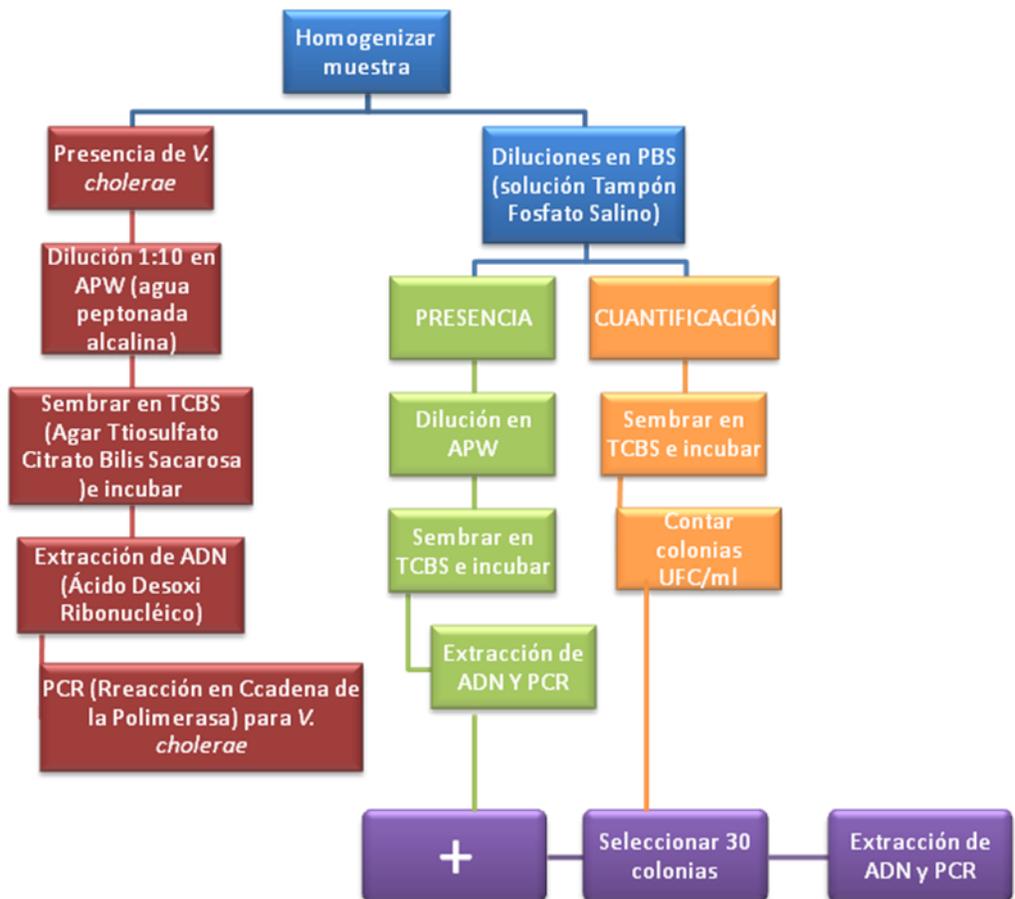


Figura 2: Diagrama de flujo de la metodología utilizada para los muestras 1 a 7.

Presencia de *V. cholerae*.

Se diluyeron 25 g de la muestra homogeneizada de ostiones en 225 ml de agua peptonada alcalina pH 8.0 (APW) y se incubó esta dilución a 35° C de 6 a 8 horas.

Se tomó una asada de la película que se forma en el APW y se sembró en forma de estría en agar TCBS; se incubó a 35° C de 15 a 20 horas.

Se tomó una asada y se colocó en buffer de lisis para realiza extracción de ADN posteriormente.

Para la extracción de ADN se colocó la muestra en buffer de lisis (tabla 1) en el vortex, se calentó de 95 a 100°C por 5 min., se colocó nuevamente en el vortex y posteriormente se colocó en hielo, se centrifugó la muestra y se mantuvo congelada hasta su uso, posteriormente se realizó PCR para determinar la presencia de *Vibrio cholerae*.

Presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*.

Se diluyeron 50 g de la muestra homogeneizada de ostiones en 450 ml de PBS en una dilución 1:10.

Se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000.

De la dilución 1:100 se tomó 0.1 ml y se diluyó en 9.9 ml de APW.

Se tomó una asada de la película que se forma encima del APW y se sembró en forma de estría en agar TCBS a 35° C por 15 horas; posteriormente se realizó la extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se colocó la muestra con el buffer de lisis en el vortex, se calentó de 95 a 100°C por 5 minutos y se volvió a colocar en el vortex,

posteriormente se colocó en hielo y se centrifugó. La muestra permaneció congelada hasta su uso.

De los tubos con ADN del crecimiento masivo obtenidas a partir de la siembra por estría, se realizó PCR para determinar la presencia de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae*.

Cuantificación de *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

Se diluyeron 50 g de la muestra homogeneizada de ostiones en 450 ml de PBS en una dilución 1:10.

Se realizaron diluciones 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000.

De la dilución 1:100 se tomó 0.1 ml y se sembró en forma de placa en agar TCBS en una dilución 1:1000. Se incubó a 30° C por 24 horas.

Se realizó el conteo de colonias en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

NOTA: En caso de que el conteo de colonias no fuera suficiente para seleccionar 30 colonias, se sembró directamente del macerado y de la dilución 1:10.

Si los resultados obtenidos del PCR del enriquecimiento con APW (presencia de *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus*) fueron positivos, se seleccionaron 30 de las colonias a las cuales se realizó el conteo (UFC/ml) que pertenezcan a esa dilución y se realiza extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se colocó la muestra con el buffer de lisis en el vortex, se calentó de 95 a 100°C por 5 minutos y se volvió a colocar en el vortex,

posteriormente se colocó en hielo y se centrifugó. La muestra permaneció congelada hasta su uso.

Para el ADN extraído de colonias verdes se realizó PCR para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*; para el ADN extraído de colonias amarillas se realizó PCR para *V. cholerae*.

Metodología basada en la técnica del Número Más Probable (NMP)

Se cambió la metodología para aumentar la sensibilidad de las pruebas moleculares y evitar que los inhibidores presentes en los ostiones ocasionaran resultados falsos; el conteo se realizó siguiendo la técnica del número más probable (Gómez-Gil y Lizárraga P.; 2010, Fig. 3)

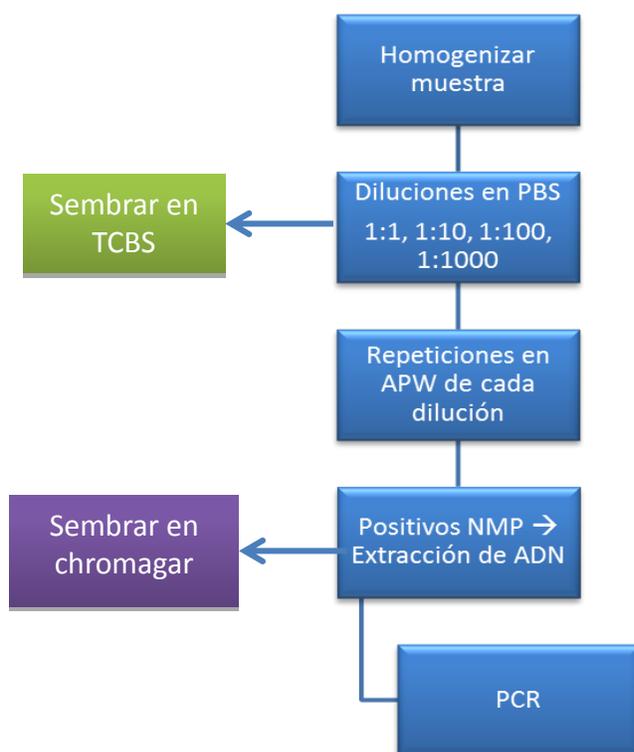


Figura 3: Diagrama de flujo de la metodología del Número Más Probable.

Enriquecimiento

Se homogenizaron 200 g de ostión en 200 g de PBS (dilución 1:1); de forma opcional, a partir de esta dilución se tomó 1 ml y se diluyó en 10 ml de agua peptonada alcalina (APW) por triplicado.

Se realizaron diluciones seriales en PBS 1:1, 1:10, 1:100 y 1:1000.

Se tomó 1 ml de cada una de las diluciones y se adicionó en 10 ml de APW, se realizó por triplicado.

Los tubos con APW inoculados se incubaron a 35° C de 12 a 18 horas.

Opcionalmente de cada una de las diluciones (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000) se sembró 0.1 ml en TCBS para tener un Conteo Total Viable (CTV) de vibrios totales en la muestra; y se incubaron a 30° C por 24 horas.

Número más probable (NMP)

Se revisaron los tubos de APW después de ser incubados, aquellos tubos que presentaron turbidez fueron analizados mediante PCR.

Para los tubos que resultaron positivos para algún marcador molecular (*ompw*, *tlh* o *vvha*), se calculó el NMP considerando el número de tubos positivos de cada dilución con base a las tablas correspondientes (USDA, 2008).

Aislamiento de colonias toxigénicas

Las muestras procedentes de los tubos positivos para *tl* y *vvha* se sembraron en Chromagar para aislar colonias lilas (*tl*) y/o azules (*vvha*), de las cuales se seleccionaron 15 para posteriormente volver a sembrarlas en TSA con sal 2%, a partir del crecimiento en estos medios se realizó extracción de ADN y PCR para confirmar su identidad y poder tener aislada a la bacteria.

Análisis Molecular

a) Amplificación de genes toxigénicos

- PCR *V. parahaemolyticus*. Se realizó la PCR (Tabla 1.) utilizando como primer o marcador especie-específico (Tabla 2) al gen de la termolisina (*tlh*). En caso de tener un resultado positivo para *tlh*, se realizó una nueva PCR utilizando marcadores de toxicidad termolisina directa termoestable (*tdh*) y termolisina relacionada a *tdh* (*trh*) (Tabla 3). Si el resultado fue positivo para *tdh* y negativo para *trh*, se realizó nuevamente una PCR utilizando el marcador de toxicidad de la cepa pandémica O3:K6, ORF8 (Open Reading Frame 8).
- PCR *V. vulnificus*. Se realizó la PCR utilizando como marcador especie-específico citolisina hemolisina (*vvha*).
- PCR *V. cholerae*. Se realizó la PCR utilizando como marcador especie-específico la proteína de la membrana externa (*ompW*), al mismo tiempo se realizó PCR utilizando como marcador de toxicidad la toxina del cólera (*ctxA*). Si se obtuvo un resultado positivo para *ompW* y negativo para *ctxA*, se realizó PCR utilizando como marcador de toxicidad CholixA (*chxA*). En caso de haber obtenido un resultado positivo para *ompW* y *ctxA* se realizó PCR multiplex utilizando como marcadores de toxicidad O1 y O139.

Reactivo	Concentración	Conc. Final	1X (μl)
Agua p/PCR	-	-	6.69
Buffer GoTaq green con NaCl	5X	1X	2.5
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.25
Primer Fwd	10 mM	1 mM	1.25
Primer Rvs	10 mM	1 mM	1.25
GoTaq polimerasa	5 U/μl	0.025	0.06
ADN	50 ng/μl	2 ng/μl	0.5
			12.5

Tabla 1: Reactivos utilizados para realizar la PCR.

Gen	Secuencia (5' - 3')	Tm	Producto (bp)
<i>ompW</i>	ompW-f. CAC CAA CAA GGT GAC TTT ATT GTG ompW-r. GAA CTT ATA ACC ACC CGC G	64	588
<i>tlh</i>	tl-f. AAA GCG GAT TAT GCA GAA GCA CTG tl-r. GCT ACT TTC TAG CAT TTT CTC TGC	58	450
<i>tdh</i>	tdh-l. GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC tdh-r. TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC	58	269
<i>trh</i>	trh-f. TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT trh-r. CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC G	58	500
ORF8	ORF8-l. AGG ACG CAG TTA CGC TTG ATG ORF8-r. CTA ACG CAT TGT CCC TTT GTA G	60	369
<i>vvhA</i>	vvhA-f. CTC ACT GGG GCA GTG GCT vvhA-r. CCA GCC GTT AAC CGA ACC A	60	383

Tabla 2: Características de los primers utilizados en este trabajo.

Gen	Nombre del gen	Características
<i>ompW</i>	Proteína para la membrana externa	Especie-específico para <i>V. cholerae</i>
<i>tlh</i>	Termolisina	Especie-específico para <i>V. parahaemolyticus</i>
<i>tdh</i>	Termolisina direct termoestable	Marcador de <i>Vp</i> toxigénico
<i>trh</i>	Termolisina relacionada a TDH	Marcador de <i>Vp</i> toxigénico
ORF8	Open reading frame 8	Cepa pandémica O3:K6 de <i>Vp</i>
<i>vvhA</i>	Citolisina hemolisina	Especie-específico para <i>V. vulnificus</i>

Tabla 3: Descripción de los genes utilizados en PCR.

Se incluyó un control positivo (Tabla 4) y un control negativo. El control negativo es la mezcla maestra sin ADN.

Cepa	V. p				V.v.	V.c.
	<i>tlh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	ORF8	<i>vvhA</i>	<i>ctx</i>
CAIM 320	+					
CAIM 1400		+		+		
CAIM 1772	+	+	+			
CAIM 610					+	
CAIM 1408						+

Tabla 4: Cepas control utilizadas en PCR.

b) Visualización de productos de amplificación.

Se leyeron las muestras obtenidas de los PCR realizados mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa 1.2% y en buffer TAE 1X; el gel corrió a 90 V durante 40 minutos y se visualizó utilizando un transiluminador.

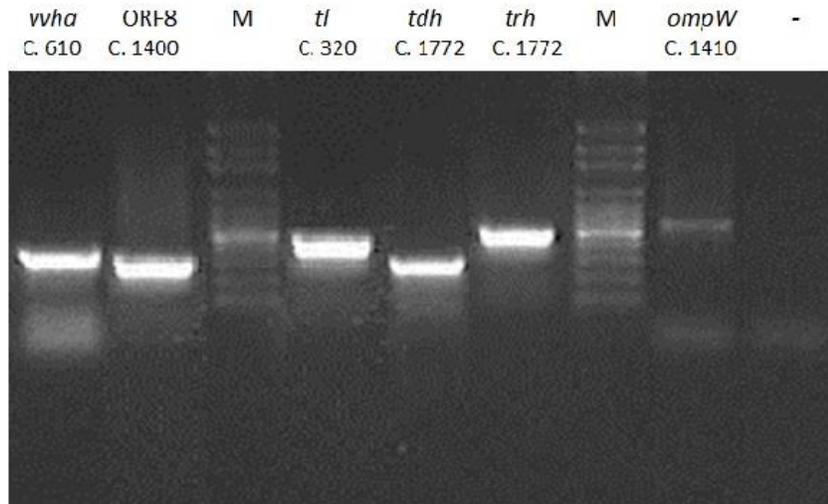


Figura 4: Electroforesis de los controles positivos utilizados en PCR para la detección de vibrios toxigénicos.

Análisis de riesgos microbiológicos

Realizando búsquedas bibliográficas se recopiló información sobre los agentes causales; y mediante la información obtenida de la encuesta (ANEXO 1) realizada a los encargados de las comercializadoras se obtuvieron datos acerca del manejo y el consumo de ostión en Mazatlán. A partir de análisis microbiológicos se obtuvieron datos para calcular el riesgo al que se encuentra expuesta la población utilizando el programa Risk Ranger; el cual es una herramienta que sirve como ayuda para determinar riesgos relativos de diferentes combinaciones producto, patógeno y procesamiento.

IX. RESULTADOS

Área de estudio

Se localizaron 16 comercializadoras de ostión crudo en el puerto de Mazatlán (Fig. 1), las cuales se encuentran localizadas en el Puente Juárez y Centro principalmente y comercializan ostión crudo a dueños de negocios informales (carretas), restaurantes y a particulares.

Muestreo

El primer muestreo se realizó del 7 de julio al 9 de diciembre de 2010 y se analizaron 11 muestras durante este lapso. Se realizó un muestreo en 8 de las 16 comercializadoras, el muestreo se extendió más de lo previsto debido a que durante la temporada de lluvia no se vendieron ostiones por no tener el tamaño ideal para comercializarse.

El segundo muestreo, abarcó Semana Santa y fue del 17 de febrero al 27 de abril de 2011, se analizaron 28 muestras durante este lapso, se analizaron tres muestras en febrero, nueve muestras en marzo y 16 muestras en abril.

El tercer y último muestreo se realizó del 25 de julio al 14 de septiembre de 2011, en este muestreo se analizaron seis muestras en julio, 28 muestras en agosto y 11 muestras en septiembre.

En total se analizaron 84 muestras, de las cuales siete se analizaron mediante la metodología de Conteo Total Viable durante el primer muestreo y 77 mediante la metodología del Número Más Probable (Anexo 4), de éstas últimas 39 corresponden a *Crassostrea gigas* y 38 a *Crassostrea corteziensis*

Conteo Total Cultivable

Para realizar el Conteo Total Cultivable se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g} = \text{No. de colonias en placa} \times \text{inverso de la dilución} \times 10$$

Se tomaron en cuenta los crecimientos entre 30 y 300 colonias debido a que en este rango de valores se presenta menor probabilidad de errores. En la muestra 4 el resultado obtenido fue 2.35×10^5 UFC/g, para la muestra 5 el valor fue 1.81×10^5 UFC/g, en la muestra 6 fue 3.3×10^5 UFC/g y en la muestra 7 el valor del CTC fue 1.9×10^6 UFC/g, en los demás muestreos los valores se encontraban fuera del rango de 30 a 300 colonias, por lo que no son confiables (ANEXO 2). En tres de las siete muestras analizadas por el método del CTC se obtuvieron resultados positivos para marcadores de toxicidad; la muestra 4 resultó positiva para *vvhA* (*V. vulnificus*) y para *tdh+* y *trh+* (*V. parahaemolyticus*); las muestras 5 y 6 resultaron positivas para *tdh+* y *trh-* (*Vibrio parahaemolyticus*); solo la muestra 6 tuvo un valor superior al límite máximo permisible para *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos, el cual se establece en 10^4 UFC/g (NOM-242-SSA1-2009); el valor de la muestra fue de 7×10^4 UFC/g para los marcadores de toxicidad *tdh+* y *trh-*. Todas las muestras fueron negativas para *ompW* y *ctx* (*Vibrio cholerae*) (Tabla 5).

Resultados de marcadores de toxicidad por metodología de CTC										
Proveedor	Fecha	Muestra	Especie	Probable Origen	Marcador de toxicidad	Colonias positivas	Dilución	UFC/g positivas	UFC/g col. Total	% Positivas
1	07/07/2010	1	<i>C. gigas</i>	Sonora	Negativo para marcadores de toxicidad					
2	16/07/2010	2	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	Negativo para marcadores de toxicidad					
		3	<i>C. gigas</i>	Nayarit	Negativo para marcadores de toxicidad					
3	26/07/2010	4	<i>C. gigas</i>	Culiacán	Negativo para marcadores de toxicidad					
4	08/08/2010	5	<i>C. gigas</i>	Tepic	<i>tdh+/trh+</i>	2	1:100	2x10 ³	2.3x10 ⁵	0.86%
					<i>vvhA+</i>	4	1:100	4x10 ³	2.3x10 ⁵	1.72%
5	28/08/2010	6	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	<i>tdh+/trh-</i>	7	1:1000	7x10 ⁴	5x10 ⁷	0.14%
6	30/09/2010	7	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	<i>tdh+/trh-</i>	3	1:100	3x10 ³	9.5x10 ⁵	0.31%

Tabla 5: Resultados del Conteo Total Cultivable.

Las colonias de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* presentaron crecimiento en forma de colonias verdes, opacas y redondas de 3 mm de diámetro. Las muestras 1 a 6 presentaron un mayor porcentaje de colonias verdes, sólo la muestra 7 tuvo un porcentaje mayor de colonias amarillas (Fig.5)

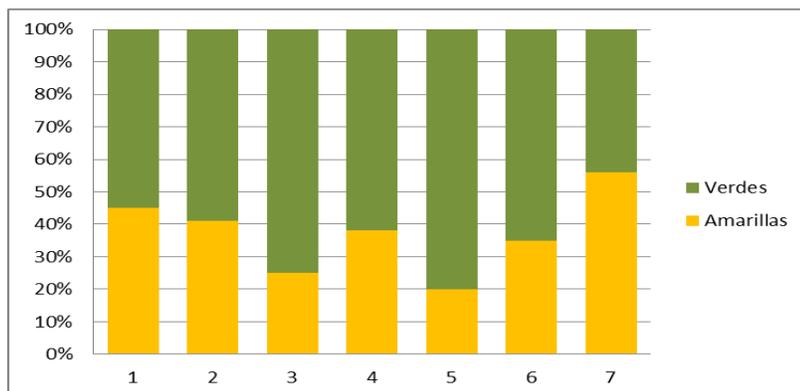


Figura 5: Porcentaje de colonias amarillas y verdes en las muestras analizadas mediante Conteo Total Cultivable.

Número Más Probable (NMP)

Se realizó el cálculo del número más probable utilizando las tablas propuestas por el USDA, 2008 para las diluciones utilizadas: 0.1, 0.01 y 0.001 g de ostión, tres diluciones fueron suficientes para que en todos los casos al menos uno de los tubos de la última dilución resultara negativo al realizar PCR (Anexo 3).

Vibrio cholerae

No se obtuvieron resultados positivos para *ompW* y *ctx* en ninguna de las muestras analizadas.

Vibrio parahaemolyticus

Se detectó la presencia únicamente de *tlh* (*Vibrio parahaemolyticus* total) en 7 de las 77 muestras analizadas por NMP (9%), en 53 de las 77 muestras se detectó la presencia de marcadores de toxicidad para *V. parahaemolyticus*. La combinación *tlh+*, *tdh+* y *trh+* se detectó en 40 muestras (52%); los marcadores *tlh+*, *tdh+* y *trh-*; se encontraron en 11 muestras (14%), dentro de éste porcentaje una muestra dio positiva para la cepa pandémica ORF8; los marcadores *tlh+*, *tdh-* y *trh+* se encontraron en dos muestras (3%). Diecisiete muestras dieron negativas para cualquier marcador molecular de *Vibrio parahaemolyticus* (22%) (Fig. 6).

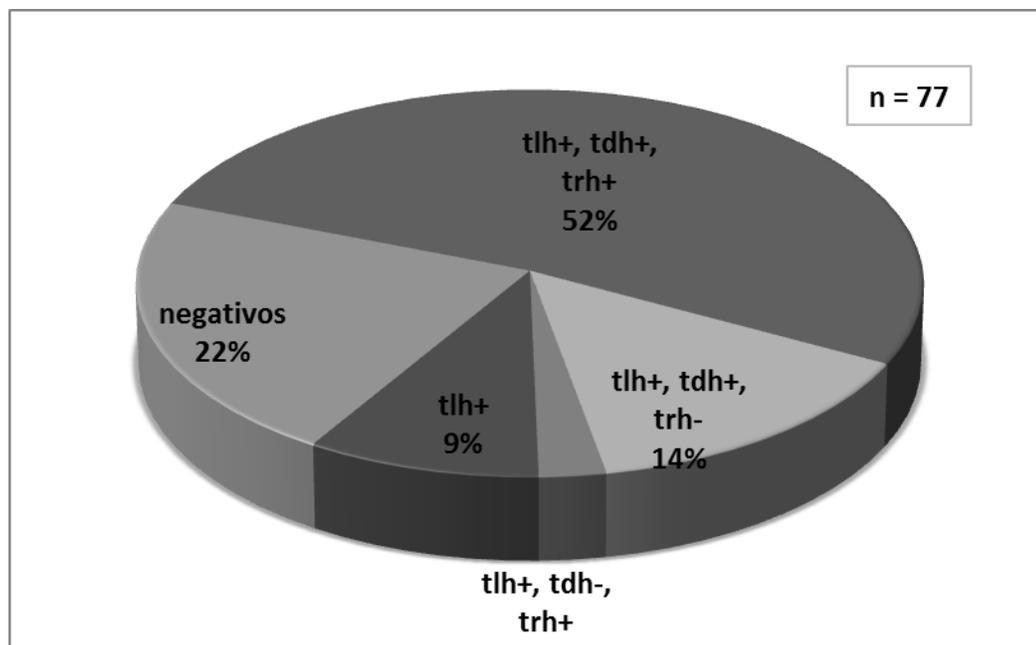


Fig. 6: Porcentaje de marcadores de *V. parahaemolyticus* encontrados en las 77 muestras analizadas por la técnica de NMP.

Se encontraron porcentajes similares de marcadores toxigénicos de *Vibrio parahaemolyticus* en ambos tipos de ostiones (*Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis*); de las 39 muestras de *C. gigas* analizadas el 50% dio positivo para *tlh*, *tdh* y *trh*, el 11% resultaron positivas para *tlh*, *tdh* y negativas para *trh* una de las cuales dio positiva para ORF8; el 5% de las muestras resultó positiva para *tlh*, *trh* y negativa para *tdh*, el 5% de las muestras resultaron positivas sólo para *tlh* (*V. parahaemolyticus* total). El 28% de las muestras dio negativo para los marcadores moleculares de *V. parahaemolyticus* (Fig.7 a).

De las 38 muestras de *Crassostrea corteziensis* analizadas el 53% dio positivo para *tlh*, *tdh* y *trh*, el 18% resultaron positivas para *tlh*, *tdh* y negativas para *trh*, en las muestras de *C. corteziensis* ninguna muestra dio positiva para la combinación *tlh+*, *tdh-* y *trh+*; tampoco se encontraron muestras positivas para

ORF8. El 13% de las muestras resultaron positivas sólo para *tlh* (*V. parahaemolyticus total*). El 16% de las muestras dio negativo para cualquier marcador molecular de *V. parahaemolyticus* (Fig. 7 b).

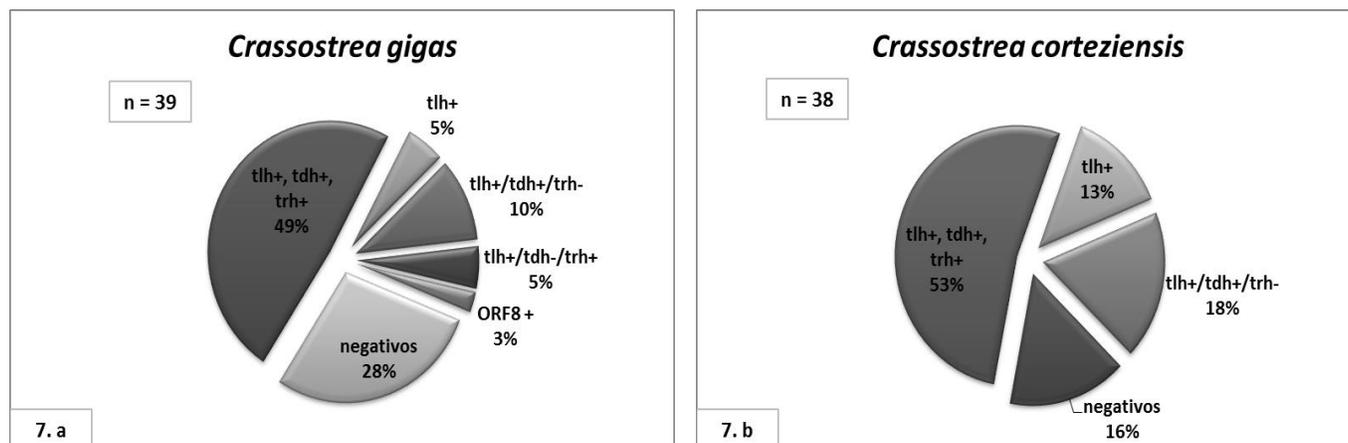


Figura 7: Porcentaje de *V. parahaemolyticus* en ostiones *Crassostrea gigas* (a) y *Crassostrea corteziensis* (b).

Durante la semana 13 que correspondió al mes de agosto, se presentó el promedio más alto para la combinación *tlh+*, *tdh+*, *trh+* superando los 500 NMP/g, el promedio más alto para la combinación *tlh+*, *tdh+*, *trh-* se presentó en la semana 16 correspondiente al mes de agosto con un valor superior a 400 NMP/g; el valor más alto para la combinación *tlh+*, *tdh-*, *trh+* se presentó en la semana 4 correspondiente al mes de marzo con un valor superior a 300 NMP/g. En la tercera semana correspondiente al mes de marzo se presentaron valores nulos para marcadores de toxicidad de *Vibrio parahaemolyticus* (Fig.8).

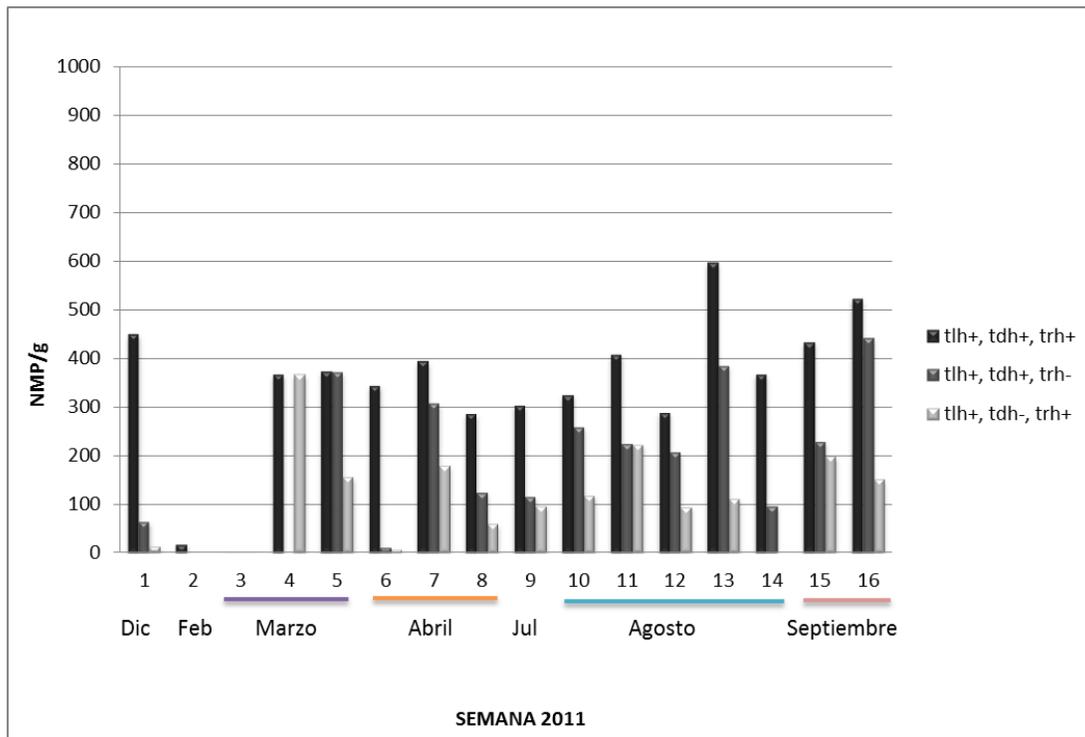


Figura 8: Promedio semanal de NMP/g para *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico.

Se observó que el promedio de NMP/g para la combinación *tlh+*, *tdh+*, *trh+* (Fig. 9) tuvo un valor mayor en el muestreo de septiembre a diciembre de 2010 en comparación con los dos muestreos siguientes, presentando un menor valor en el segundo muestreo de febrero a abril de 2011. Por el contrario el promedio de NMP/g de las combinaciones *tlh+*, *tdh+*, *trh-* y *tlh+*, *tdh-*, *trh+* presentaron su mayor valor en el último muestreo de julio a septiembre de 2011.

Para *tlh+*, *tdh+*, *trh+* el valor mayor se detectó en el muestreo de septiembre a diciembre (450 NMP/g), mientras que en el segundo muestreo de febrero a abril presentó su menor valor (287 NMP/g) y aumentó en el último muestreo (405 NMP/g). Para *tlh+*, *tdh+*, *trh-* y *tlh+*, *tdh-*, *trh+* los valores menores se presentaron

en el primer muestreo (64.7 NMP/g y 13.5 NMP/g respectivamente, en el segundo muestreo los promedios que presentaron fueron 146.9 NMP/g para *tlh+*, *tdh+*, *trh-*, y 117.3 NMP/g para *tlh+*, *tdh-*, *trh+*, ambos promedios aumentaron en el último muestreo (264 NMP/g y 127.2 NMP/g respectivamente). Por lo que solo durante el primer muestreo se encontraron valores de *tlh+*, *tdh+*, *trh-* y *tlh+*, *tdh-*, *trh+* dentro del límite permisible de 10^4 NMP/100g (NOM-242-SSA1-2009) (Fig. 9).

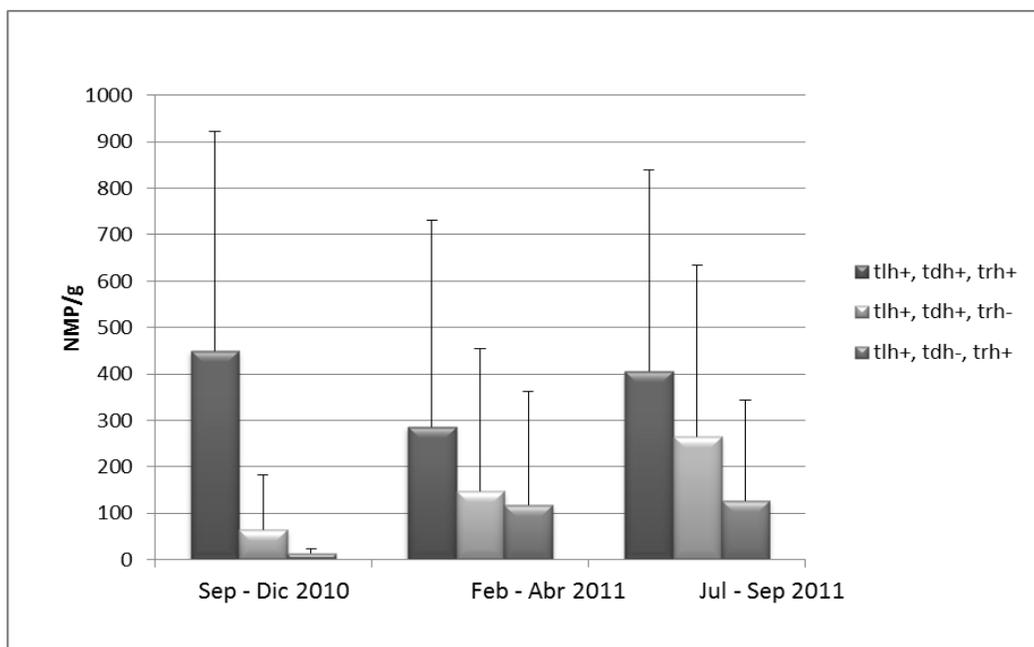


Figura 9: Promedio y desviación estándar de NMP de los marcadores moleculares de toxicidad para *Vibrio parahaemolyticus*, durante los periodos de muestreo.

Los proveedores en los que se detectó mayor presencia de los marcadores *tlh+*, *tdh+*, *trh+*, fueron el número 6 durante el primer muestreo y el número 2 durante el segundo muestreo (febrero – abril) con más de 1000 NMP/g, y los menos contaminados con este marcador fueron los proveedores 4 y 5 con valores de menos de 100 NMP/g durante el segundo y tercer muestreo (Fig. 10).

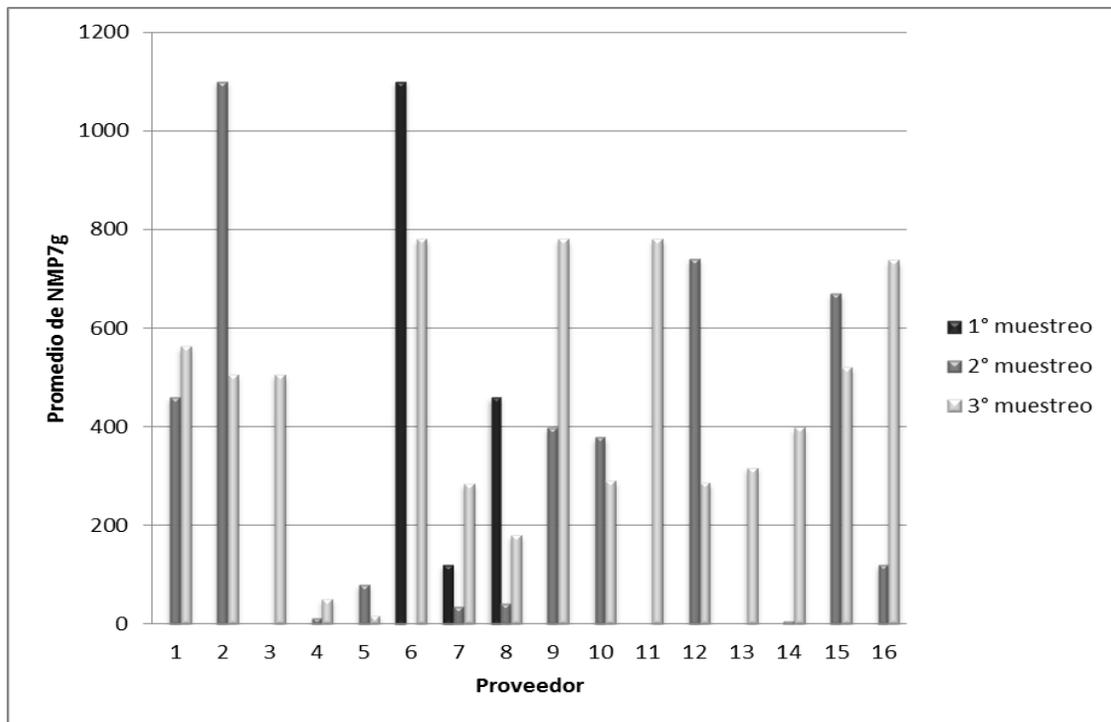


Figura 10: Promedio de NMP/g de la combinación de marcadores moleculares *tlh+*/ *tdh+*/ *trh+* de acuerdo al proveedor.

El proveedor más contaminado con la combinación *tlh+*, *tdh+*, *trh-*, fue el número 12 durante el segundo muestreo (febrero – abril) con más de 700 NMP/g, y los menos contaminados con esta combinación fueron los proveedores 4 y 5 con valores inferiores a 100 NMP/g durante el segundo y tercer muestreo (Fig. 11).

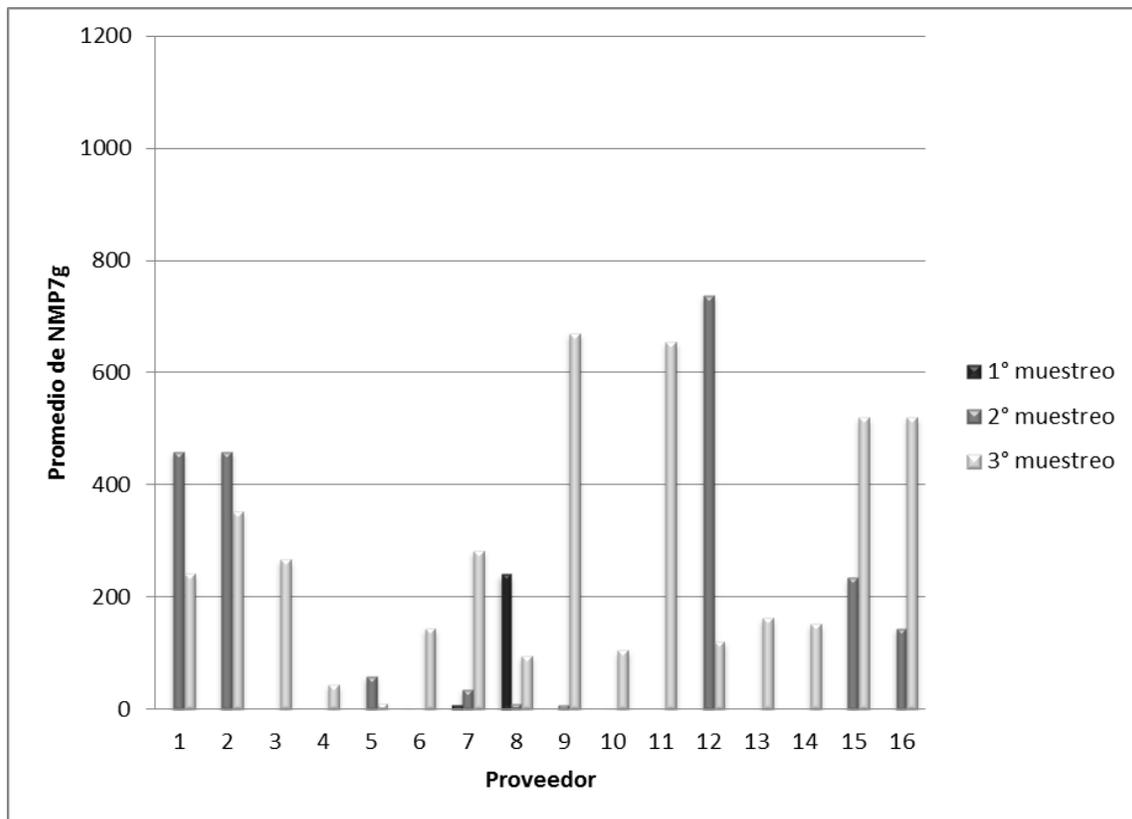


Figura 11: Promedio de NMP/g de la combinación de marcadores moleculares *tlh+*, *tdh+*, *trh-* de acuerdo al proveedor.

El proveedor más contaminado con la combinación *tlh+*, *tdh-*, *trh+*, fue el número 1 durante el segundo muestreo (febrero – abril) con más de 450 NMP/g, y los menos contaminados con este marcador fueron nuevamente los proveedores 4 y 5 con valores inferiores a 100 NMP/g durante el segundo y tercer muestreo (Fig. 12).

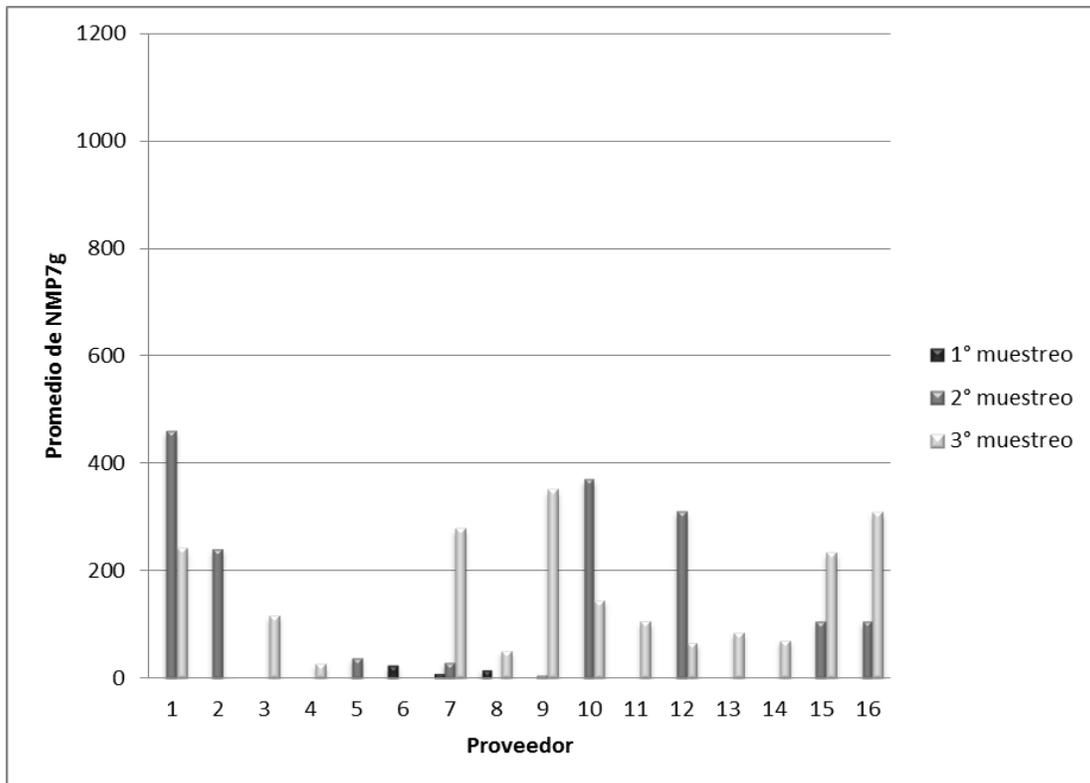


Figura 12: Promedio de NMP/g de la combinación de marcadores moleculares *tlh+*, *tdh-*, *trh+* de acuerdo al proveedor.

No se obtuvieron muestras del proveedor 6 durante el segundo muestreo. Durante el primer muestreo (septiembre – diciembre de 2010) sólo se analizaron

muestras provenientes de tres de los 16 comercializadores (6, 7 y 8) que fueron analizados por la metodología del NMP.

De acuerdo a la encuesta realizada a los proveedores se consideraron cuatro estados como probable origen de las muestras: Baja California, Nayarit (Tepic), Sonora y Sinaloa (Culiacán, Mazatlán, Isla de la Piedra, Agua Verde).

Durante los meses de muestreo, en las muestras que se presume provenían de Baja California, se contrastaron los niveles de NMP/g encontrados en las muestras con las variaciones de temperatura superficial del agua en el probable momento de la cosecha, las cuales se obtuvieron utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontraron los niveles más altos, mayores a 1000 NMP/g para los marcadores *tlh+*, *tdh+*, *trh+* y *tlh-*, *tdh-*, *trh-* (*Vibrio parahaemolyticus* toxigénico) en los meses de marzo y julio de 2011 (Fig. 13a).

También se contrastaron los datos obtenidos con la temperatura del agua al momento de la cosecha (NEO) en las muestras presuntamente provenientes de Nayarit, se presentó el nivel más alto, arriba de 1000 NMP/g (septiembre 2010) para el marcador *tlh+*, *tdh+*, *trh+*, y niveles por debajo de 100 NMP/g durante febrero y marzo de 2011. En contraste con las variaciones de temperatura del agua en el probable momento de la cosecha, las cuales se obtuvieron utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontraron niveles mayores de NMP/g en los meses más calurosos, excepto en el mes de abril de 2011, el cual

presentó un valor más alto que en julio y agosto, a pesar de que la temperatura fue más baja (24.2°) (Fig. 13b).

En las muestras que se presume provenían de Sinaloa, se contrastaron los niveles de NMP/g encontrados en las muestras con las variaciones de temperatura del agua en el probable momento de la cosecha, utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontraron los niveles más altos, mayores a 450 NMP/g para el marcador *tlh+*, *tdh+*, *trh+* y superior a 200 para el marcador *tlh+*, *tdh+*, *trh-* en el mes de febrero de 2011. Los valores menores se encontraron en los meses de marzo y abril de 2011 con niveles inferiores a 50 NMP/g (Fig. 13c).

Para las muestras presuntamente provenientes de Sonora, se contrastaron los niveles de NMP/g encontrados en las muestras con las variaciones de temperatura del agua en el probable momento de la cosecha, utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontró el nivel más altos, superior a 400 NMP/g para el marcador *tlh+*, *tdh+*, *trh+* durante el mes de abril de 2011. Los valores menores se encontraron en los meses de febrero y julio de 2011 con niveles inferiores a 50 NMP/g (Fig. 13d).

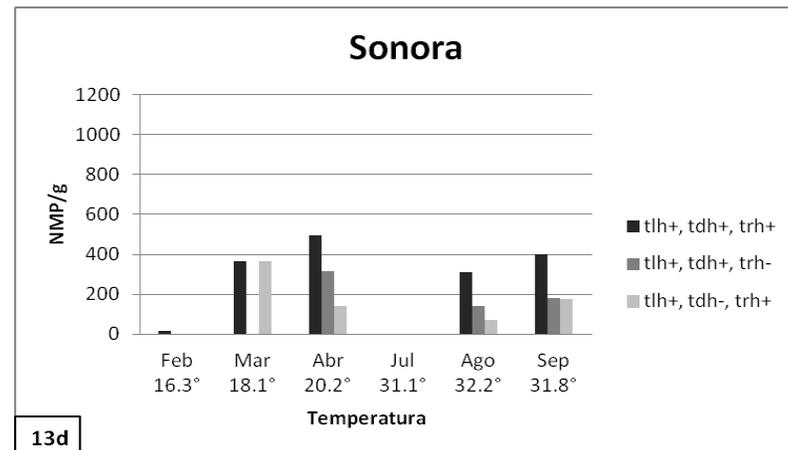
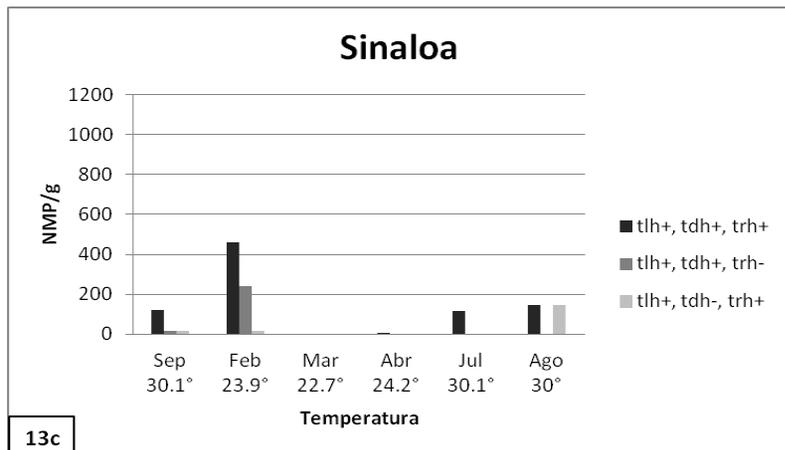
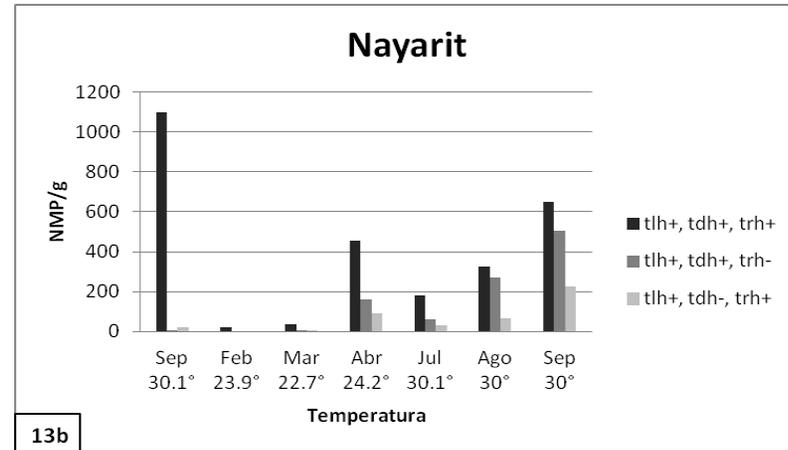
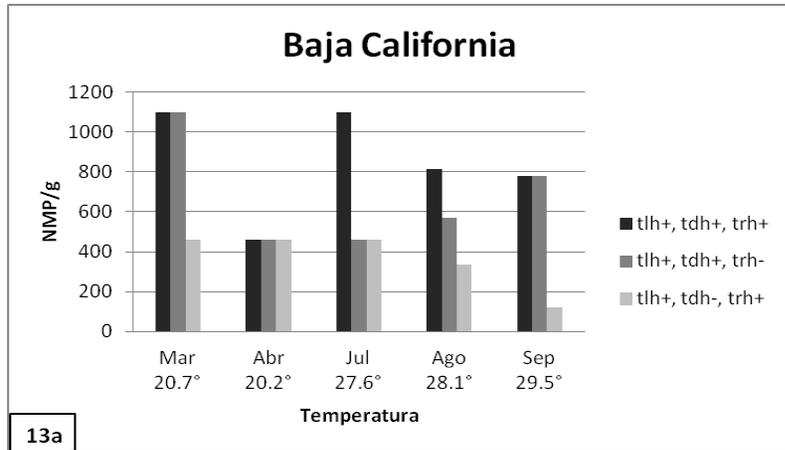


Figura 13: Variación de NMP/g de marcadores moleculares para *V. parahaemolyticus toxigénico* durante los meses de muestreo, y la probable temperatura al momento de la cosecha en los presuntos lugares de origen de las muestras.

El lugar de origen probable que presentó una mayor presencia de los marcadores de toxicidad para *Vibrio parahaemolyticus* fue Baja California, y el que presentó una menor presencia fue Sinaloa con valores por debajo de los 100 NMP/g (Fig. 14). Sin embargo fue en la muestra proveniente de Agua Verde, Sinaloa (muestra 11) que se encontró el único valor positivo para el marco de lectura abierto ORF8 de la cepa pandémica.

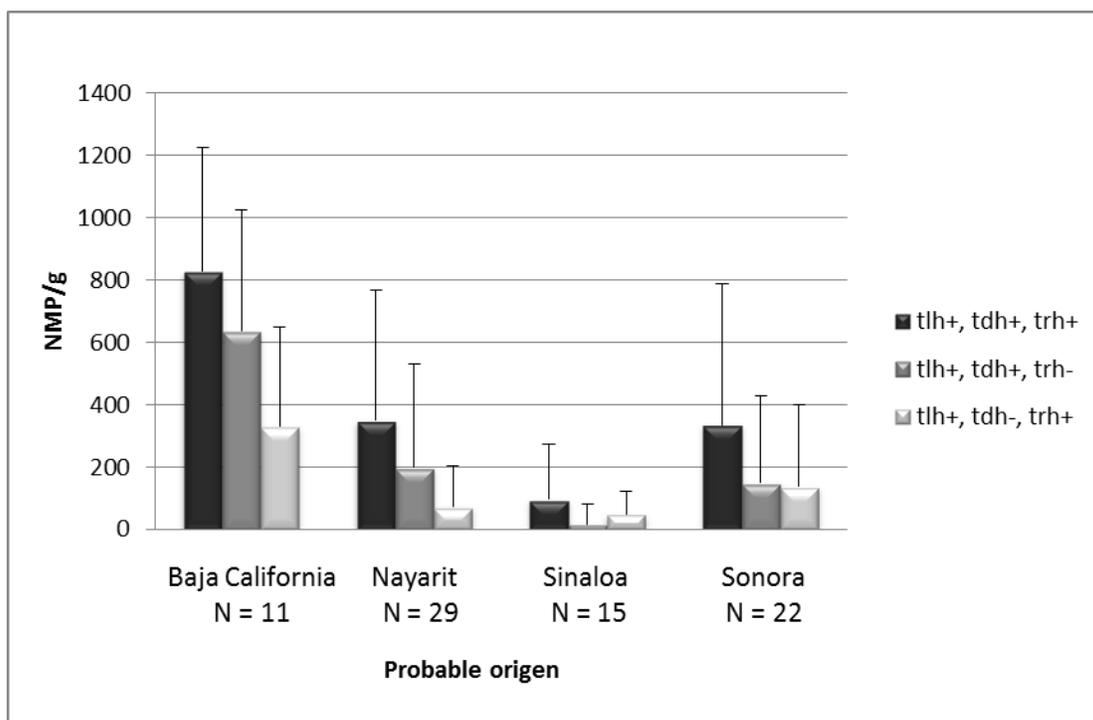


Figura 14: Promedio de NMP/g de los marcadores de toxicidad para *Vibrio parahaemolyticus* de acuerdo al probable origen de las muestras.

Vibrio vulnificus

El marcador de toxicidad *vvhA* (*Vibrio vulnificus*) se encontró en 48 de las 77 muestras analizadas mediante la técnica del Número Más Probable (Fig. 15).

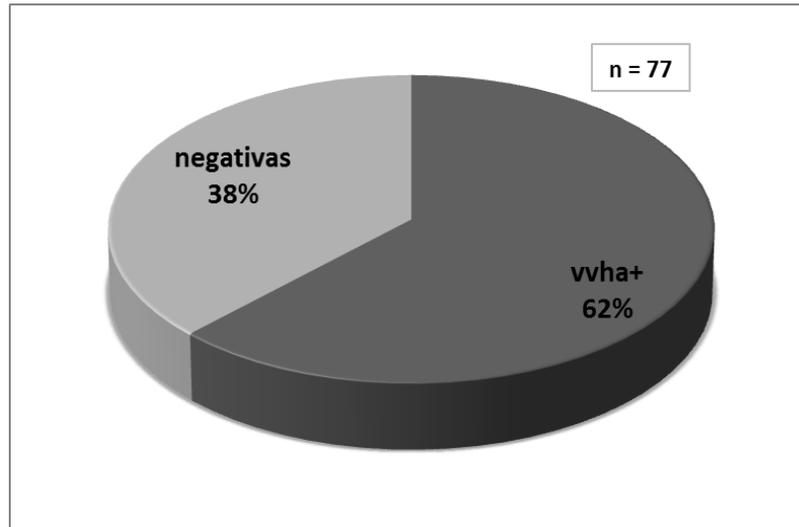


Figura 15: Porcentaje del marcador (*vvhA*) de *V. vulnificus* encontrado en las 77 muestras analizadas por la técnica de NMP.

De las 39 muestras de *Crassostrea gigas* analizadas por la técnica del Número Más Probable, el 54% dio positivo para *vvha+* (*Vibrio vulnificus*), y el 46% fueron negativas (Fig. 16 a). Se encontró un mayor porcentaje de *vvha+* en ostiones *Crassostrea corteziensis*; de las 38 muestras de *C. corteziensis* analizadas el 71% dio positivo para *vvha+*, el resto (29%) dio negativo (Fig. 16 b).

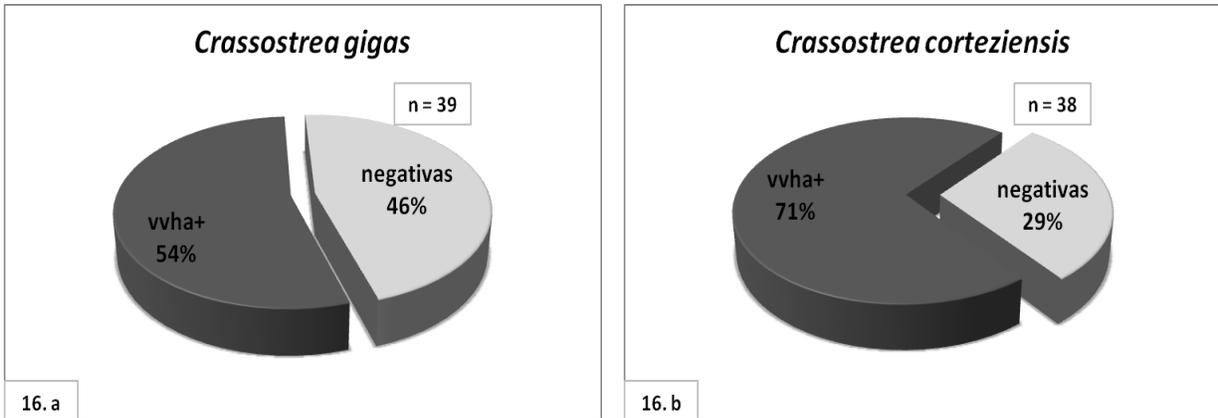


Figura 16: Porcentaje de *V. vulnificus* en ostiones *Crassostrea gigas* (a), y *Crassostrea corteziensis* (b).

Durante la segunda semana de muestreo, que correspondió al mes de febrero, se presentó el promedio más alto para *vvhA+* alcanzando los 800 NMP/g, en la quinta semana (marzo) se encontraron valores de 0 NMP/g (Fig. 17).

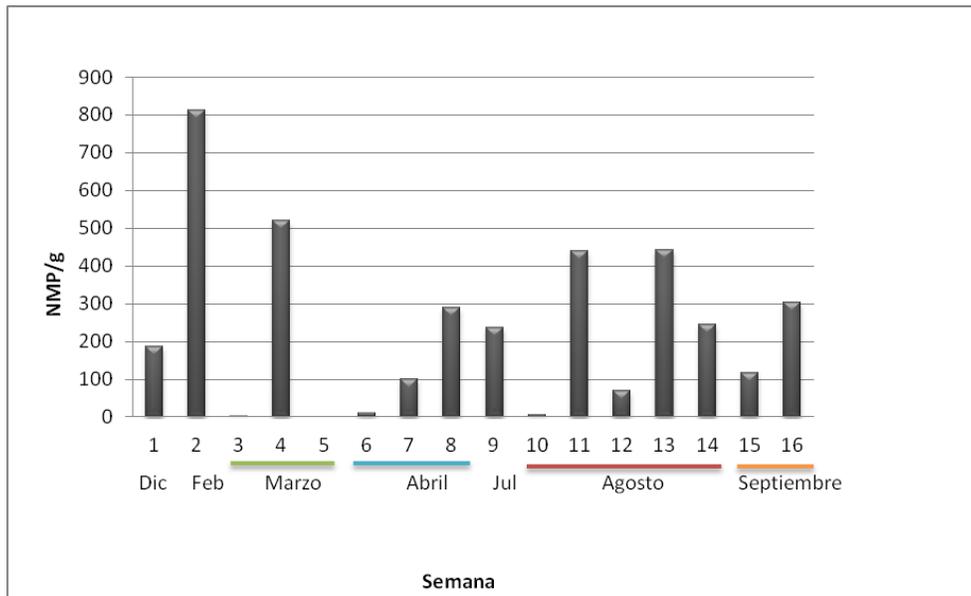


Figura 17: Promedio semanal de NMP/g del marcador *vvhA+* (*Vibrio vulnificus* toxigénico).

Para *vvhA* (*V. vulnificus*) se observó un promedio mayor de NMP/g en el muestreo de julio a septiembre con valores superiores a 200 NMP/g, mientras que el menor promedio se presentó en el primer muestreo de septiembre a diciembre de 2010, con valores inferiores a 200 NMP/g.

Para *vvha+* en el primer muestreo el promedio de NMP/g fue de 185.7. El valor mayor se detectó en el muestreo de febrero a abril (214 NMP/g), mientras que en el tercer muestreo de julio a agosto presentó su menor valor (168.5 NMP/g); por lo que los valores encontrados en los tres muestreos superan el límite permisible de ausente en 50 g (NOM-242-SSA1-2009) (Fig. 18)

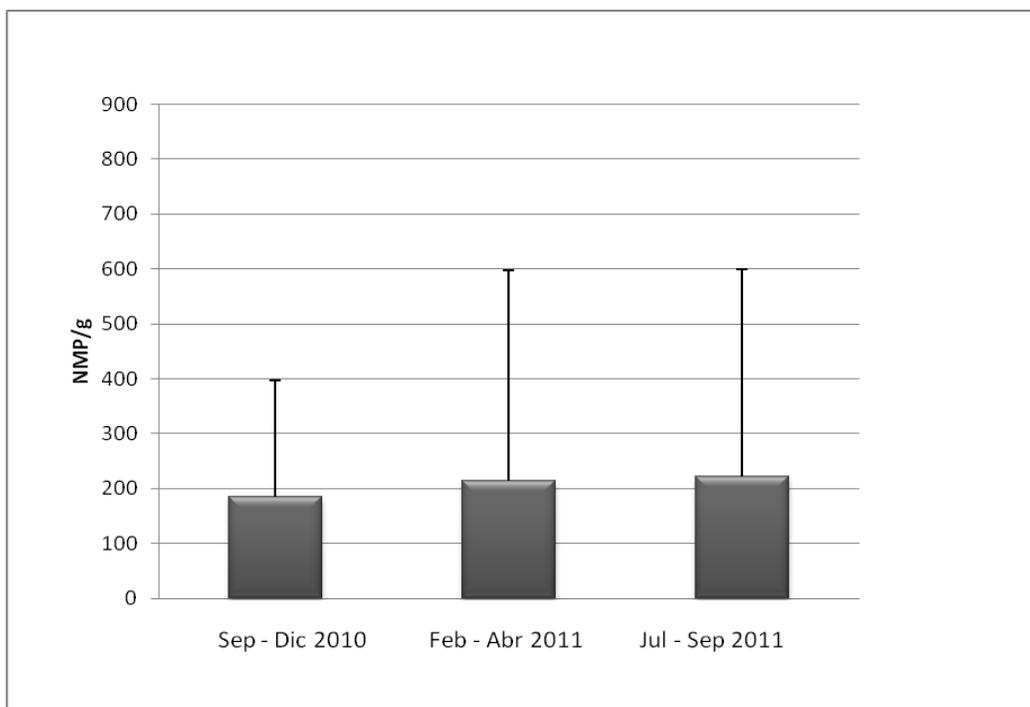


Figura 18: Promedio y desviación estándar de NMP del marcador de toxicidad *vvhA* de *Vibrio vulnificus* durante los periodos de muestreo.

Los proveedores que se encontraron más contaminados con el marcador de toxicidad *vvha+*, fueron el número 7 y el 11 durante el segundo muestreo (febrero – abril) con más de 1000 NMP/g, y los menos contaminados con este marcador fueron los proveedores 2, 5 y 12 con valores de menos de 100 NMP/g durante el segundo y tercer muestreo. El proveedor 6 no se analizó durante el segundo muestreo, sólo 3 de los 16 distribuidores fueron analizados durante el primer muestreo (6, 7 y 8 (Fig. 19).

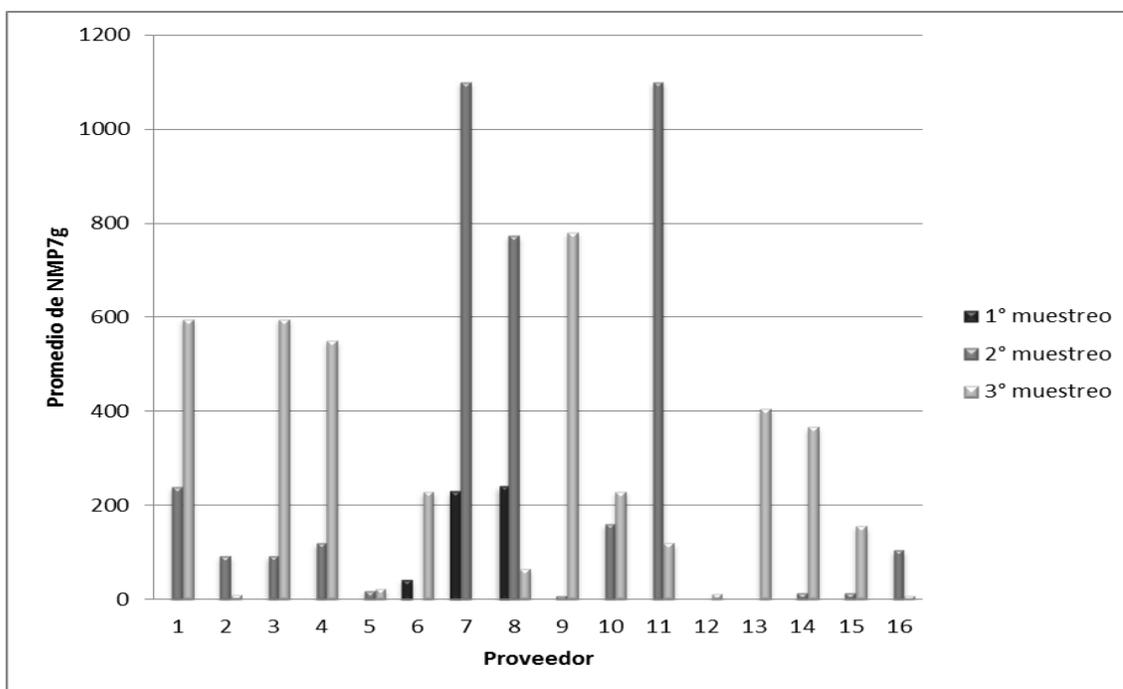


Figura 19: Promedio de NMP/g para *vvha+* de acuerdo al proveedor.

De acuerdo a la encuesta realizada a los proveedores se consideraron cuatro estados como probable origen de las muestras: Baja California, Nayarit (Tepic), Sonora y Sinaloa (Culiacán, Mazatlán, Isla de la Piedra, Agua Verde).

Durante los meses de muestreo, en las muestras que se presume provenían de Baja California, se contrastaron los niveles de NMP/g para el marcador *vvha+* (*Vibrio vulnificus*) encontrados en las muestras, con las variaciones de temperatura del agua en el probable momento de la cosecha, las cuales se obtuvieron utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontraron los niveles más altos, superiores a 200 NMP/g en los meses de abril y agosto de 2011, en el mes de marzo el nivel de NMP/g fue 0 (Fig. 20a).

También se contrastaron los datos obtenidos con la temperatura del agua al momento de la cosecha (NEO) en las muestras presuntamente provenientes de Nayarit, se presentó el nivel más alto, 600 NMP/g en septiembre de 2011 para el marcador *vvha+*, y niveles por debajo de 100 NMP/g durante septiembre de 2010 y marzo de 2011 (Fig. 20b).

En las muestras que se presume provenían de Sinaloa, se contrastaron los niveles de NMP/g encontrados en las muestras con las variaciones de temperatura del agua en el probable momento de la cosecha, utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontró el nivel más alto, superior a 200 NMP/g para el marcador *vvha+*, los demás meses de muestreo el nivel de NMP/g se encontró en 0, excepto durante abril, en el cual fue inferior a 50 NMP/g (Fig. 20c).

Para las muestras que se presuntamente provenientes de Sonora, se contrastaron los niveles de NMP/g encontrados en las muestras con las variaciones de temperatura del agua en el probable momento de la cosecha, utilizando el programa NEO (Nasa Earth Observations), se encontró el nivel más alto, superior a 1000 NMP/g para el marcador *vvha+* durante el mes de febrero de 2011. El valor menor se encontró en el mes de julio de 2011 con un valor de 0 NMP/g (Fig. 20d).

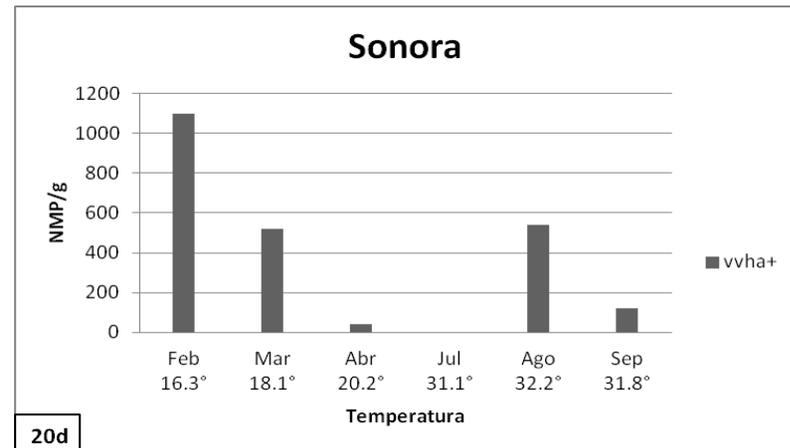
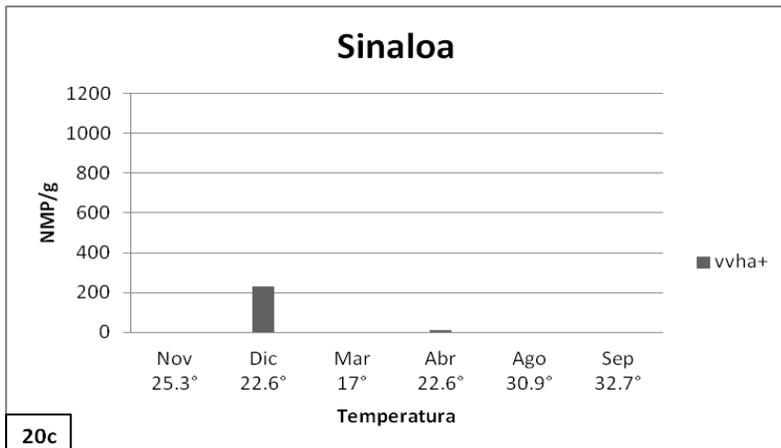
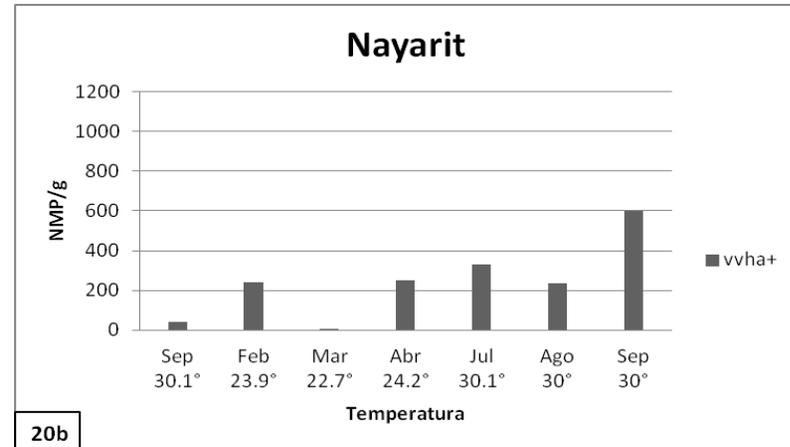
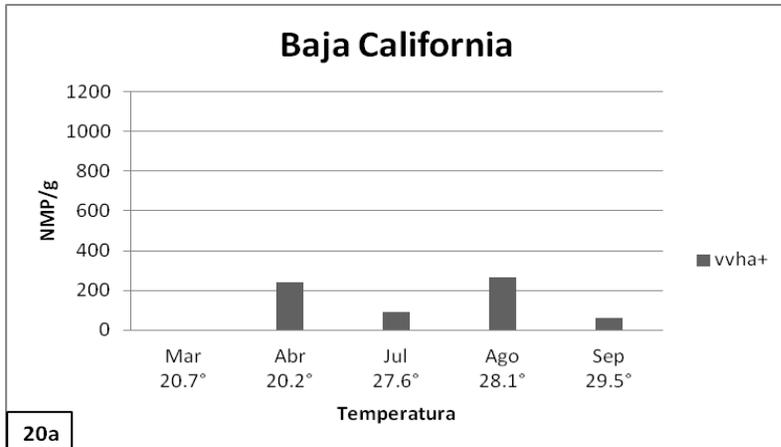


Figura 20: Variación de NMP/g del marcador *vvhaA* para *V. vulnificus toxigénico* durante los meses de muestreo, y la probable temperatura al momento de la cosecha en los presuntos lugares de origen de las muestras.

El lugar de origen que presentó una mayor contaminación del marcador de toxicidad *vvha+* (*Vibrio vulnificus*) fue Sonora con un promedio mayor a 350 NMP/g, y el que presentó una menor contaminación de *Vibrio vulnificus* toxigénico fue Sinaloa con un valor menor a 50 NMP/g (Fig. 21).

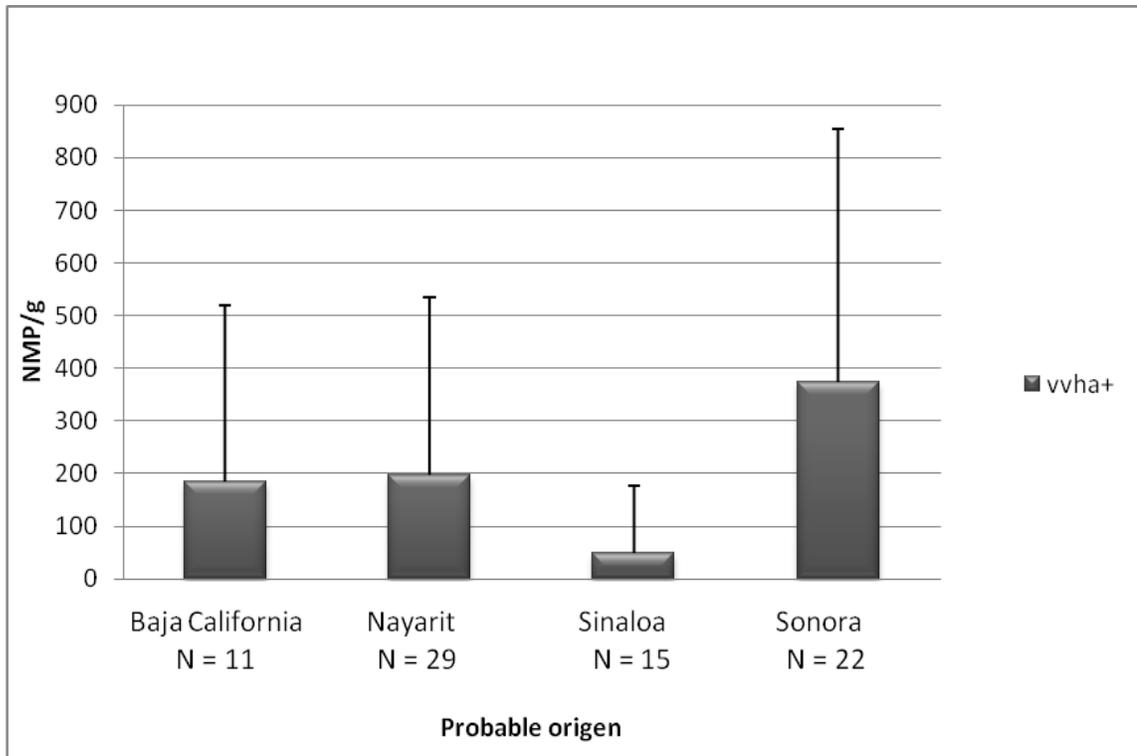


Figura 21: Promedio de NMP/g del marcador de toxicidad *vvha+* (*Vibrio vulnificus*) de acuerdo al probable origen de las muestras.

Presencia de Vibrios toxigénicos

De forma comparativa entre las dos especies de ostiones analizadas: *Crassostrea gigas* y *Crassostrea corteziensis*, se encontró un mayor porcentaje de muestras con vibrios toxigénicos (*Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos); de las 38 muestras de *Crassostrea corteziensis*, el 87% dio positivo para vibrios toxigénicos (Fig. 22 a), mientras que el 74% de las 39 muestras analizadas de *Crassostrea gigas* dio positivo para vibrios toxigénicos (Fig. 22 b).

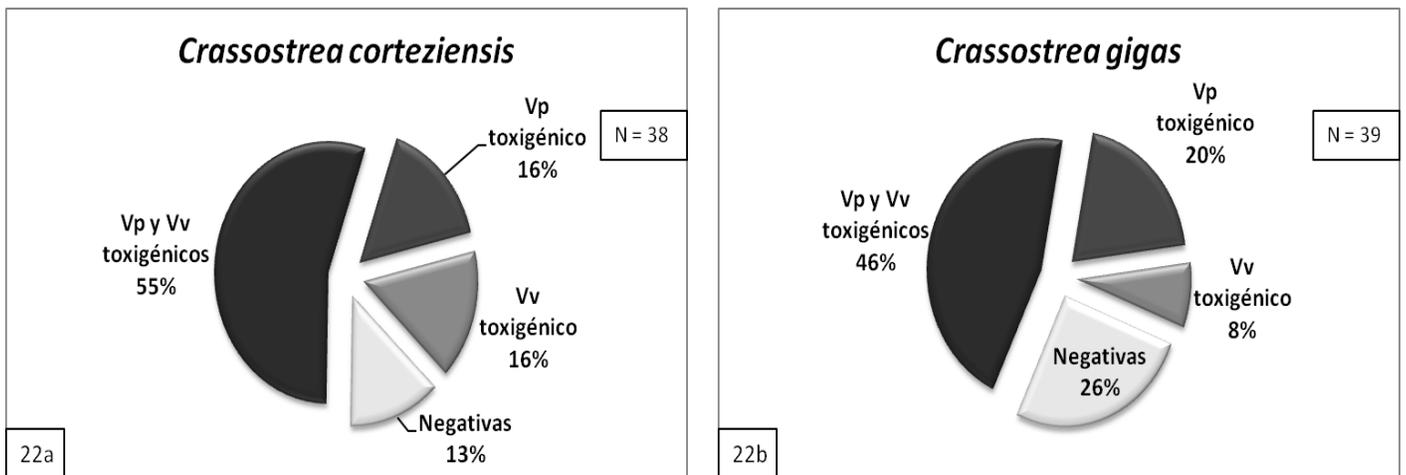


Figura 22: a) Porcentaje de vibrios toxigénicos en ostiones *Crassostrea corteziensis*. **b)** Porcentaje de vibrios toxigénicos en ostiones *Crassostrea gigas*.

En el análisis semanal se observó que durante la segunda semana (en febrero) se obtuvieron valores bajos de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico (5.7 NMP/g), sin embargo durante esta semana se obtuvo el valor más alto para *Vibrio vulnificus* toxigénico (813 NMP/g), la semana con los valores más bajos para *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos fue la tercera (en marzo) (Fig. 23).

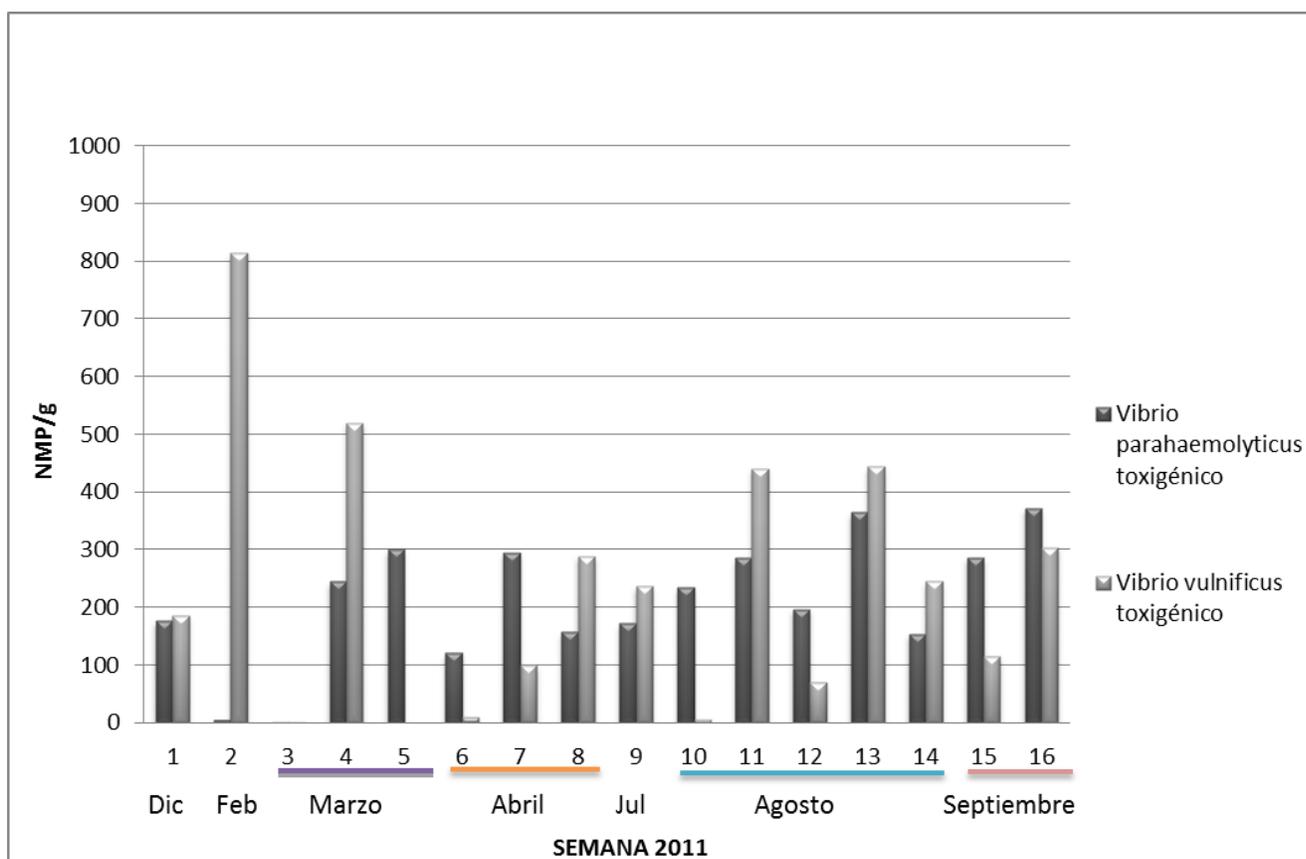


Figura 23: Cuantificación semanal de *Vibrio parahaemolyticus* (*tdh* y/o *trh* positivos) y *Vibrio vulnificus* (*vvhA* positivos).

Se observó un valor menor para el promedio de marcadores de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos durante el primer periodo de muestreo (septiembre a diciembre de 2010), mientras que el promedio más alto se registró en el tercer periodo de muestreo (julio a septiembre de 2011) (Fig. 24).

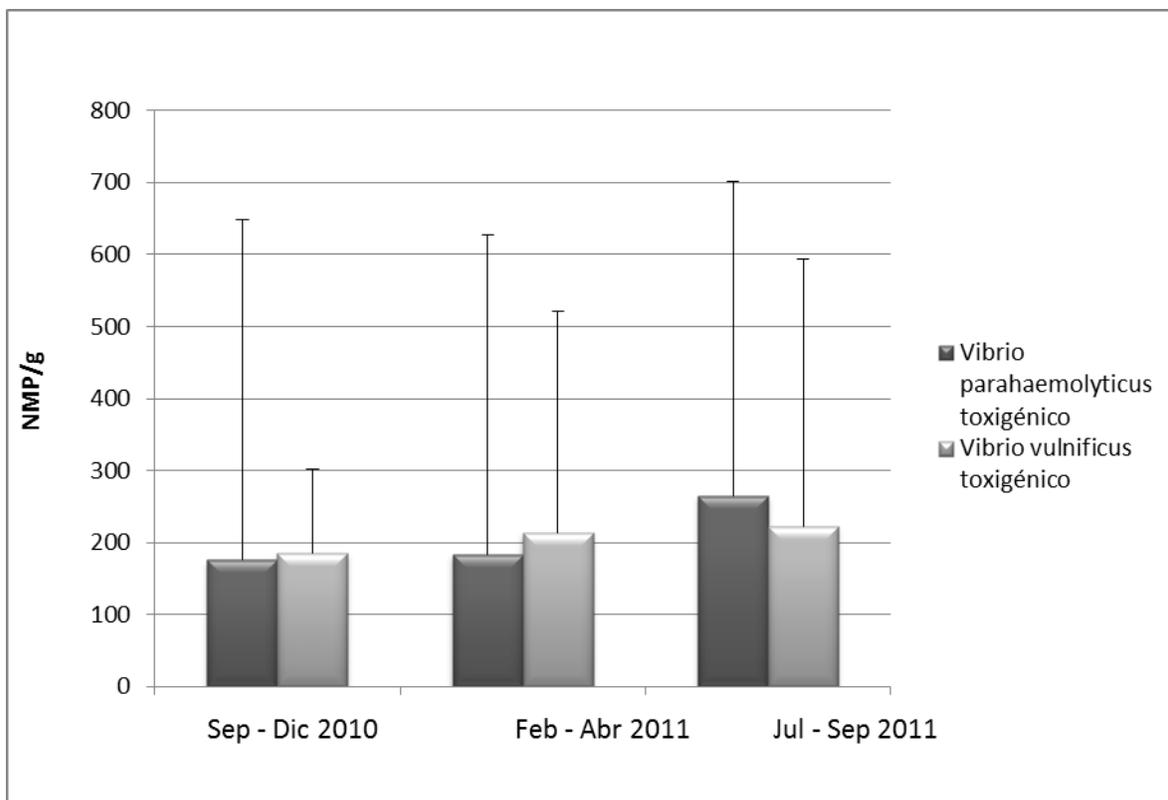


Figura 24: Promedio de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos durante los periodos de muestreo.

De acuerdo a los proveedores, en el que se encontraron los valores menores para *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénico se encontraron en el proveedor 5 durante los tres periodos de muestreo, con valores por debajo de 50 NMP/g para ambos vibrios toxigénicos (Fig. 25).

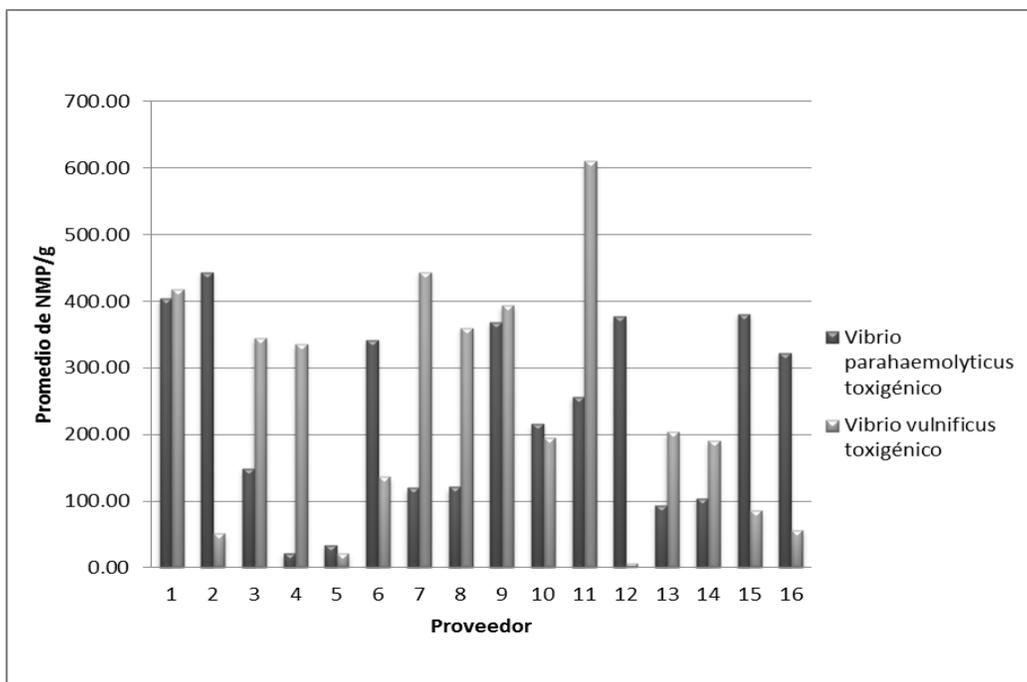


Figura 25: Cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos de acuerdo al proveedor.

De acuerdo al probable origen se encontraron en Baja California niveles superiores a 800 NMP/g durante el mes de marzo para *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico, durante ese mes se encontró un valor de cero para *Vibrio vulnificus* toxigénico cuando la temperatura del agua se encontraba a 20.7 °C (Fig. 26a).

En Nayarit se encontraron niveles por debajo de 20 NMP/g durante el mes de marzo *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénico cuando se registró el promedio de temperatura superficial del agua más baja en este estado (22.7°), los valores más altos se registraron en el mes de septiembre de 2011 cuando la temperatura del agua se encontraba a 30° (Fig. 26b).

En Sinaloa se encontraron los niveles más bajos para *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos, durante el mes de marzo se encontraron valores de cero para ambos vibrios toxigénicos, cuando la temperatura del agua se encontraba más baja (17° C); los valores más altos se registraron en diciembre, cuando la temperatura se encontraba en 22.6° C (Fig. 26c).

En Sonora se encontraron niveles de cero durante el mes de julio, cuando la temperatura del agua se encontraba a 31.1° C. Durante el mes de febrero se encontraron valores superiores a 800 NMP/g para *Vibrio vulnificus* toxigénico, mientras que el promedio para *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico fue inferior a 5 NMP/g (Fig. 26d).

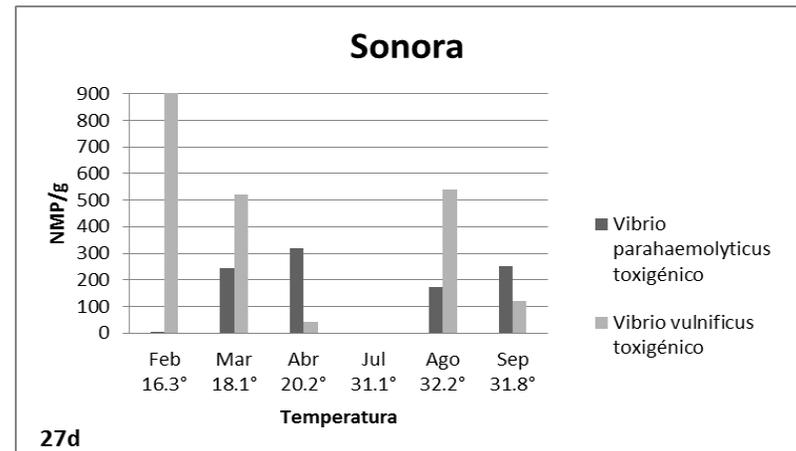
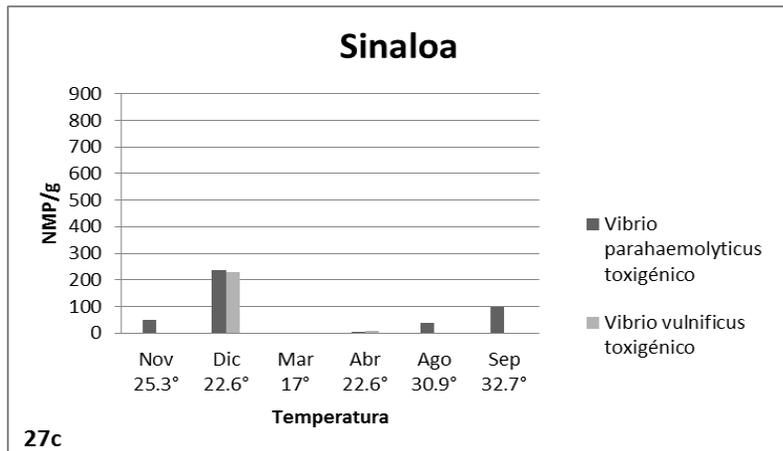
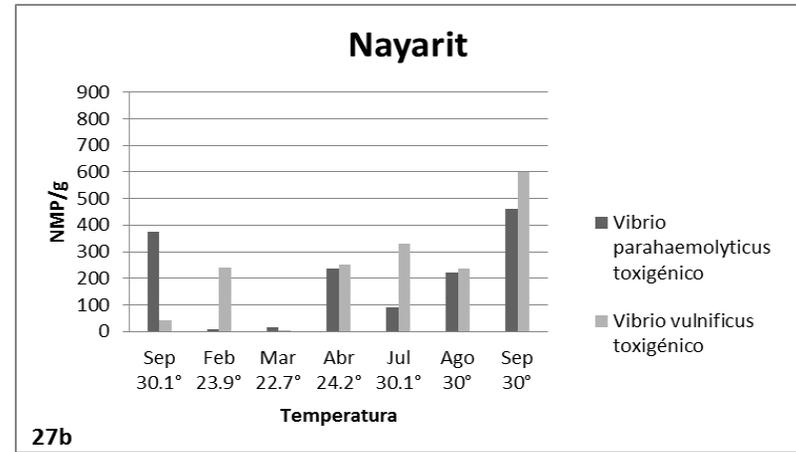
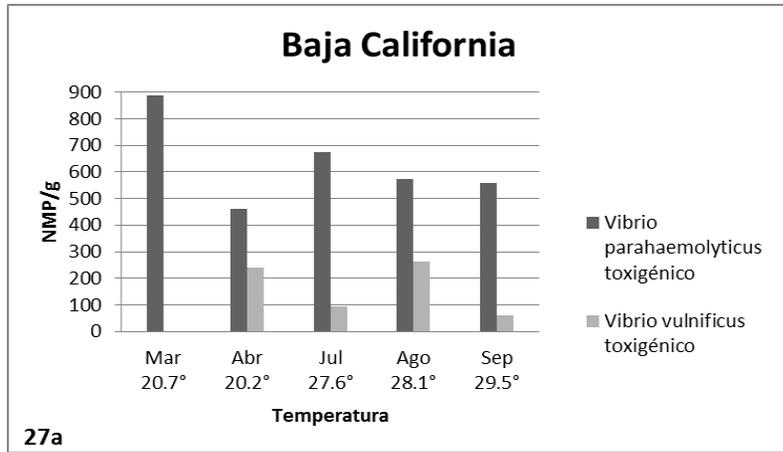


Figura 26: Variación de NMP/g de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos durante los meses de muestreo y la probable temperatura al momento de la cosecha en el presunto lugar de origen.

Aislamiento de Colonias Toxigénicas

En ninguna de las muestras se obtuvieron resultados positivos para *ompW* (*Vibrio cholerae*). A partir de las muestras 12 y 13 se aisló en chromagar una cepa de *Vibrio vulnificus* (Fig. 27), la cual se añadió a la colección como R2768 el día 15 de marzo de 2011. A partir de la muestra 17 se aisló de chromagar una cepa de *Vibrio parahaemolyticus*, la cual se añadió a la colección como R2770 el día 1° de abril de 2011.

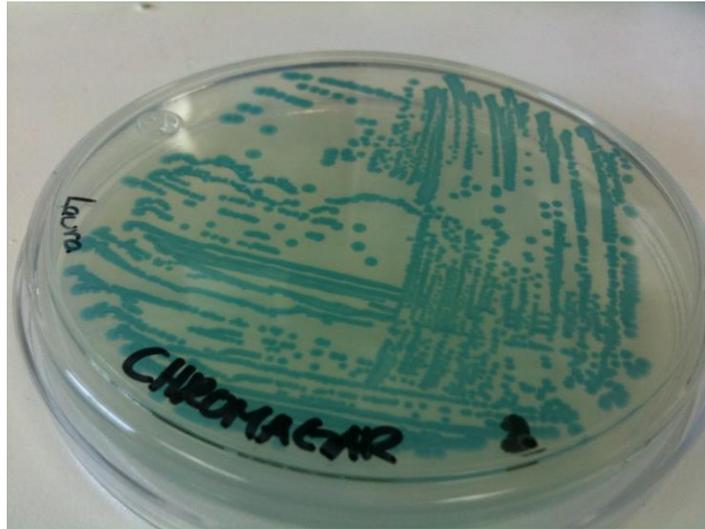


Figura 27: *Vibrio vulnificus* aislado en chromagar a partir de la muestra 13.

Análisis de riesgos microbiológicos

Se obtuvo información acerca de los hábitos de consumo de ostión en Mazatlán; de acuerdo con la encuesta realizada a los distribuidores los compradores son principalmente dueños de restaurantes, dueños de negocios informales o carretas y compradores particulares (Fig. 28).

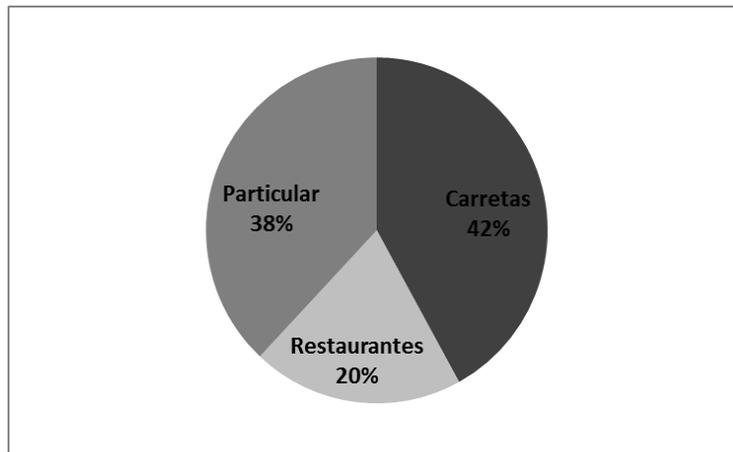


Figura 28: Porcentaje de compradores de ostión en las comercializadoras.

De acuerdo a estos datos las especies que se comercializan son el ostión de placer (*Crassoatrea corteziensis*) y el ostión de piedra (*Crassostrea gigas*) (Tabla 6). La procedencia reportada de los ostiones es imprecisa, se reporta sólo el nombre del estado (Nayarit, Sonora y Baja California); mientras que en otros casos se menciona la ciudad (Culiacán y Mazatlán) o incluso la localidad (Agua Verde, Rosario, Sinaloa e Isla de la Piedra (Mazatlán, Sinaloa). Los compradores más regulares son los dueños de negocios informales como carretas, cada uno compran en promedio 30 piezas de ostión de piedra y/o 1 kg (25 piezas) de ostión de placer; y los compradores particulares, que adquieren en promedio 12 piezas

de ostión de piedra y aproximadamente 0.5 kg (12 piezas) de ostión de placer por día 5 veces por semana.

Con los datos obtenidos de las ventas diarias, se determinó que en promedio en un día un comercializador vende 5 docenas de ostión de piedra (*Crassostrea gigas*) y 4 docenas de ostión de placer (*Crassostrea corteziensis*), es decir 9 docenas de ostión por comercializador.

Es decir que diariamente se venden en Mazatlán 144 docenas de ostión, lo que equivale a 1728 ostiones, asumiendo que una persona consume media docena de ostiones se calculó que 288 personas consumen ostiones diariamente, y si el consumo es una vez al año se determinó que 105,120 personas habrían consumido ostiones en un año, lo que representaría el 23.9% de la población de Mazatlán (438,434 habitantes de acuerdo al INEGI, 2010); asumiendo que sólo consumen ostiones una vez al año; el principal intervalo de edad de consumidores de ostión crudo en Mazatlán es de 17 a 50 años, principalmente del sexo masculino.

Resultados de Encuesta a Distribuidoras de Ostión en Mazatlán						
Nombre común	Nombre científico	Ventas en %	Precio	Consumo por cliente		Promedio ventas diarias
				Carretas/ Restaurantes	Particular	
Ostión de piedra	<i>Crassostrea gigas</i>	59%	\$5.00 - \$7.00 c/u	30 pzas	12 pzas	72 piezas
Ostión de placer	<i>Crassostrea corteziensis</i>	41%	\$35.00 kg.	25 pzas	12 pzas	32 piezas

Tabla 6. Resultados de la encuesta realizada a distribuidores de ostión en Mazatlán, Sin.

En cuanto al manejo que se le da a los ostiones, éstos pueden permanecer almacenados de 2 a 4 días, se almacenan en cajas de cartón, en jabas de plástico, hieleras o a la intemperie (Anexo 3); lo más usual es venderlas cerradas cuando es para venta en carretas; o abiertas, por docenas y en bolsitas de plástico o vasos de plástico cuando los compradores son particulares. La temporada en la que las ventas son mayores es Semana Santa con un porcentaje de 78% contra las ventas en verano durante el cual el porcentaje es de 22%.

Con los datos obtenidos mediante análisis moleculares y los porcentajes de muestreos que resultaron positivos para vibrios toxigénicos se determinó el riesgo al que se encuentra expuesta la población de Mazatlán al consumir ostiones crudos; con la bibliografía recopilada y utilizando la información obtenida en las comercializadoras, se ingresaron los datos en el programa Risk Ranger para *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus* toxigénicos en ostiones crudos

comercializados en Mazatlán. No se utilizó este software con *Vibrio cholerae* ya que no se obtuvieron datos positivos de éste.

Vibrio parahaemolyticus.

Utilizando el programa Risk Ranger se determinó que en la población de interés 105,120 habitantes (23.9% de la población de Mazatlán), hay una posibilidad de cinco enfermos por cada 1000 habitantes, es decir un máximo de 21,000 enfermos (19.9%) en la población de interés pueden enfermar al año, debido al consumo de ostión crudo contaminado con *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico.

De acuerdo a los datos obtenidos en el Centro de Salud de Mazatlán, los casos de enfermedades gastrointestinales registrados durante el periodo de muestreo fueron en total 28,217 (*Fig. 29*) de los cuales 21,706 corresponden a infecciones intestinales por “otros”, 686 a “intoxicación alimentaria bacteriana” y 435 a “otras infecciones intestinales debidas” (este dato es impreciso ya que no se especifica la causa que las ocasionó) para el grupo de edad en el cual se encuentran los principales consumidores de ostiones (17 a 50 años), dentro de los cuales se podrían encontrar los 21,000 casos calculados de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico.

Para realizar esta estimación se introdujeron los datos obtenidos mediante recopilación bibliográfica, la encuesta realizada a los vendedores de ostiones y los datos obtenidos de los análisis moleculares al programa Risk Ranger, el cual

analiza la susceptibilidad del individuo a enfermar por *V. parahaemolyticus*, la información es general ya que puede afectar a todos los miembros de la población, mientras que la información referente a la severidad del peligro es menor, ya que el paciente raras veces busca ayuda médica para tratar una infección por *V. parahaemolyticus*.

El programa Risk Ranger también toma en cuenta datos como el tamaño de la población de interés y la proporción de ésta que consume el alimento; así como la frecuencia de consumo del mismo; y la probabilidad de que el alimento contenga una dosis infecciosa.

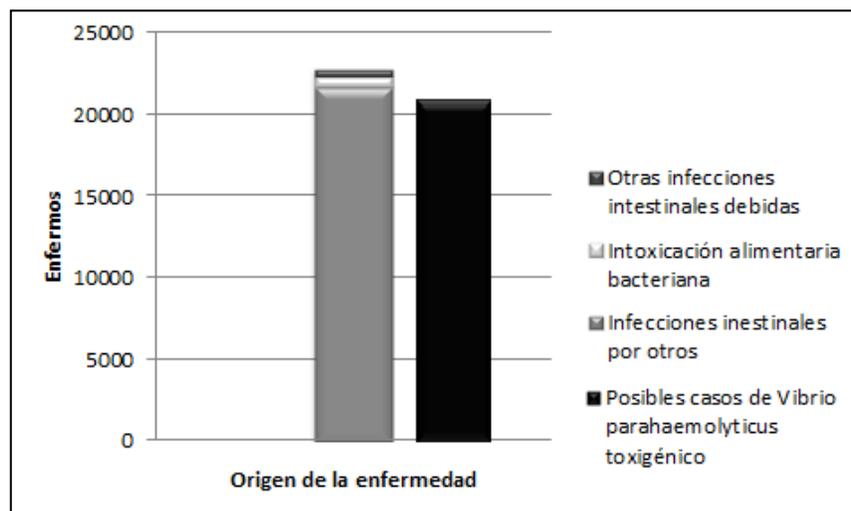


Figura 29: Enfermedades gastrointestinales registradas durante el tiempo de muestreo y posibles casos de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico.

Vibrio vulnificus.

De acuerdo a los datos obtenidos en Centro de Salud de Mazatlán, el 0.6% de la población de Mazatlán es inmunocomprometido, es decir que presentan enfermedades como SIDA, cáncer, diabetes, cirrosis hepática u otras que afectan su sistema inmune; este porcentaje representa el 2.6% de la población de interés (105,120) en total 2,733 individuos son susceptibles a enfermarse por *Vibrio vulnificus*. Utilizando el programa Risk Ranger se determinó que en la población de interés hay una posibilidad de 27 enfermos al año (0.02%) debido al consumo de ostión crudo contaminado con *Vibrio vulnificus* toxigénico.

Considerando que la mortalidad por *Vibrio vulnificus* es de 50% (Harwood *et al*, 2004), existe una posibilidad de 13 muertes al año debido al consumo de ostiones contaminados con *Vibrio vulnificus* toxigénico.

En Sinaloa, en 2008 hubo 44 muertes por septicemia en personas de edad reproductiva, una tasa de 2.5 por cada 100,000 habitantes; dentro de los cuales se podría considerar que 13 pudieron ser ocasionadas por *Vibrio vulnificus* toxigénico.

X. DISCUSIONES

El análisis de las muestras en busca de *Vibrio cholerae* fue negativa, indicando ausencia total de este microorganismo. Se tomaron en cuenta los límites permisibles establecidos en la Norma Oficial Mexicana 242-SSA1-2009 para productos de la pesca frescos, refrigerados y congelados (DOF, 2011), los cuales se establecen como ausente en 50g.

Se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* toxigénico en 69% de las 77 muestras analizadas, un porcentaje significativamente más alto que el reportado por Cabrera-García y colaboradores en 2004, quienes encontraron presencia de *V. parahaemolyticus* en 15% de 266 muestras analizadas.

La presencia de *V. parahaemolyticus* toxigénico se mantuvo constante sin verse afectada por los cambios de temperatura debido a que en las costas del Pacífico mexicano la temperatura del agua no se encontró por debajo de los 15° C, temperatura a la cual los valores de *V. parahaemolyticus* toxigénico podrían variar significativamente (DePaola *et al.*, 2000). Por otra parte se observó una mayor variación de estos valores dependiendo del supuesto origen de las muestras, lo cual puede deberse a la contaminación inicial en el lugar de recolección, el traslado de los ostiones y el manejo que se les da en los lugares de distribución; sin embargo, para poder determinar si la contaminación ocurre en el presunto lugar de origen sería necesario hacer el análisis antes del traslado de los

ostiones; además el posible lugar de origen de la muestra no es confiable ya que los proveedores no conocían bien este dato o no lo podían especificar.

Es importante mencionar que aunque la NOM-242-SSA1-2009 determina los límites permisibles para *V. parahaemolyticus* en 10^4 NMP/g, no existen en México regulaciones sobre el manejo y traslado de los ostiones de un lugar a otro; un mal manejo y/o almacenamiento durante el traslado pudiera ocasionar una proliferación de *V. parahaemolyticus* en los ostiones contaminados si no se mantienen en refrigeración, lo que pudiera ser confirmado con el resultado de *V. parahaemolyticus* que presentó valores menores en Sinaloa, donde es de suponer que el traslado a los proveedores es más breve pues no tienen que ser trasladados desde otro estado.

La presencia de una muestra positiva para el marcador ORF8, marcador molecular de la cepa pandémica O3:K6, debe alertar sobre la presencia de esta cepa en los ostiones comercializados en Mazatlán, Sinaloa; por lo que en el futuro pudiera ocurrir otro brote infeccioso de *V. parahaemolyticus* toxigénico como el registrado en 2003 y 2004 en el estado de Sinaloa (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006), durante el cual se reportaron más de 1230 casos de gastroenteritis ocasionado por la cepa pandémica de *V. parahaemolyticus*.

Para el caso de *Vibrio vulnificus* es difícil tener una referencia ya que la bibliografía al respecto es relativamente reciente, en 2003 se publicó un artículo sobre la prevalencia de *V. vulnificus* en alimentos marinos en Quintana Roo, y en

diciembre de 2010 se publicó el primer informe sobre aislamiento de cepas de esta bacteria en el Golfo de México, donde se evidenció su presencia como un riesgo para la salud de consumidores de mariscos (Baizabal-Ramirez *et al.*, 2011).

No se encontraron muestras dentro de los parámetros permitidos de acuerdo a la NOM-242-SSA1-2009 que establece el límite para *Vibrio vulnificus* como ausente en 50g, por lo que consumo de ostiones crudos comercializados en el puerto de Mazatlán, Sinaloa, conlleva un riesgo a la salud de los consumidores susceptibles o con condiciones crónicas preexistentes; en México se han registrado dos casos de infección por *V. vulnificus* en 1994 y en 2000, sin embargo es probable que su prevalencia esté subregistrada, debido a la baja sospecha de infecciones por *V. vulnificus* y a los pocos aislamientos en pacientes. Hasta la fecha la enfermedad de *V. vulnificus* asociada a los mariscos se ha vinculado casi exclusivamente a los ostiones (Dalsgaard *et al.*, 2001).

Aunque Sinaloa fue el presunto lugar de origen con valores más bajos para *Vibrio vulnificus*, lo cual puede relacionarse al manejo y traslado de los ostiones, no se puede considerar como seguro el consumo de ostiones provenientes de Sinaloa, ya que no se encontró ausente.

Para realizar el análisis de riesgos microbiológicos se utilizó el programa Risk Ranger adaptado a la población de Mazatlán (438,434 habitantes) se determinó que en un año en la población de Mazatlán se pueden encontrar 21,000 casos de intoxicación por consumir ostiones contaminados con *Vibrio*

parahaemolyticus toxigénico, un valor superior al reportado por Cabanillas-Beltrán y colaboradores en 2006, sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en el Centro de Salud de Mazatlán, se reportaron 28,217 casos de enfermedades gastrointestinales en el grupo de edad de interés (17 a 50 años) durante el tiempo de muestreo, dentro de los cuales podrían incluirse los 21,000 casos calculados, aunque este dato es insuficiente pues en las categorías que se mencionan no son específicas o son ambiguas como el caso de “infecciones intestinales por otros” y “otras infecciones intestinales debidas”, por lo que la estimación no es precisa, y se complica por el hecho de que se suele desconocer la relación entre las enfermedades observadas y las pronosticadas. En los Estados Unidos se ha estimado que la proporción entre las enfermedades pronosticadas y observadas es de 20 a 1 (Mead *et al.*, 1999); sin embargo, esta relación no se ha calculado para otros países, pero se puede deducir que aunque difiera, la proporción puede ser aproximada a este valor de 20 a 1.

Vibrio vulnificus afecta especialmente a quienes tienen condiciones inmunocomprometidas y/o enfermedades crónicas del hígado. Se sabe que aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes con infecciones de *V. vulnificus* tienen enfermedades adyacentes hepáticas u otra enfermedad inmunocomprometida (Oklahoma State Department of Health, 2005), por esta razón se obtuvieron datos en el Centro de Salud de Mazatlán acerca de personas con sistema inmuno-comprometido para realizar el análisis de riesgos de *Vibrio vulnificus*. Con estos datos se calculó que el 2.6% de la población es susceptible a enfermar por el consumo de ostiones contaminados con *Vibrio vulnificus*, este

valor podría incrementarse en un año debido al gran aumento de casos de diabetes en el puerto de Mazatlán, se determinó que existe la posibilidad de que se intoxiquen 27 personas al año, y considerando que el índice de mortalidad por *Vibrio vulnificus* es de 50% (Harwood *et al*, 2004) puede haber 13 muertes en un año debido al consumo de ostiones crudos contaminados con *Vibrio vulnificus* toxigénico. Sin embargo en Sinaloa no se han reportado casos de enfermedad o muerte debido a *Vibrio vulnificus*, lo cual puede deberse a los pocos casos clínicos reportados en la literatura y probablemente los síntomas sean confundidos con otras enfermedades similares, sería importante sospechar de *V. vulnificus* en pacientes que presenten choque séptico y lesiones cutáneas y se hallan encontrado expuestas a consumo de ostiones crudos (Baizabal-Ramirez *et al.*, 2011), de esta forma podría tenerse un dato más exacto sobre los casos de *V. vulnificus* en México. De forma preventiva sería importante que las personas con inmunocompromiso, como se mencionó anteriormente, eviten el consumo de ostiones crudos.

XI. CONCLUSIONES

- Se comprobó que la metodología basada en la técnica del Número Más Probable es más efectiva que la técnica del Conteo Total Cultivable debido a que tiene una mayor sensibilidad.
- No se encontró presencia de *Vibrio cholerae (ompW)* en ninguna de las muestras analizadas.
- Más del 60% de las muestras de ostiones comercializados que se analizaron resultaron positivas para *tlh*, *tdh* y/o *trh* (*Vibrio parahaemolyticus*) y *vvhA* (*Vibrio vulnificus*).
- Durante el mes de diciembre se encontraron los valores más altos de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico, sin embargo de septiembre a diciembre de 2010 los resultados indicaron una menor probabilidad de enfermar por una intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus* al consumir ostión crudo.
- Los resultados indicaron una menor probabilidad de enfermar por una intoxicación de *Vibrio parahaemolyticus* al consumir ostiones de los proveedores 4 y 5, localizados en el Puente Juárez (fig. 1).
- Los valores más altos de *Vibrio parahaemolyticus* se encontraron en ostiones presuntamente provenientes de Baja California a pesar de que la temperatura promedio estimada fue más baja que en los otros lugares de origen de los ostiones.

- En ostiones de Sinaloa se encontraron los valores más bajos de *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico.
- Durante el mes de febrero se encontraron los valores más altos de *Vibrio vulnificus* toxigénico, cuando la temperatura superficial del agua fue de 19.8°C.
- En promedio de septiembre a diciembre los resultados indicaron una menor probabilidad de enfermar por una intoxicación por *Vibrio vulnificus* al consumir ostión crudo, por lo que las personas que consumen ostiones crudos durante la temporada de Semana Santa y verano se encuentran más expuestas a enfermar por *V. vulnificus*.
- Durante ningún periodo de muestreo o proveedor los valores se encontraron dentro del límite permisible de acuerdo a la NOM-242-SSA1-2009 (ausente en 50 g), por lo que en cualquier mes existe el riesgo de enfermar por el consumo de ostiones crudos contaminados con *Vibrio vulnificus* toxigénico.
- Los valores más altos de *Vibrio vulnificus* se encontraron en Sonora, y los más bajos en Sinaloa.
- Se determinó que al consumir ostiones crudos pertenecientes a la especie *Crassostrea gigas* provenientes de Sinaloa obtenidos del proveedor 5, localizado en el Puente Juárez, la probabilidad de enfermar por *Vibrio parahaemolyticus* y *V. vulnificus* toxigénicos es menor.

- De acuerdo a los datos obtenidos de las encuestas realizadas se calculó que el 23.9% de la población de Mazatlán consume ostiones crudos por lo menos una vez al año.
- Se estimó que en la población de Mazatlán pudiera haber hasta 21,000 casos de enfermedad por intoxicación con *Vibrio parahaemolyticus* toxigénico al consumir ostiones contaminados durante el periodo de julio a septiembre.
- Se estimó que en la población de Mazatlán puede haber 27 casos de enfermedad y hasta 13 decesos por intoxicación con *Vibrio vulnificus* toxigénico al consumir ostiones contaminados durante el periodo de julio a septiembre.
- Gracias al análisis microbiológico y molecular de las muestras obtenidas de los ostiones comercializados en Mazatlán, se pudo estimar que la población consumidora de estos bivalvos se encuentra en riesgo de intoxicación por *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*.

XII. RECOMENDACIONES

- Analizar los ostiones en el sitio de extracción para determinar la carga bacteriana inicial y su relación con la temperatura al momento de la cosecha.
- Mejorar y actualizar el programa Risk Ranger con datos que se adapten mejor a la población de Mazatlán.
- Incluir en la encuesta a los proveedores si conocen la NOM-242-SSA1-2009.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Austin B. 2009. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140. 310-317.
- Aznar, R.; W. Ludwig, R. I. Amann, K. H. Schleifer. 1994. Sequence determination of rRNA genes of pathogenic *Vibrio* species and whole – cell identification of *Vibrio vulnificus* with rRNA – targeted oligonucleotide probes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44. 330-337.
- Blake, P. A.; M. H. Merson, R. E. Weaver, D. G. Hollis, P. C. Heublein. 1979. Disease caused by a marine *Vibrio*. Clinical characteristics and epidemiology. *The New England Journal of Medicine* 300. 1-5.
- Blake, P. A.; R. W. Weaver, D. G. Hollins. 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annual Review of Microbiology* 34. 341-367.
- Bross, M. H.; K. Soch, R. Morales, R. B. Mitchell. 2007. *Vibrio vulnificus* Infection: Diagnosis and Treatment. *American Family Physician* 76. 539-544.
- Castañeda Chávez, M. R.; V. Pardo Seda, E. Orrantia Borunda, F. Lango Reynoso. 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster – producing areas of Veracruz, México. *Marine Pollution Bulletin* 50. 1641-1648.
- Comisión del Códex Alimentarius (CCA). 1999. Principios y Directrices para la Aplicación de la Evaluación de Riesgos Microbiológicos. CAC/GL 30. 1-6.

- Cavallo, R. A. y L. Stabili. 2002. Presence of vibrios in seawater and *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea). Water Research 36. 3719-3726.
- Center for Disease Control (CDC). 2006. *Vibrio parahaemolyticus* Infections Associated with Consumption of Raw Shellfish – Three States. Morbidity and Mortality Weekly Report 55. 1-2.
- Cabanillas-Beltrán, H.; E. Llausás-Magaña, R. Romero, A. Espinoza, A. García-Gasca, M. Nishibuchi, M. Ishibashi, B. Gomez-Gil. 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6 in Mexico. FEMS Microbiology Letters 265. 76-80.
- Daniels, N.A., L. MacKinnon, R. Bishop, S. Altekuse, B. Ray, R. M. Hammond, S. Thompson, S. Wilson, N. H. Bean, P. M. Griffin, L. Slutsker. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. The Journal of Infectious Diseases 181. 1661-1666.
- DePaola, A. y Gyu-Chul H.. 1995. Effect of dilution, incubation time, and temperature of enrichment on cultural and PCR detection of *Vibrio cholerae* obtained from the oyster *Crassostrea virginica* Molecular and Celular Probes 9. 75-81.
- DePaola, A.; C. A. Kaysner, J. Bowers, D. W. Cook. 2000. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas and New York (1997 and 1998). Applied and Environmental Microbiology 66. 4649-4654.

- Drake, S. L.; A. DePaola, L. Jaykus. 2007. An Overview of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 6. 120-144.
- Espiñeira, M.; M. Atanassova, J. M. Vieites, F. J. Santaclara. 2010. Validation of a method for the detection of five species, serogroups, biotypes and virulence factors of *Vibrio* by multiplex PCR in fish and seafood. Food Microbiology 27. 122-131.
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1999. World review of fisheries and aquaculture. Fisheries resources: trends in production, utilization and trade. FAO.org. Available in:

<http://www.fao.org/docrep/003/x8002e/x8002e04.htm>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2005. Risk assessments of *Vibrio vulnificus* in raw oysters. Microbiological Risk Assessments Series 8. Available in:

<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/a0252e/a0252e00.pdf>
- Gómez-Gil, B. y L. Lizárraga P. 2010. Análisis de *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. cholerae* en productos pesqueros por método combinado de microbiología (NMP) y biología molecular. Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social. Versión 2.1
- Gopal, S.; S. K. Otta, S. Kumar, I. Karunasagar, M.Nishibuchi, I. Karunasagar. 2005. The occurrence of *Vibrio* species in tropical shrimp culture environments; implications for food safety. International Journal of Food Microbiology 102. 151-159.

- Gubala, A. J. 2005. Multiplex real – time PCR detection of *Vibrio cholerae*. Journal of Microbiological Methods 65. 278-293.
- Gulig, Paul A.; K. L. Bourdage, A. M. Starks. 2005. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. The Journal of Microbiology 43. 118-131.
- Harwood, V. J.; J. P. Gandhi, A. C. Wriarth. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. Journal of Microbiological Methods 59. 301-316.
- Honda, S.; I. Goto, I. Minematsu, N. Ikeda, N. Asano, M. Ishibashi, Y. Kinoshita, M. Nishibuchi, T. Honda, T. Miwatani. 1987. Gastroenteritis due to Kanagawa negative *Vibrio parahaemolyticus*. The Lancet 329. 331-332.
- Interstate Shellfish Sanitation Conference. (ISSC) 2007. *Vibrio Vulnificus*. Fact Sheet for Health Care Providers.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (INEGI) 2010. Población total según sexo, viviendas habitadas e indicadores seleccionados por municipio. Censo de Población y Vivienda 2010. Disponible en:
<http://www.inegi.org.mx/sistemas/TabuladosBasicos/preliminares2010.aspx>
- Jackson, J. K.; R. L. Murphree, M. L. Tamplin. 1997. Evidence that Mortality from *Vibrio vulnificus* Infection Results from Single Strains among Heterogeneous Populations in Shellfish. Journal of Clinical Microbiology 35. 2098-2101.
- Jiménez-Corona, A.; L. Gutiérrez-Cogio, S. López-Moreno, R. Tapia-Conyer. 1995. El cólera en México. Situación epidemiológica actual. Gaceta Médica de México 131. 363-366.

- Jones, M. K., y J. D. Oliver. 2009. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity* 77. 1723-1733.
- Joseph, S. W.; R. R. Colwell, J. B. Kaper. 1982. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios. *Critical Reviews in Microbiology* 10. 77-124.
- Kaper, J. B.; R. K. Campen, R. J. Seidler, M. M. Baldini, S. Falkow. 1984. Cloning of the Thermostable Direct or Kanagawa Phenomenon – Associated Hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infection and Immunity* 45. 290-292.
- Kumate, J.; J. Sepúlveda, G. Gutiérrez 1993. El cólera: epidemias, endemias y pandemias. Interamericana-McGrawHill, México.
- Lewis, P. R.; L. Cook, J. Drewitt–Smith, A. D. McEwen, L. V. Granger. 2005. Septicaemia secondary to *Vibrio vulnificus* cellulitis. *Communicable Diseases Intelligence* 29. 305 – 307.
- McLaughlin, J. B.; A. DePaola, C. A. Bopp, K. A. Martinek, N. P. Napolilli, C. G. Allison, S. L. Murray, E. C. Thompson, M. M. Bird, J. Middaugh. 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. *The New England Journal of Medicine* 353. 1463-1470.
- Melchor-Aragón, J.M.; D. Chávez-H., C. Acosta-Castañeda, R. Bush-M. 1996. Diagnóstico de la Pesquería de Ostión de Roca, *Crassostrea iridescens*, en las costas de los municipios de Mazatlán y de San Ignacio, Sinaloa. CRIP-Mazatlán, IPN-SEMARNAP. Boletín Informativo 27. 25-45.

- Molenda, J. R.; W. G. Johnson, M. Fishbein, B. Wentz, Ira J. Mehlman, Thoburn A. Dadisman JR. 1972. *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis in Maryland: Laboratory Aspects. Applied Microbiology 24. 444-448.
- Molero, X; R. M. Bartolomé, T. Vinuesa, L. Guarner, A. Acarino, F. Casellas, R. García. 1989. Acute gastroenteritis due to *Vibrio parahaemolyticus* in Spain: presentation of 8 cases. Medicina Clínica 92. 1-4.
- Nishibuchi, M., y J. B. Kaper. 1995. Thermostable Direct Hemolysin Gene of *Vibrio parahaemolyticus*: a virulence gene acquired by a marine bacterium. Infection and Immunity 63. 2093-2099.
- Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009. 2011. Productos y Servicios. Productos de la pesca, frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. 2011. Diario Oficial de la Federación. Disponible en:
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5177531&fecha=10/02/2011
- Oklahoma State Department of Health (OSDH). 2005. *Vibrio vulnificus*. Hoja Informativa de Salud Pública. Acute disease service.
- Environmental Health Science Center. 2004. John Snow and The Cholera Epidemic. Mysterious Illness Outbreak Scenario. Disponible en:
<http://ehsc.oregonstate.edu/files/ehsc7/John%20Snow%202005.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (OMS) 2014. Epidemias Mundiales e Impacto del Cólera. Temas de Salud. Cólera. Disponible en:
<http://www.who.int/topics/cholera/impact/es/>

- Ottaviani, D.; F. Leoni, E. Rocchegiani, S. Santarelli, L. Masini, V. Di Trani, C. Canonico, A. Pianetti, L. Tega, A. Carraturo. 2009. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 132. 47-53.
- Reidl, J., y K. E. Klose. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS Microbiology Reviews* 26. 125-139.
- Rosec, J.; M. Simon, V. Causse, M. Boudjema. 2009. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish: Comparison of PCR protocols using pR72H or *toxR* targets with a culture method. *International Journal of Food Microbiology* 129. 136-145.
- Secretaría de Salud. 1995. Boletín Semanal de Epidemiología, Semanas 1 a 34 de 1995. Dirección General de Epidemiología.
- Shirai, H., Ito, H., Hirayama, T., Nakamoto, Y., Nakabayashi, N. Kumagai, K., Takeda, Y. & Nishibuchi, M. (1990). Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infection and Immunology* 58, 3568-3573.
- Strom, M. S. y R. N. Paranjpye. 2000. Epidemiology and pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *Microbes and Infection* 2. 177-188.
- Su, Y., y C. Liu. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology* 24. 549-558.

- United States Department of Agriculture (USDA). 2008. Most probable number procedure and tables. Laboratory Guidebook. 1-8.
- Waldor, M. K.; y J. J. Mekalanos. 1994. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that causes epidemic cholera. Infection and Immunity 62. 72-78.

XIV. ANEXO 1

Cuestionario para los distribuidores.

1. ¿Qué especie de ostiones vende?
2. ¿Cuál es el que más se vende?
3. ¿De dónde proviene el ostión?
4. ¿Qué precio tiene el kilo de ostión?
5. ¿Cómo es almacenado el ostión?
6. ¿Durante cuantos días llega a almacenar el ostión?
7. ¿Cómo vende el ostión?
8. ¿Cuál es la cantidad de ostión que compran generalmente?
9. Aproximadamente ¿qué cantidad de ostión vende en un día?
10. ¿Durante que temporada se presenta mayor venta de ostión?
11. ¿Qué tipo de comprador es el principal (para restaurantes, carretas, particular)?

XV. ANEXO 2

Conteo Total Viable						
Muestreo	Especie	Dilución	Colonias Amarillas	Colonias Verdes	Total	UFC/g
1	<i>C. gigas</i>	1:1000	3	4	7	7×10^4
	<i>C. gigas</i>	1:1000	0	1	1	1×10^4
2	<i>C. corteziensis</i>	1:1000	11	1	12	12×10^4
	<i>C. corteziensis</i>	1:10000	4	0	4	4×10^5
	<i>C. gigas</i>	1:1000	5	3	8	8×10^5
	<i>C. gigas</i>	1:10000	0	1	1	1×10^5
	<i>C. gigas</i>	1:100000	0	1	1	1×10^6
	<i>C. gigas</i>	1:1000	4	0	4	4×10^4
3	<i>C. gigas</i>	1:1000	3	2	5	5×10^4
	<i>C. gigas</i>	1:100	205	5	210	21×10^4
4	<i>C. gigas</i>	1:100	254	6	260	26×10^4
	<i>C. gigas</i>	1:1000	19	1	20	20×10^4
	<i>C. gigas</i>	1:1000	18	0	18	18×10^4
	<i>C. corteziensis</i>	1:100	-	-	TNTC	TNTC
5	<i>C. corteziensis</i>	1:100	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C. corteziensis</i>	1:1000	-	-	4959	49.59×10^6
	<i>C. corteziensis</i>	1:1000	-	-	5073	50.73×10^6
	<i>C. corteziensis</i>	1:10000	-	-	3562.25	35.6225×10^7
	<i>C. corteziensis</i>	1:10000	-	-	3135	31.35×10^7
	<i>C. corteziensis</i>	1:100	180	1	181	18.1×10^4
6	<i>C. corteziensis</i>	1:100	8	2	10	1×10^4
	<i>C. corteziensis</i>	1:1000	3	1	4	4×10^4
	<i>C. corteziensis</i>	1:1000	1	2	3	3×10^4
	<i>C. corteziensis</i>	1:1000	1	2	3	3×10^4

	<i>C. corteziensis</i>	1:10000	3	0	3	3x10 ⁵
6 *	<i>C.corteziensis</i>	1:10	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C.corteziensis</i>	1:10	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C.corteziensis</i>	1:100	-	-	4104	41.04x10 ⁵
	<i>C.corteziensis</i>	1:100	-	-	4560	45.6x10 ⁵
	<i>C.corteziensis</i>	1:1000	1	3	4	4x10 ⁴
	<i>C.corteziensis</i>	1:1000	3	2	5	5x10 ⁴
	<i>C.corteziensis</i>	1:10000	0	2	2	2x10 ⁵
7 *	<i>C. gigas</i>	1:10	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C. gigas</i>	1:10	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C. gigas</i>	1:100	-	-	7125	71.25x10 ⁵
	<i>C. gigas</i>	1:100	-	-	7540	75.4x10 ⁵
	<i>C. gigas</i>	1:1000	25	2	27	27x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:1000	30	3	33	33x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:10000	2	0	2	20x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:10000	6	2	8	80x10 ⁴
8 *	<i>C. gigas</i>	1:10	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C. gigas</i>	1:10	-	-	TNTC	TNTC
	<i>C. gigas</i>	1:100	-	-	1311	13.11x10 ⁵
	<i>C. gigas</i>	1:100	-	-	1425	14.25x10 ⁵
	<i>C. gigas</i>	1:1000	124	82	206	20.6x10 ⁵
	<i>C. gigas</i>	1:1000	112	62	174	17.4x10 ⁵
9 *	<i>C. gigas</i>	1:10	-	-	1368	13.68x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:10	-	-	1197	11.97x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:100	3	12	15	1.5x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:100	10	10	20	2x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:1000	4	2	6	6x10 ⁴
	<i>C. gigas</i>	1:1000	2	8	10	1x10 ⁵

Resultados del Conteo Total Viable en UFC/g. TNTC = Too Numerous To Count. (Demasiado numeroso para realizar el conteo) * = Además se realizó conteo por medio del Número Más Probable.

XVI. ANEXO 3

Imágenes de algunos de los lugares de muestreo en Mazatlán, se puede observar que los ostiones se mantienen a temperatura ambiente y a la intemperie.



Lugar de Muestreo 1.



Lugar de Muestreo 5.



Muestreo 6, vendedor ambulante de ostión.

XVII. ANEXO 4

Resultados de Vibrios Toxigénicos por Metodología de NMP							
Muestra	Fecha	Proveedor	Especie	Origen	<i>tl</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
					NMP/g (ml)	NMP/g (ml)	NMP/g (ml)
8	30/09/2010	6	<i>C. gigas</i>	Nayarit	1100	3	23
9	11/10/2010	7	<i>C. corteziensis</i>	Mazatlán	-	-	-
10	29/11/2010	7	<i>C. gigas</i>	Culiacán	240	16	16
11	09/12/2010	8	<i>C. gigas</i>	Agua Verde	460	240	15
12	17/02/2011	8	<i>C. gigas</i>	Sonora	29	-	-
13	17/02/2011	8	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	-	-	-
14	17/02/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	23	-	-
15	10/03/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Culiacán	-	-	-
16	10/03/2011	9	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	93	3.6	6.1
17	10/03/2011	9	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-	-	-
18	14/03/2011	10	<i>C. gigas</i>	Sonora	1100	-	1100
19	14/03/2011	10	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	-	-	-
20	14/03/2011	11	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	-	-	-
21	21/03/2011	12	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	1100	1100	460
22	21/03/2011	12	<i>C. gigas</i>	Nayarit	20	15	9.2
23	21/03/2011	13	<i>C. gigas</i>	Sonora	-	-	-
24	11/04/2011	14	<i>C. gigas</i>	Isla de la Piedra	-	-	-
25	11/04/2011	15	<i>C. gigas</i>	Sonora	240	11	3.6
26	11/04/2011	9	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	1100	23	14
27	11/04/2011	10	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	36	9.2	9.2
28	17/04/2011	16	<i>C. gigas</i>	Tepic	240	290	210
29	17/04/2011	16	<i>C. gigas</i>	Culiacán	-	-	-
30	17/04/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	93	28	-
31	17/04/2011	12	<i>C. gigas</i>	Sonora	1100	1100	460
32	20/04/2011	1	<i>C. gigas</i>	Baja California	460	460	460
33	20/04/2011	2	<i>C. gigas</i>	Sonora	1100	460	240
34	20/04/2011	3	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	-	-	-
35	20/04/2011	5	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	160	120	75
36	27/04/2011	5	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-	-	-
37	27/04/2011	7	<i>C. gigas</i>	Tepic	36	36	29
38	27/04/2011	14	<i>C. gigas</i>	Isla de la Piedra	9	-	-
39	27/04/2011	15	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	1100	460	210
40	25/07/2011	1	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	1100	460	460
41	25/07/2011	1	<i>C. gigas</i>	Nayarit	23	23	23
42	25/07/2011	2	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	460	21	-
43	28/07/2011	2	<i>C. gigas</i>	Sonora	-	-	-
44	28/07/2011	3	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	120	75	23
45	28/07/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	120	120	75
46	01/08/2011	14	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	93	-	-
47	01/08/2011	14	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-	-	-

48	01/08/2011	16	<i>C. gigas</i>	Sonora	9	3.6	3.6
49	04/08/2011	16	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	1100	1100	460
50	04/08/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	460	240	240
51	04/08/2011	8	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	290	210	-
52	08/08/2011	6	<i>C. corteziensis</i>	Culiacán	460	-	-
53	08/08/2011	7	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	1100	1100	1100
54	08/08/2011	7	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-	-	-
55	11/08/2011	13	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	460	15	15
56	11/08/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	23	9.2	-
57	13/08/2011	4	<i>C. gigas</i>	Tepic	7.4	3.6	3.6
58	13/08/2011	5	<i>C. gigas</i>	Nayarit	16	11	-
59	15/08/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	29	29	15
60	15/08/2011	7	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	20	20	-
61	15/08/2011	7	<i>C. gigas</i>	Tepic	16	11	11
62	18/08/2011	15	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	1100	1100	460
63	18/08/2011	12	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	1100	460	240
64	18/08/2011	12	<i>C. gigas</i>	Sonora	27	27	20
65	22/08/2011	2	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	1100	1100	-
66	22/08/2011	2	<i>C. gigas</i>	Nayarit	460	290	15
67	22/08/2011	3	<i>C. gigas</i>	Baja California	460	460	210
68	25/08/2011	14	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100	460	210
69	25/08/2011	15	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	460	460	240
70	25/08/2011	15	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-	-	-
71	31/08/2011	6	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	1100	290	-
72	31/08/2011	8	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	120	-	-
73	31/08/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	-	-	-
74	05/09/2011	13	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	460	460	240
75	05/09/2011	13	<i>C. gigas</i>	Sonora	29	15	-
76	08/09/2011	16	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100	460	460
77	08/09/2011	10	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	290	210	-
78	08/09/2011	10	<i>C. gigas</i>	Culiacán	290	-	290
79	11/09/2011	11	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	460	210	210
80	11/09/2011	12	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	16	-	-
81	11/09/2011	12	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-	-	-
82	14/09/2011	9	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	460	240	240
83	14/09/2011	9	<i>C. gigas</i>	Tepic	1100	1100	460
84	14/09/2011	11	<i>C. gigas</i>	Baja California	1100	1100	-

Resultados de Vibrios Toxigénicos por Metodología de NMP					
Muestra	Fecha	Proveedor	Especie	Origen	vvha
					NMP/g (ml)
8	30/09/2010	6	<i>C. gigas</i>	Nayarit	43
9	11/10/2010	7	<i>C. corteziensis</i>	Mazatlán	-
10	29/11/2010	7	<i>C. gigas</i>	Culiacán	460
11	09/12/2010	8	<i>C. gigas</i>	Agua Verde	240
12	17/02/2011	8	<i>C. gigas</i>	Sonora	1100
13	17/02/2011	8	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100
14	17/02/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	240
15	10/03/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Culiacán	-
16	10/03/2011	9	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	6.2
17	10/03/2011	9	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-
18	14/03/2011	10	<i>C. gigas</i>	Sonora	460
19	14/03/2011	10	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	-
20	14/03/2011	11	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100
21	21/03/2011	12	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	-
22	21/03/2011	12	<i>C. gigas</i>	Nayarit	-
23	21/03/2011	13	<i>C. gigas</i>	Sonora	-
24	11/04/2011	14	<i>C. gigas</i>	Isla de la Piedra	-
25	11/04/2011	15	<i>C. gigas</i>	Sonora	-
26	11/04/2011	9	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	16
27	11/04/2011	10	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	23
28	17/04/2011	16	<i>C. gigas</i>	Tepic	210
29	17/04/2011	16	<i>C. gigas</i>	Culiacán	-
30	17/04/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	120
31	17/04/2011	12	<i>C. gigas</i>	Sonora	-
32	20/04/2011	1	<i>C. gigas</i>	Baja California	240
33	20/04/2011	2	<i>C. gigas</i>	Sonora	93
34	20/04/2011	3	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	93
35	20/04/2011	5	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	38
36	27/04/2011	5	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-
37	27/04/2011	7	<i>C. gigas</i>	Tepic	1100
38	27/04/2011	14	<i>C. gigas</i>	Isla de la Piedra	28
39	27/04/2011	15	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	28
40	25/07/2011	1	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	93
41	25/07/2011	1	<i>C. gigas</i>	Nayarit	1100
42	25/07/2011	2	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	38
43	28/07/2011	2	<i>C. gigas</i>	Sonora	-
44	28/07/2011	3	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	93

45	28/07/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	93
46	01/08/2011	14	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	-
47	01/08/2011	14	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-
48	01/08/2011	16	<i>C. gigas</i>	Sonora	9.2
49	04/08/2011	16	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	16
50	04/08/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	15
51	04/08/2011	8	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	-
52	08/08/2011	6	<i>C. corteziensis</i>	Culiacán	-
53	08/08/2011	7	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	-
54	08/08/2011	7	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-
55	11/08/2011	13	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100
56	11/08/2011	4	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100
57	13/08/2011	4	<i>C. gigas</i>	Tepic	460
58	13/08/2011	5	<i>C. gigas</i>	Nayarit	23
59	15/08/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	36
60	15/08/2011	7	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	-
61	15/08/2011	7	<i>C. gigas</i>	Tepic	-
62	18/08/2011	15	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	9.2
63	18/08/2011	12	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	11
64	18/08/2011	12	<i>C. gigas</i>	Sonora	15
65	22/08/2011	2	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	-
66	22/08/2011	2	<i>C. gigas</i>	Nayarit	-
67	22/08/2011	3	<i>C. gigas</i>	Baja California	1100
68	25/08/2011	14	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	1100
69	25/08/2011	15	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	460
70	25/08/2011	15	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-
71	31/08/2011	6	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	460
72	31/08/2011	8	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	240
73	31/08/2011	8	<i>C. gigas</i>	Tepic	36
74	05/09/2011	13	<i>C. corteziensis</i>	Baja California	120
75	05/09/2011	13	<i>C. gigas</i>	Sonora	-
76	08/09/2011	16	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	-
77	08/09/2011	10	<i>C. corteziensis</i>	Nayarit	460
78	08/09/2011	10	<i>C. gigas</i>	Culiacán	-
79	11/09/2011	11	<i>C. corteziensis</i>	Tepic	240
80	11/09/2011	12	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	23
81	11/09/2011	12	<i>C. gigas</i>	Mazatlán	-
82	14/09/2011	9	<i>C. corteziensis</i>	Sonora	460
83	14/09/2011	9	<i>C. gigas</i>	Tepic	1100
84	14/09/2011	11	<i>C. gigas</i>	Baja California	-