

Higiene y Sanidad Ambiental, **16** (3): 1457-1460 (2016)

Ostras, *Crassostrea rhizophorae*, contaminadas con *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivas

OYSTERS, CRASSOSTREA RHIZOPHORAE, CONTAMINATED WITH VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS POSITIVE KANAGAWA

Francisca Gleire RODRIGUES DE MENEZES^{a,b}, Rayza LIMA ARAÚJO^b,
Marina Teresa TORRES RODRIGUEZ^c, Rafael dos Santos ROCHA^a, Oscarina
VIANA DE SOUSA^c, Regine Helena SILVA DOS FERNANDES VIEIRA^{a,c}

^a Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

^b Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM).

^c Instituto de Ciências do Mar/ Labomar, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

Correspondencia: Francisca Gleire Rodrigues de MENEZES. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Av da Abolição 3207, Meireles, Fortaleza CE CEP: 60165-081. Correo-e: gleirerodrigues@yahoo.com.br

RESUMEN

Fue confirmada la identificación fenotípica de cepas de *Vibrio parahaemolyticus* aisladas de ostras frescas y congeladas, comercializadas en una playa del noreste de Brasil, a través de biología molecular. Fue realizada la identificación fenotípica por llave dicotómica, en cuanto a las pruebas genotípicas, fueron realizadas mediante la detección del gen *vib*, para el género *Vibrio* y del gen *tl*, para la especie *Vibrio parahaemolyticus*. El potencial de virulencia de las cepas fue investigado por medio de la prueba de Kanagawa y la ureasa. De las 15 cepas probadas, 14 fueron confirmadas en el género *Vibrio* y la especie *V. parahaemolyticus*. Doce (86%) cepas fueron positivas para la prueba de Kanagawa, sin embargo, ninguna cepa presentó positividad para la ureasa. De esa forma, se concluye que la llave dicotómica fue eficiente en la identificación de *V. parahaemolyticus* y que las ostras comercializadas son capaces de transmitir gastroenteritis al consumidor si son ingeridas crudas.

Palabras clave: Bivalvos, Vibrionaceae, *Vibrio parahaemolyticus*, virulencia, ureasa, patógeno.

ABSTRACT

The aim of the present research was to confirm the phenotypic identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from two markets of fresh and frozen oysters on a beach at the Northeastern of Brazil by molecular biology testes. In order to achieve this goal, phenotypic identification was performed by dichotomous key, while genotypic tests were performed by detection of gene *vib*, to confirmation of genus *Vibrio*, and gene *tl*, to specie *V. parahaemolyticus*. Also, the virulence potential of strains was investigated by Kanagawa and urease tests. Of the 15 tested strains, 14 were confirmed to genus *Vibrio* and specie *V. parahaemolyticus*. Twelve (86%) strains were positive to Kanagawa test; however no strains were positive to urease test. Thus, we concluded that the dichotomous key was efficient in the identification of *V. parahaemolyticus* and the marketed oysters are able of transmitting gastroenteritis to consumer if they are eaten raw.

Keywords: Bivalves, Vibrionaceae, *Vibrio parahaemolyticus*, virulence, urease, pathogen.

INTRODUCCIÓN

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria marina potencialmente patogénica para los humanos y organismos marinos. Su hábitat natural son las aguas marinas y estuarinas debido a su exigencia de NaCl para sobrevivir (Kumari *et al.*, 2014). Su perfil como agente etiológico, principalmente relacionado a la gastroenteritis, hace con que su presencia tenga límites establecidos en la legislación brasilera (BRASIL, 2001) para pescados que se destinan al consumo sin tratamiento térmico.

Leal *et al.* (2008) después de la identificación de clones de *V. parahaemolyticus* que llevaban factores de virulencia con potencial pandémico en brotes en los estados de Pernambuco, Ceará y Alagoas, recomendaron la inclusión de estas bacterias en el monitoreo rutinario de casos de diarreas a fin de comprender y dilucidar su etiología.

La producción de una hemolisina es considerada un factor de virulencia primario en *V. parahaemolyticus* en casos de gastroenteritis. Esa característica es detectada sobre un medio diferencial preparado con sangre (Wagatsuma, 1968). Esta prueba es llamada Kanagawa y las cepas que pueden hemolizar la sangre en ese medio son llamadas Kanagawa positivas (KP). La enzima es conocida como Hemolisina Directa Termoestable (TDH), teniendo como una de las características el permanecer activa a 100°C por hasta 10 minutos (Sakurai *et al.*, 1973).

Por ser un alimento normalmente ingerido sin ninguna cocción, la ostra es considerada un alimento de riesgo para el consumidor. Siendo los vibrios, bacterias que hacen parte de la microbiota autóctona de las ostras, especialmente el *V. parahaemolyticus*, es de esperar que cuidados deban ser tomados en cuenta para el consumo de este molusco. Basado en estos factores de virulencia y en la presencia de *V. parahaemolyticus* en ostras crudas (Vieira *et al.*, 2010) nos propusimos como objetivo en esta investigación ratificar por medio de Biología Molecular la presencia de 15 cepas de *V. parahaemolyticus* clasificadas por la llave de Nogueroles y Blanch (2008), aisladas de ostras comercializadas en la Playa del Futuro (Fortaleza), a través del gen *tl*, y realizar las pruebas de Kanagawa y Ureasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Confirmación fenotípica

Fueron analizadas 18 cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas de ostras *Crassostrea rhizophorae*, comercializadas en las formas fresca (n=07) y congeladas (n=11), obtenidas en dos puntos de venta de la Playa del Futuro, región costera de Fortaleza-CE.

Las 18 cepas eran de un trabajo preliminar sobre la diversidad de vibrio (Costa *et al.*, 2013a) y habían sido clasificadas a través de la llave de Nogueroles y Blanch (2008), como *Vibrio parahaemolyticus*. Los

tubos con las cepas puras estaban mantenidos en la Bacteriotea del Laboratorio de Microbiología Ambiental y del Pescado de la Universidad Federal de Ceará.

De cada tubo (mantenido en la Bacteriotea) fueron retirados inóculos y estriados en placas de Agar Tiosulfato-Citrato- Sales de Bilis, Sacarosa (TCBS) e incubadas por 18- 24h /35° C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, de cada placa fueron aisladas seis colonias sacarosa negativa y repicadas, separadamente, en tubos de Agar Triptona Soja (TSA) (Difco) conteniendo 1% de NaCl. Posteriormente, esos tubos fueron incubados por 24 h a 35°C.

De las 18 cepas, solo 15 fueron recuperadas. Esas fueron entonces sometidas a la prueba de Kanagawa, siendo inoculadas en placas conteniendo Agar Wagatsuma enriquecido con 100 mL de solución al 20% de hemáties de sangre de carnero desfibrinada, con incubación a 35°C/24h. La formación de un halo transparente, tipo β, indicaría la positividad de la prueba (Wagatsuma, 1968).

Las cepas fueron entonces probadas en relación a la hidrólisis de la urea siendo inoculadas en Caldo Urea (Difco) conteniendo 1% de NaCl. La incubación fue realizada en la estufa a 35°C/24h. La positividad de la prueba fue medida por el cambio de coloración del medio de amarillo a rosa Garrity *et al.* (2005).

Confirmación genotípica

Las herramientas moleculares basadas en el principio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fueron utilizadas en la confirmación de la identificación fenotípica y en la investigación de la presencia del gen específico para la especie *V. parahaemolyticus*.

Las estirpes seleccionadas fueron inoculadas en Agua Peptonada Alcalina (APA) 1% e incubadas a 35°C/24h. Del crecimiento en APA fue retirado 1,0 mL para iniciar el proceso de extracción del DNA utilizándose el kit comercial DneasyTissue (Qiagen).

Para la identificación fueron utilizados iniciadores específicos para el género *Vibrio -vib* (Sousa *et al.*, 2006). Para la especie de *V. parahaemolyticus* fue utilizado el iniciador del gen *tl* (hemolisina termolábil) (Bej *et al.*, 1999). Los iniciadores fueron sintetizados por la CROMA bioTechnologies (Brasil) y están detallados en la Tabla 1.

En todas las amplificaciones fue utilizada como control, una cepa de referencia: *Vibrio parahaemolyticus* cedida por el Instituto Oswaldo Cruz-RJ (IOC 18950). El ADN total extraído fue amplificado por la técnica de PCR para la identificación del género *Vibrio*, gen *vib* (Sousa *et al.*, 2006) y el gen *tl* (Bej *et al.*, 1999), específico para especie, en termociclador (Techne) (Tabla 2).

Los productos de la extracción del ADN y del PCR fueron sometidos al método de electroforesis en gel de agarosa al 1% con la adición de Gel Red para la visualización de los productos amplificados en el

Tabla 1: Iniciadores y condiciones de termociclaje utilizados en la investigación molecular de las muestras de *V. parahaemolyticus*.

Genes	Secuencia de los iniciadores (5'-3')	Condiciones de Termociclaje	Amplicones (pb) ^b
<i>Vib</i>	727F:5'-agg cgg ccc cctgga cag a-3' 1423R:5'-rcttctkktgcagcccactccca	94°C por 2 min. 30 ciclos (94°C por 1 min., 50°C por 1 min., 72°C por 2 min); 72° por 8 min.	696
<i>tl^a</i>	F: 5'-aaa gcgattatgcagaagca ctg-3' R: 5'-gct act ttc tag cat ttctc tgc-3'	94°C/ 3 min. 30 ciclos (94°C/ 1 min., 58°C /1min., 72°C/ 1min.); 72°C/ 5min.	450

tl^a = hemolisina termolábil; directa termoestable-relacionada; (pb)^b = pares de bases

Tabla 2: Composición y concentraciones empleadas en las reacciones de investigación molecular para las estirpes de *V. parahaemolyticus*.

Reactivos de la Reacción	PCR	
	<i>Gen específico para género</i>	<i>Gen específico para especie</i>
	<i>vib</i>	<i>tl</i>
Tampão 10x	20 mMTris pH 8,4, 50 mMKCl	20 mMTris pH 8,4, 50 mMKCl
dNTPs (2,5 mM)	0,25µM	0,25µM
Iniciador F (10 µM)	0,4 µM	0,4 µM
Iniciador R (10 µM)	0,4 µM	0,4 µM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,5 mM
Taq polimerasa (500U)	4 U	4 U
Muestra	10 a 60 ng ¹	10 a 60 ng ¹
Vol. de la reacción	25 µL	25 µL

¹ La concentración de las muestras variaron de 10 a 60 ng.

transluminador (Espectroline-UV) con luz ultravioleta. Las corridas ocurrieron en gel de agarosa de siete centímetros con voltaje de 120V, amperaje de 500mA y duración de 60 minutos. Los geles fueron documentados en el sistema de foto documentación digital Kodak EDAS290. Fue utilizado un marcador (ADN ladder - Sigma de 1000 pb) como patrón para el tamaño molecular de los genes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fueron confirmadas 15 cepas de *V. parahaemolyticus* aisladas a partir de los tejidos blandos de ostras salvajes (*Crassostrea rhizophorae*) por la llave dicotómica (Noguerola y Blanch, 2008), siendo cinco aisladas de ostras frescas y 10 de ostras congeladas. Esa llave de identificación se basa en las características bioquímicas y metabólicas de los cultivos.

En cuanto a los factores de virulencia expresados por esas estirpes, ninguna de ellas produjo la enzima ureasa, entre tanto, 86% fueron positivas para la prueba de Kanagawa presentando hemolisis de tipo beta (ocho de las ostras congeladas y cinco de las

ostras frescas). Cepas de *V. parahaemolyticus* KP son consideradas patogénicas, siendo aisladas más frecuentemente de casos clínicos en humanos (Johnson *et al.*, 1984). Ese elevado porcentaje de estirpes de *V. parahaemolyticus* KP aisladas de ostras frescas y sobre todo de las congeladas es un dato importante y está en desacuerdo con otras investigaciones en las que se correlaciona la actividad hemolítica solamente con aislamientos clínicos (Ottaviani *et al.*, 2010).

La presencia de *V. parahaemolyticus* en la microbiota de las ostras es normal. Vieira *et al.* (2010) estudiaron el ciclo completo de crecimiento de la ostra *Crassostrea rhizophorae* e identificaron esa especie bacteriana en más del 60% de las fases del ciclo de vida del molusco, razón por la que no fue aconsejado el consumo de la ostra cruda o mal cocida. Esa correlación con moluscos hace de ese tipo de alimento uno de los que representa mayor riesgo para la salud del consumidor.

La identificación genotípica confirmó el género de las cepas como *Vibrio*, lo que fue ratificado en las pruebas bioquímicas. Sin embargo, en la confirmación utilizando el iniciador para el gen *tl* (gen para

especie de *V. parahaemolyticus*) fueron positivas 14 de las 15 estirpes probadas, quedando una sin confirmación para especie. En las pruebas fenotípicas, esa cepa que mostró un resultado negativo para la presencia del gen *tl* presentó todas las características de *V. parahaemolyticus*, incluyendo resultados positivos para la prueba de Kanagawa (KP). Es conocido que otros vibrios pueden llevar el gen *tdh* que expresa el fenotipo de la hemolisina. Costa *et al.* (2013b) al analizar vibrios aislados de ostras frescas detectaron algunos vibrios diferentes del *V. parahaemolyticus*, con capacidad de lisar hematíes.

En la literatura es común la afirmación de que los pescados crudos no albergan cepas de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivos, pero si sucediera, sería en un porcentaje muy reducido. Así mismo, las ostras adquiridas en los puntos de comercialización de la Playa del Futuro se mostraron capaces de causar gastroenteritis en el consumidor si fueran ingeridas frescas, como es el hábito de los compradores. El hecho de que las ostras congeladas presentaran un mayor número de bacterias está en desacuerdo con la afirmación de que temperaturas frías eliminan *Vibrio parahaemolyticus* (Ye *et al.*, 2012). Sin embargo, ese hecho puede no expresar la verdad, es decir, las ostras enteras podrían estar solamente guardadas en el congelador lo que congelaría sus valvas, mientras el músculo de los animales, cuando mucho, estaría frío.

CONCLUSIONES

Se concluye que la llave de Noguezola y Blanch⁸ es eficiente en la identificación de *V. parahaemolyticus* y que las ostras comercializadas en los puntos de venta A y B de la Playa del Futuro, Fortaleza Ceará, ya sean congeladas o frescas, son capaces, si son ingeridas crudas, de transmitir gastroenteritis al consumidor.

Es recomendado nunca ingerir ostras sin la debida cocción.

AGRADECIMIENTOS

Al CNPq por el apoyo financiero.

BIBLIOGRAFÍA

Bej AK, Patterson DP, Brasher CW, Vickery MCL, Jones DD, Kaysner CA. Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of *tl*, *tdh* and *trh*. J Microbiol Methods. 1999; 36: 215-25.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília, 2001. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm >.

Acesso em: 28 de março 2016.

Costa RA, Amorim LMMC, Araújo RL, Vieira RHSF. Multiple enzymatic profiles of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from oysters. Rev Argent Microbiol. 2013a; 45(4): 267-70.

Costa RA, Araújo RL, Vieira RHSF. Hemolytic and urease activities in vibrios isolated from fresh and frozen oysters. Rev Soc Bras Med Trop. 2013b; 46(1): 103-05.

Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JR. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria. 2th ed. New York: Springer, 2005. (2), 1388p

Johnson DE, Weinberg L, Ciarkowski J, West P, Colwell RR. Wound infection caused by Kanagawa-Negative *Vibrio parahaemolyticus*. J Clin Microbiol, 1984; 20(4): 811-12.

Kumari P, Poddar A, Schumann P, Das SK. *Vibrio panuliri* sp. nov., a marine bacterium isolated from spiny lobster, *Panulirus penicillatus* and transfer of *Vibrio* ponticus from Scophthalmi clade to the newly proposed *Ponticus* clade. Res Microbiol. 2014; 165: 826-35.

Leal NC, Silva SC, Cavalcanti VO, Figueroa ACTA, Nunes VVF, Miralles IS. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 gastroenteritis in northeast Brazil. J Appl Microbiol. 2008;105: 691- 97.

Noguezola I, Blanch AR. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. J Appl Microbiol. 2008; 105: 175-85.

Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, Canônico C, Potenziani S, Santarelli S, Masini L, Scuota S, Carraturo A. *Vibrio parahaemolyticus*-associated gastroenteritis in Italy: persistent occurrence of O3:K6 pandemic clone and emergence of O1:KUT serotype. Diagn. Microbiol Infect Dis. 2010; 66: 452-55.

Sakurai J, Matsuzaki A, Miwatani T. Purification and characterization of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect Immun. 1973; 8: 775-80.

Sousa OV, Macrae A, Menezes FGR, Gomes NCM, Vieira R, Mendonça-Hagler LCS. The impact of shrimp farming effluent on bacterial communities in mangrove waters, Ceará, Brazil. Mar Pollut Bul. 2006; 52: 1725-34.

Vieira RHS, Sousa OV, Costa RA, Theophilo GND, Macrae A, Fonteles-Filho AA, Rodrigues DP. Raw oysters can be a risk for infections. Infect Dis. 2010; 14(1): 66-70.

Wagatsuma S. On a medium for hemolytic reaction (in Japanese). Med Circ. 1968; 13: 59-162.

Ye M, Huang Y, Chen H. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in oysters by high-hydrostatic pressure and mild heat. Food Microbiol. 2012; 32: 179 -84.