



Detection of *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*) and virulence factors in Oyster *Crassostrea virginica* in the Gulf of Mexico

Detección de *Vibrio parahaemolyticus* (*tlh*) y factores de virulencia en Ostión *Crassostrea virginica* en el Golfo de México

Galaviz-Villa, I., Castañeda-Chavez, M. R., Lango-Reynoso, F., Amaro-Espejo, I. A., Romero-González, L., Salcedo-Garduño, M. G., Sánchez-Chavez, A.

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Boca del Río, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Carretera Veracruz-Córdoba, Km.12, Boca del Río, C.P. 94290, Veracruz, México.

ABSTRACT

Vibrio parahaemolyticus is a pathogenic species to humans, known for its ability to cause disease. Thermostable direct hemolysin (TDH) and related TLH (TRH), are very important virulence factors of *Vibrio parahaemolyticus*. Consuming raw or undercooked bivalve molluscs increases the likelihood of getting a disease. The objective of this study was to identify and quantify the gene *tlh* of *V. parahaemolyticus* and the hemolysins TDH and TRH as virulence factors. This to assess risks to public health by eating oysters from coastal lagoons of the state of Veracruz, Mexico. Analysis of each sample was performed in triplicate. Initially they were enriched with alkaline peptone water (APW) and processed by applying the combination of the technique More Probable Number and the Polymerase chain reaction (MPN-PCR). A standardization of PCR to amplify the genes encoding the hemolysins was performed. The results of the oyster samples analysis of lagoons such as, Pueblo Viejo (<22 MPN/g), Tamiahua (0.7 MPN/g), La Mancha (5.8 MPN/g) and Mandinga (> 22 MPN/g), were found below the maximum permissible limit set by NOM-242-SSA1-2009. Molecular tests were negative for the genes of *tdh* and *trh* hemolysins, which are associated with toxicity. Even

Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: September 23rd 2016.

Accepted/Aceptado: March 21st 2017.

RESUMEN

Vibrio parahaemolyticus es una especie patógena para el ser humano, reconocida por su habilidad para causar enfermedad. La hemolisina termoestable directa (TDH) y la relacionada con la TLH (TRH), son factores muy importantes de patogenicidad. El consumo de moluscos bivalvos crudos o cocidos insuficientemente, aumenta la probabilidad de adquirir una enfermedad. El objetivo de este estudio fue identificar y cuantificar el gen *tlh* de *V. parahaemolyticus* y las hemolisinas TDH y TRH como factores de virulencia. Esto para evaluar los riesgos a la salud pública por el consumo de ostión de las lagunas costeras del estado de Veracruz, México. El análisis de cada muestra se realizó por triplicado. Inicialmente fueron enriquecidas con agua peptonada alcalina (APA) y procesadas con la aplicación de la combinación de la técnica de Número Más Probable y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (NMP-PCR). Se realizó la estandarización de la PCR para la amplificación de los genes que codifican a las hemolisinas. Los resultados del análisis de las muestras de ostión de las lagunas de Pueblo Viejo (<22 NMP/g), Tamiahua (0.7 NMP/g), La Mancha (5.8 NMP/g) y Mandinga (>22 NMP/g) se encontraron por debajo del límite máximo permisible que establece la NOM-242-SSA1-2009. Las pruebas moleculares resultaron negativas a los genes de las hemolisinas *tdh* y *trh*, las cuales están relacionados con la toxicidad. Aun cuando el análisis de patogenicidad por la presencia de las hemolisinas, TDH y TRH, resultaron negativas en este estudio, se reporta que cepas patógenas pueden no producir la hemolisina TDH. Por lo tanto, deben ser consideradas como portadoras

*Corresponding Author:

Galaviz-Villa, Itzel. Instituto Tecnológico de Boca del Río, División de Estudios de Posgrado e Investigación, carretera Veracruz-Córdoba, Km.12, Boca del Río, C.P. 94290, Veracruz, México. Phone: 1-229-860-189 ext.113. E-mail.: itzelgalaviz.itboca@gmail.com

though, the analysis for the presence of pathogenicity hemolysins, TDH and TRH were negative in this study, it is reported that pathogenic strains may not produce TDH hemolysin. Therefore, they should be considered as potential carriers of virulence genes as they represent a risk to human health.

KEY WORDS

American oyster; coastal lagoons; pathogenic vibrio; gastrointestinal diseases; human health.

Introduction

Production of bivalve molluscs in Mexico ranks sixth in world production, represented by 50,219 tons per year. Of this production, 6 % corresponds to the Pacific coast (2,904 tons), and 94 % to the Gulf of México (47,315 tons). The operation focuses on the states of Campeche, Tabasco, Tamaulipas and Veracruz, the latter accounts for 52 % of the Gulf of México production (24,451 tons/year). This is due to the high productivity of major lagoon systems of the state of Veracruz, such as, Pueblo Viejo, Tamiahua, Tampamachoco, Grande, La Mancha, Alvarado, Ostión, El Llano, Sontecomapan and Mandinga (SAGARPA, 2012).

Bivalve molluscs are one of the most important fishery resources in the state of Veracruz. Oyster farming is considered a productive activity with large growth expectations, since the state has hydrological potential and a variety of climates and eco-systems.

Bivalve molluscs use, especially the oyster *Crassostrea virginica*, is an economic activity with a high development potential, whose main objective is to generate food, income and services for consumption. However, the economic value of this resource is hindered by its low-safety as it is associated with gastrointestinal diseases caused by bacteria of the genus *Vibrio* (Reyes-Velazquez *et al.*, 2010). The fisheries sector plays an important role in food security, and must assure consumers not only an excellent source of animal protein, but also the safety of the product.

Vibrio parahaemolyticus intoxication causes three recognized clinical forms: gastroenteritis, septicemia and wound infection, whose symptoms are diarrhoea, vomiting and headache (gastroenteritis); fever and hypotension (septicemia); and erythema (wound infection) (Doyle, 1990).

potenciales de genes de virulencia, ya que representan un riesgo para la salud humana.

PALABRAS CLAVE

Ostión americano; lagunas costeras; vibrios patógenos; enfermedades gastrointestinales; salud humana.

Introducción

La producción de moluscos bivalvos en México se clasifica en sexto lugar en la producción mundial, representada por 50,219 toneladas al año. De esta producción, el 6 % corresponde a la Costa del Pacífico (2,904 ton) y 94 % al Golfo de México (47,315 tons). La operación se enfoca en los estados de Campeche, Tabasco, Tamaulipas y Veracruz, este último con un 52 % de la producción del Golfo de México (24,451 ton/año). Esto se debe a la alta productividad de los sistemas de lagunas mayores del estado de Veracruz, tales como: Pueblo Viejo, Tamiahua, Tampamachoco, Grande, La Mancha, Alvarado, Ostión, El Llano, Sontecomapan y Mandinga (SAGARPA, 2012).

Los moluscos bivalvos son uno de los recursos pesqueros más importantes en el estado de Veracruz. El cultivo de ostión se considera como una actividad productiva con altas expectativas de crecimiento, dado que en el estado se tiene potencial hidrológico y una variedad de climas y ecosistemas.

El uso de los moluscos bivalvos, especialmente el ostión *Crassostrea virginica*, representa una actividad económica con alto potencial de desarrollo, cuyo objetivo principal es generar comida, ingreso y servicios para consumo. Sin embargo, el valor económico de este recurso se obstaculiza por su baja seguridad, ya que está asociado con enfermedades gastrointestinales ocasionadas por la bacteria del género *Vibrio* (Reyes-Velazquez *et al.*, 2010). El sector pesquero juega un papel importante en la seguridad alimentaria, y debe asegurar a los consumidores no solo una excelente fuente de proteína animal, sino también, seguridad en el producto.

La intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus* ocasiona tres formas clínicamente reconocidas: gastroenteritis, septicemia e infección de heridas, cuyos síntomas son diarrea, vómito y dolor de cabeza (gastroenteritis); fiebre e hipertensión (septicemia); y eritema (infección de heridas) (Doyle, 1990).

En 2003, el primer brote de *V. parahaemolyticus* ocurrió en México y fue provocado por la cepa 03:K6. Esto fue

In 2003, the first outbreak of *V. parahaemolyticus* occurred in Mexico, it was provoked by the O3:K6 strain. This was reported in Sinaloa State, Mexico in late 2003 to September 2004, 1,200 cases of gastroenteritis caused by *V. cholerae* were identified (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006).

The first report of this pathogenic bacterium (*V. parahaemolyticus*) in the environment was obtained in the lagoon of Pueblo Viejo, Veracruz; however, its presence is constant in the Gulf of Mexico (Cabrera-García *et al.*, 2004). In order to produce the disease, it is required a million vibrios present in consumed oysters (Paris *et al.*, 2005), a figure that is not elusive when eaten raw. As filter feeders and bioaccumulators they retain bacteria present in water, such as *V. parahaemolyticus*; which occurs more frequently in summer months (Otwell *et al.*, 1991).

Handling and cross-contamination are another important factor affecting the quality and safety of the product (Paris *et al.*, 2005), and finally, the exponential reproduction of the bacteria in 10 minutes lapses (Bradshaw *et al.*, 1984). Thus bivalve molluscs are considered one of the most dangerous foods to human health (Rippey, 1994).

V. parahaemolyticus is a bacterium of marine habitat. It is found in sediment, suspended particles, plankton, fish and seafood. It is Gram-negative, motile with a single polar flagellum, facultative anaerobic with halophilic trends, as it grows best in the presence of 3.8 % NaCl. They range in size from 1.4 to 2.6 microns, grows in a temperature range of 10 to 44 °C, optimally at 37 °C. This bacterium has three antigenic components: H, O (somatic), and K (capsular). There are 12 groups of O types and over 70 K antigens. Five of these K antigens are able to combine with any antigens of O type; therefore, 76 recognized serotypes are formed. However, pandemics have been caused by O3:K6 serotype, primary virulence factor in this vibrio, caused by hemolysins associated to antigens O and K. These hemolysins are, TLH (thermolabile), TDH (thermostable direct) and TRH (thermolabile-related) (Honda *et al.*, 1988).

There are several conventional microbiological methods to determine the presence of this organism, including: crop, biochemical and immunological tests. However, they are not specific tests in determining hemolysins (Farmer *et al.*, 1992). This has generated the implementation of protocols such as molecular Polymerase chain reaction (PCR), which have greater potential in identifying pathogenic vibrios (Theron *et al.*, 2000).

reportado en el estado de Sinaloa, México, a finales del 2003 y hasta septiembre de 2004, 1,200 casos de gastroenteritis ocasionada por *V. cholerae* fueron identificados (Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006).

El primer reporte de esta bacteria patógena (*V. parahaemolyticus*) en el ambiente fue obtenido en la Laguna de Pueblo Viejo, Veracruz; sin embargo, su presencia es constante en el Golfo de México (Cabrera-García *et al.*, 2004). Para producir la enfermedad, se requieren un millón de vibrios presentes en los ostiones consumidos (Paris *et al.*, 2005), cifra que no es elusiva cuando se consumen crudos. Como organismo filtrador y bio-acumulador, pueden retener bacterias presentes en el agua, como el *V. parahaemolyticus*, lo cual ocurre con más frecuencia en los meses de verano (Otwell *et al.*, 1991).

Su manejo y la contaminación cruzada son otro factor importante que afecta la calidad y seguridad del producto (Paris *et al.*, 2005), y finalmente, la reproducción exponencial de la bacteria en lapsos de 10 minutos (Bradshaw *et al.*, 1984). Por esta razón, los moluscos bivalvos son considerados uno de los alimentos más peligrosos para la salud humana (Rippey, 1994).

V. parahaemolyticus es una bacteria de hábitat marino. Se encuentra en sedimento, partículas suspendidas, plancton y mariscos. Es Gram-negativa, móvil con un solo flagelo polar, facultativamente anaeróbico con orientaciones halófilas, ya que crece mejor en presencia de 3.8 % NaCl. Se localiza en un rango de tamaño desde las 1.4 hasta las 2.6 micras, crece en un rango de temperatura de 10 a 44 °C, óptimamente a 37 °C. Esta bacteria tiene tres componentes antigénicos: H₁, O (somático) y K (capsular). Existen 12 grupos de tipo O y más de 70 K antígenos. Cinco de estos antígenos K pueden combinarse con antígenos del tipo O; por lo tanto, se forman 76 estereotipos reconocidos. Sin embargo, las pandemias han sido ocasionadas por el estereotipo O3:K6, factor primario de virulencia en este vibrio, causado por la hemolisina asociada a los antígenos O y K. estas hemolisinas son: TLH (termolábil), TDH (termoestable directo) y TRH (termolábil-relacionado) (Honda *et al.*, 1988).

Existen diversos métodos microbiológicos para determinar la presencia de este organismo, incluyendo: exámenes de cultivo, bioquímicos e inmunológicos. Sin embargo, no son exámenes específicos que determinen hemolisinas (Farmer *et al.*, 1992). Esto ha generado la implementación de protocolos tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual tiene un gran potencial en la identificación de vibrios patogénicos (Theron *et al.*, 2000).

V. parahaemolyticus is one of 20 species of the genus vibrio. It is a halophilic marine bacillus, straight or slightly curved of 1 to 3 μm in length and 0.4 to 0.6 μm in diameter, Gram negative, monotrichous, unsporulated and unencapsulated (Baumann and Schubert, 1984). This bacterium was first isolated in Japan, to cause an outbreak of gastroenteritis in 272 people affected, 20 died; by ingestion of contaminated seafood which was eaten raw (Fujino *et al.*, 1951). Numerous food poisoning outbreaks and sporadic cases of *V. parahaemolyticus* have been reported in US, Europe and Asia; it was not until 1969 that this organism was considered a public health problem, mainly in the US. This pathogen exhibits a variety of metabolic potentialities, which can be demonstrated by biochemical and culture tests that facilitate identification. Like other gastrointestinal pathogens, this bacterium does not always produce symptoms nor is it easy to prove their pathogenicity (Sakazaki *et al.*, 1968). Its wide distribution has been proved when isolated in several countries in America (Dadisman *et al.*, 1973), Europe (Barrow and Miller, 1972), Africa (Bockemühl and Triemer, 1974) and Asia (Haghighi and Waleh, 1978).

In Mexico, two strains of *V. parahaemolyticus* (0.26 %) were isolated from 777 human stool samples. The strains were isolated from two adult men who had an acute gastroenteritis and had consumed raw shellfish (Gil *et al.*, 1974). A study was conducted in the city of Acapulco Guerrero, Mexico, where 275 human stool specimens of marine food handlers were examined, and the presence of this bacterium was demonstrated in 0.73 % of the samples (Pérez *et al.*, 1980). In 1983, a search for antibodies against the bacteria in 100 food handlers was conducted. Of the total, 17 were positive sera, of which 10 contained "live" antigen and 7 "dead" antigens. Of 100 manipulators, 10 handed seafood, among them 4 were found positive with "live" antigen and 1 with "dead" antigen. Of the remaining 90 non-marine food handlers, 12 positive with antibodies against this antigen were obtained, of which 6 presented "live" antigen and 6 "dead" (Molina *et al.*, 1983).

In 1988, a strain of *V. parahaemolyticus* was isolated from 26 stool samples from marine food handlers in the city of Progreso, Yucatan (Monsreal and Flores, 1989a). A year later, in 1989, 12 strains were isolated from 190 samples of raw seafood, insufficient or partially cooked by heat in restaurants in Yucatan State Mexico (Monsreal and Flores,

V. parahaemolyticus es una de las 20 especies del género vibrio. En un bacilo marino halófilo, vertical o ligeramente curvado de 1 a 3 μm en longitud, y 0.4 a 0.6 μm en diámetro, Gram negativo, monotrico, no esporulado e incapsulado (Baumann y Schubert, 1984). Por causar un brote de gastroenteritis en 272 personas afectadas, 20 murieron por ingestión de mariscos contaminados, los cuales fueron consumidos crudos (Fujino *et al.*, 1951). Numerosos brotes de envenenamientos y casos esporádicos de *V. parahaemolyticus* han sido reportados en Estados Unidos, Europa y Asia; fue hasta 1969 que este organismo se considero un problema de salud pública, principalmente en Estados Unidos. Este patógeno muestra una variedad de potencialidades metabólicas, las cuales pueden ser demostradas por exámenes bioquímicos y de cultivo que facilitan su identificación. Como otros patógenos gastrointestinales, esta bacteria no siempre produce síntomas ni tampoco su patogenicidad es fácil de comprobar (Sakazaki *et al.*, 1968). Su amplia distribución se ha comprobado cuando se aísla en diversos países en América (Dadisman *et al.*, 1973), Europa (Barrow *et al.*, 1972), África (Bockemühl y Triemer, 1974) y Asia (Haghighi y Waleh, 1978).

En México, dos cepas de *V. parahaemolyticus* (0.26 %) fueron aisladas de 777 muestras de heces humanas. Las cepas fueron aisladas de dos hombres adultos que presentaron gastroenteritis aguda y habían consumido mariscos crudos (Gil *et al.*, 1974). Se condujo un estudio en la ciudad de Acapulco Guerrero, México, donde se examinaron 275 especímenes de heces humanas provenientes de manipuladores de comida marina, se demostró la presencia de esta bacteria en 0.73 % de las muestras (Pérez *et al.*, 1980). En 1983, se llevó a cabo una búsqueda de anticuerpos contra esta bacteria en 100 manipuladores de alimentos. Se encontraron 17 sueros positivos, de los cuales 10 contenían antígeno "vivo", y 7 antígeno "muerto". De los 100 manipuladores 10 eran de alimentos marinos, y se encontraron 4 positivos con antígeno "vivo" y 1 con antígeno "muerto". De los 90 restantes se obtuvieron 12 positivos con anticuerpos contra este antígeno, de los cuales 6 presentaron antígeno "vivo" y 6, antígeno "muerto" (Molina *et al.*, 1983).

En 1988, una cepa de *V. parahaemolyticus* fue aislada de 26 muestras de heces humanas de manipuladores de alimentos marinos en la Ciudad de Progreso, Yucatán (Monsreal y Flores, 1989a). Un año después, en 1989, 12 cepas fueron aisladas de 190 muestras de mariscos crudos, insuficiente o parcialmente cocidos al calor en restaurantes del estado de Yucatán México (Monsreal y Flores, 1989b). A partir de la década de los noventa, el trabajo e investigación en la detección

1989b). From the 90's, the work and research on detecting Vibrio bacteria have made significant progress. Highlighting those made by Bej et al., 1999, who found *V. parahaemolyticus* in undercooked seafood, in at least 10(1)10(2)CFU per 10 g of alkaline peptone water enriched seeded oyster tissue homogenate; Croci et al., (2001) determined by standard microbiological techniques that out of 726 Vibrionaceae bacteria, 46.9 % belong to the genus Vibrio increasing in number especially in summer time. Di Pinto et al., (2006) detected the presence of *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* in mollusc samples in the order of 76 and 32 % of the analysed samples.

Cabrera-Garcia et al., (2004) observed that *V. parahaemolyticus* occurs in 15 % of samples of saltwater, fish and oysters in the lagoon of Pueblo Viejo, Veracruz. Since as a result of the water temperature, which does not descend from 11.6 °C. approximately, has a constant presence in the Gulf of Mexico.

Serogroups are constant in some geographical areas, being the serotypes O3:K6, O4:K68, and O1:KUT, the ones that are mainly related to infections caused by this pathogen. Castañeda et al., (2005) detected toxigenic *V. parahaemolyticus* in 15 % of saltwater samples in the state of Veracruz, and Cabanillas-Beltrán et al., (2006) identified positive lines TLH and TRH representatives of O3:K6 serogroups in undercooked seafood, this was the first official report of the presence of this pathogen in Mexico.

In Latin America Graü et al., (2004) isolated *V. alginolyticus* and *V. parahaemolyticus* in mollusc samples in Venezuela, in a range of 98 % of the analysed samples. According to Turner (2010), the constant impact of natural disasters worldwide have favoured the presence of pathogens such as *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus*; which have caused disease outbreaks in various parts of the world. In Haiti, the cholera epidemic was spread during 2010. This bacterium killed 4,500 people due to unhealthy conditions generated by the earthquake (WHO, 2012). Because of the recirculation of ocean currents, the proximity of our country to the islands, and history of this epidemic, Mexico went on alert to prevent the spread of infectious outbreaks. Therefore, epidemiological prevention and health promotion programs have been adopted, through the enforcement of the Official Mexican

de la bacteria Vibrio había tenido un progreso significativo. Resaltando el trabajo realizado por Bej et al., en 1999 quien encontró *V. parahaemolyticus* en mariscos poco cocidos, en al menos 10(1)10(2) UFC por 10 g de agua peptonada alcalina enriquecida con homogeneizado de tejido de ostión; Croci et al., (2001) determinaron a través de técnicas microbiológicas estándar que de 726 bacterias vibriónicas, 46.9 % pertenecían al género Vibrio, incrementando especialmente en el verano. Di Pinto et al., (2006) detectaron la presencia del *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* en el 76 y 32 % de las muestras analizadas, respectivamente.

Cabrera-Garcia et al., (2004) observaron que *V. parahaemolyticus* se presenta en un 15 % de muestras de agua salada, peces y ostiones en la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz. Como resultado de la temperatura del agua, la cual no desciende de 11.6 °C aproximadamente, tiene una presencia constante en el Golfo de México.

Los serogrupos son una constante en algunas áreas geográficas, siendo los serotipos O3:K6, O4:K68, y O1:KUT, los cuales están principalmente relacionados con infecciones ocasionadas por este patógeno. Castañeda et al., (2005) detectaron *V. parahaemolyticus* toxigénico en un 15 % de las muestras de agua salada en el estado de Veracruz, y Cabanillas-Beltrán et al., (2006), identificaron líneas TLH y TRH positivas representantes de los serogrupos O3:K6 en mariscos poco cocidos, siendo el primer reporte oficial de la presencia de este patógeno en México.

En Latinoamérica, Graü et al., (2004) aislaron *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* en muestras de moluscos en Venezuela, en un rango de 98 % de las muestras analizadas. De acuerdo a Turner (2010), el impacto constante de los desastres naturales alrededor del mundo han favorecido la presencia de patógenos tales como *V. cholerae* y *V. parahaemolyticus*, los cuales han ocasionado brotes de enfermedades en diversas partes del mundo. En Haití, la epidemia del cólera se expandió durante el 2010. Esta bacteria mató a 4,500 personas debido a las condiciones insalubres generadas por el terremoto (OMS, 2012). Debido a la recirculación de las corrientes del océano, la proximidad de nuestro país con las islas, y la historia de esta epidemia, México estuvo en alerta para prevenir el esparcimiento de brotes infecciosos. Por lo tanto, la prevención epidemiológica y la promoción de programas de salud han sido adoptados a través de la ejecución del Estándar Oficial Mexicano NOM-016-SSA2-1994. Estas enfermedades se han asociado al consumo de mariscos crudos, tales como los ostiones y las almejas. En el estado de Veracruz se ubican sistemas lagunares importantes por su producción de moluscos bivalvos, como el ostión (*Crassostrea*

Standard NOM-016-SSA2-1994. These diseases have been associated with the consumption of raw shellfish such as oysters and clams. In the state of Veracruz, major lake systems are located for the production of bivalve molluscs, such as oysters (*Crassostrea virginica*). Some of these are classified within the priority areas for certification of extraction sites, according to NOM-242-SSA1-2009. Therefore, the aim of this study was to identify quantitatively *V. parahaemolyticus* TDH and TRH hemolysins in oyster lagoon systems of the state of Veracruz, Mexico; contribute to the knowledge of the sanitary quality of fishery resources; and assess the risk to public health by the consumption of infected live bivalve molluscs.

Material and Methods

A sample of 30 market size organisms were extracted, collected by free diving in oyster banks located in lagoons of Veracruz, those are Pueblo Viejo, Tamiahua, La Mancha and Mandinga, in the months of May and June 2014 (dry season) (Figura 1). The minimum size of organisms collected was 70 mm length of the shell, measure established in the national regulations for

virginica). Algunos de estos están clasificados dentro de las áreas de prioridad para la certificación de sitios de extracción, de acuerdo a la norma NOM-242-SSA1-2009. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue identificar cualitativamente las hemolisinas TDH y TRH de *V. parahaemolyticus* en los sistemas de lagunares del estado de Veracruz, México; contribuir al conocimiento sobre la calidad sanitaria de los recursos pesqueros, y evaluar el riesgo a la salud pública por el consumo directo de moluscos bivalvos crudos infectados.

Materiales y Métodos

Se extrajo una muestra compuesta de 30 organismos de talla comercial, colectados por buceo libre en bancos de ostión ubicados en las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua, La Mancha y Mandinga, Veracruz; en los meses de mayo y junio de 2014 (temporada de estiaje) (Figura 1). El tamaño mínimo de los organismos colectados fue de 70 mm. de longitud de la concha, medida establecida en las regulaciones nacionales para la extracción de ostión (NOM-015-PESC-1994). La colecta, manejo y transporte de las muestras se llevó a cabo de acuerdo al criterio establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994. Los organismos incrustados en la concha fueron removidos utilizando cuchillos de acero

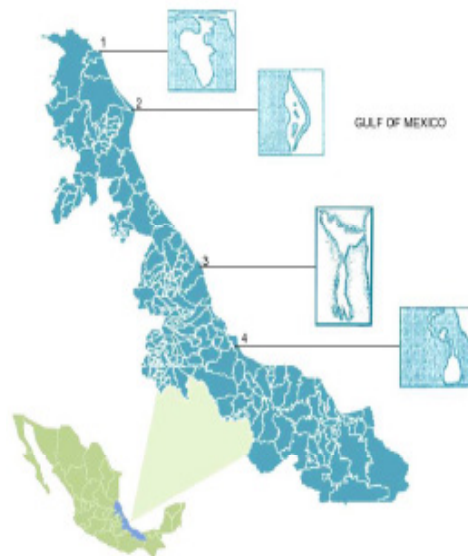


Figure 1. Sampling sites, coastal lagoons of Veracruz, Mexico. 1) Pueblo Viejo, 2) Tamiahua, 3) La Mancha, and 4) Mandinga.

Figura 1. Sitios de muestreo, lagunas costeras de Veracruz, México. 1) Pueblo Viejo, 2) Tamiahua, 3) La Mancha, y 4) Mandinga.

the extraction of oysters (NOM-015-PESC-1994). The collection, handling and transportation of the samples were carried out according to the criteria established in the Official Mexican Standard NOM-109-SSA1-1994. Fouling organisms were removed from these bodies, using stainless steel knives (Crocí *et al.*, 2002; Castañeda *et al.*, 2005). The samples were placed in plastic bags for transport to the laboratory, at an average temperature of 4 ± 1 °C (Da Silva *et al.*, 2003).

Fifty grams of oysters were weighed and mixed with 250 mL of peptone alkaline water (pH 8.0 APW), previously sterilized and with 3 % sodium chloride (NaCl) added. The above preparation was homogenized in a blender with a previously sterilized glass at high speed for three minutes. One millilitre was taken out of each of the homogenates to make series of three tubes, each with three hexadecimal dilutions (1:10, 1:100 and 1:1000); prepared with 9 mL of APW + 3 % NaCl, which were used to perform the MPN technique (most probable number). The series of tubes were incubated at 35 °C for a period of 18-24 hours in a Lab-Line incubator model 844.

In order to make a proper and rapid identification of *V. parahaemolyticus* a PCR technique was applied.

The PCR technique requires the use of a positive control to verify the correct development of protocol analysis. In order to do this, a *V. parahaemolyticus* O3:K6 strain, acquired from the state laboratory of the Ministry of Public Health, was used resulting positive to the TDH and TRH hemolysins.

An aliquot, from the pure culture of *V. parahaemolyticus* (control) was taken with a loop of platinum, replanted in test tubes with 6 ml of trypticase and soybean broth (TSB) and incubated for 18-14 hours at 35°C. When incubation ended, it proceeded to extract DNA from pure culture through a Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Corp.). Following DNA extraction, the samples were inoculated on a 0.8 % agarose gel to observe the presence of DNA bands at 4°C.

The protocol of Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corp.) was used for dilutions of extracted DNA; 600 µL were transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube and continued with the guidance provided by the supplier.

Agarose gels were prepared at 2 %, previously dyed with 3 µL ethidium bromide in an electrophoresis chamber (MaxiCell ec360m Electrophoretic Gel System) to which,

inoxidable (Crocí *et al.*, 2002; Castañeda *et al.*, 2005). Las muestras fueron colocadas en bolsas de plástico para transportarlos al laboratorio, a una temperatura promedio de 4 ± 1 °C (Da Silva *et al.*, 2003).

Se pesaron 50 g de ostión y se mezclaron con 250 mL de agua peptonada alcalina (APA pH 8.0), previamente esterilizada y adicionada con 3 % de cloruro de sodio (NaCl). La preparación anterior se homogenizó en una licuadora con un vaso previamente estéril, a alta velocidad durante tres minutos. De cada uno de los homogenizados se tomó un mililitro para realizar series de tres tubos, cada una con tres diluciones hexadecimales (1:10, 1:100 y 1:1000); preparadas con 9 mL de APA + 3 % NaCl, con las cuales se llevó a cabo la técnica de NMP (Número Más Probable). Las series de tubos se incubaron a 35 °C por un período de 18-24 horas en una incubadora Lab-Line modelo 844.

Con el fin de realizar una adecuada y rápida identificación de *V. parahaemolyticus* se aplicó la técnica PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

La técnica de PCR requiere el uso de un control positivo para corroborar el correcto desarrollo del protocolo de análisis, para esto se utilizó una cepa de *V. parahaemolyticus* O3:K6 positiva a las hemolisinas TDH y TRH, adquirida del laboratorio estatal de la Secretaría de Salud Pública.

Del cultivo puro de *V. parahaemolyticus* (control), se tomó una alícuota con un asa de platino y se sembró en tubos de ensayo con 6 ml de caldo tripticasa y soya (TSB), y se incubaron entre 18-24 h a 35 °C. Una vez finalizada la incubación se procedió a extraer el ADN del cultivo puro por medio del paquete comercial Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Corp.). Posterior a la extracción de ADN se inyectaron las muestras en un gel de agarosa al 0.8 % para observar la presencia de bandas de ADN a 4 °C.

Para la extracción de ADN de las diluciones se utilizó el protocolo del paquete comercial Wizard Genomic DNA purification kit (Promega Corp.). Se transfirieron 600 µL a un tubo eppendorf de 1.5 mL, y se continuó con las indicaciones proporcionadas por el proveedor.

Los geles de agarosa fueron preparados al 2 %, previamente teñidos con 3 µL de bromuro de etidio en una cámara de electroforesis (MaxiCell ec360m Electrophoretic Gel System) al cual se le añadió una solución de Tris-Acetato-EDTA (TAE 1X). Las muestras de la extracción de

a solution of Tris-Acetate-EDTA (TAE 1X) was added. Samples of DNA extraction were mixed with Loading Dye (Promega Corp.) buffer in a proportion 5:2. Samples were injected in the agarose gel and were run at 90V for 40 minutes. Subsequently, they were visualized on a UV light transilluminator.

PCR simple was used, based on the detection and amplification of *tlh*, *tdh* and *trh* genes of *V. parahaemolyticus*. For this purpose a DNA of *V. parahaemolyticus* 03:K6 strain, positive to TDH and TRH hemolysins was used, previously acquired with a purity certificate. IDT (Integrated DNA Technology, USA) primers were used to perform PCR standardization of TDH and TRH hemolysins, at an initial concentration of 0.1 µL (Table 1). To obtain a final concentration of 100 µL of each primer, 624 µL of ultrapure water free of nuclease were added (Promega Corp.).

ADN se mezclaron con buffer de carga Loading Dye (Promega Corp.) en una proporción 5:2. Las muestras se inyectaron en el gel de agarosa y se corrieron a 90V durante 40 minutos. Posteriormente se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

El PCR simple fue utilizado basado en la detección y amplificación de los genes TLH, TDH y TRH de *V. parahaemolyticus*. Para este propósito, se utilizó una cepa de ADN de *V. parahaemolyticus* 03:K6, positiva a hemolisinas TDH y TRH, previamente adquiridas con certificado de pureza. Para realizar la estandarización de la PCR de las hemolisinas TDH y TRH se emplearon cebadores IDT (Integrated DNA Technology, EUA) a una concentración inicial de 0.1 µL (Tabla 1). Para obtener una concentración final de 100 µL de cada *primer*, se le adicionaron 624 µL de agua ultrapura libre de nucleasas (Promega Corp.).

Table 1.
Oligonucleotide sequence 24 to 25 pairs of bases (forward and reverse)
of *tdh* and *trh* genes (FDA-BAM, 2004).

Tabla 1.
Secuencia oligonucleotidos de 24 a 25 pares de bases
de genes *tdh* y *trh* (FDA-BAM, 2004).

Direction	Name	Sequence	Concentration
Forward	L-dh	5'- GTA AAG GTC TCT GAC TTT TGG AC 3'	0.1 µmol
Reverse	R-dh	5'- TGG AAT AGA ACC TTC ATC TTC ACC 3'	
Forward	L-rh	5'- TTG GCT TCG ATA TTT TCA GTA TCT 3'	
Reverse	R-rh	5'- CAT AAC AAA CAT ATG CCC ATT TCC 3'	

To determine the final concentration of Taq polymerase (Promega Corp.), gradual increments of 0.1 µL were conducted from 0.1 µL to 1.0 µL as final volume, were used a volume of 1 µL of: positive control DNA, Mix DNTP's, and *Primer F* and *R*. The PCR reaction was performed in a final volume of 25 µL (Table 2).

The standardization procedure of the PCR included the determination of the number of cycles and temperature ranges in the alignment stage (30 to 35 cycles and 40°C to 72°C) for the pair of oligonucleotides used (Table 3).

Eppendorf tubes were prepared with 25 µL of the PCR reagent mixture (previously standardized) and 1 µL DNA samples (M). A positive control (C +) with 1 µL of DNA

Para determinar la concentración final de la Taq polimerasa (PROMEGA Corp.) se realizaron incrementos graduales de 0.1 µL, a partir de 0.1 µL hasta 1.0 µL como volumen final. Se utilizó 1 µL de ADN control positivo, Mix de DNTP's, *Primer F* y *Primer R*, respectivamente. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL (Tabla 2).

El procedimiento de estandarización de PCR incluyó la determinación del número de ciclos y rangos de temperatura de la etapa de alineamiento (30 a 35 ciclos y 40°C a 72°C) para el par de oligonucleoides utilizados (Tabla 3).

Se prepararon tubos eppendorf con 25 µL de la mezcla de reactivos de PCR (previamente estandarizadas) y 1 µL de ADN de las muestras (M). Se incluyó un control positivo

Table 2.
Initial concentration of the components used for the PCR reaction.

Tabla 2.
Concentración inicial de los componentes utilizados para la reacción PCR.

Components	Volume (μ L)
ADN control	1
H ₂ O ultrapure	15.7
Buffer	2.5
MgCl ₂	2.5
Mix DNTP's	1.0
Primer F <i>tlh</i>	1.0
Primer R <i>tlh</i>	1.0
Taq polymerase	0.3
Final volume	25 μ L

Table 3.
Thermocycler conditions for amplification of *tlh* gen.

Tabla 3.
Condiciones termocíclicas para la amplificación del gen *tlh*.

Stage	Cycle		Temperature	Time
Initial Denaturation	1		94°C	5 min
		Denaturation	94°C	30 sec
	30-35	Alignment	40-72°C	45 sec
		Amplification	72°C	45 sec
Final Extension	1		72°C	5 min
Maintenance			4°C	Undefined

control, and a negative control (C-) with 1 μ L of nuclease-free ultrapure water were included as a reference to ensure the quality of data obtained. After making the mixtures they were placed into a thermal-cycler, with previously standardized conditions for amplification of the TLH hemolysin (Table 3). PCR was performed for each gene (*tdh* and *trh*) of positive PCR results to *V. parahaemolyticus* (Table 4).

An agarose gel was prepared on a horizontal electrophoresis chamber to display the final PCR product or amplicon. Prior to samples and control (+ and -) injection on the gel, the PCR product and the loading buffer (Loading dye Promega Corp.) were mixed in a 7:3

(C+) con 1 μ L de ADN control, y un control negativo (C-) con 1 μ L de agua ultrapura libre de nucleasas; como referencia para asegurar la calidad de los datos obtenidos. Una vez realizadas las mezclas se colocaron dentro del termociclador, con las condiciones previamente estandarizadas para la amplificación de la hemolisina TLH (Tabla 3). De los resultados positivos de la PCR a *V. parahaemolyticus*, se realizó la PCR para cada gen (*tdh* y *trh*) (Tabla 4).

Para la visualización del producto final de PCR o amplicón se preparó un gel de agarosa en una cámara de electroforesis horizontal. Previo a la inyección de las muestras y control (+ y -) en el gel, se mezcló el producto de la PCR y el buffer de

Table 4.
Thermocycler conditions for amplification of the tdh and trh genes.

Tabla 4.
Condiciones termocíclicas para la ampliación de los genes TDH y TRH.

Stage	Cycle		Temperature	Time
Initial denaturation	1		94°C	1 min
		Denaturation	94°C	30 sec
		Alignment	58°C	45 sec
		Amplification	72°C	50 sec
Final extension maintenance	1		72°C	5 min
			4°C	Undefined

Table 5.
Specific bases for each hemolysin of *V. parahaemolyticus*.

Tabla 5.
Bases específicas para cada hemolisina de *V. parahaemolyticus*.

Amplicon size			Interpretation
500bp	450bp	270bp	
-	+	-	tlh positive
-	+	+	tdh positive
+	+	-	trh positive
+	+	+	tdh/trh Positive
-	-	-	Negative

ratio. A marker (DNA Ladder Promega Corp.) of 1000 base pairs (bp) of molecular weight was injected as a reference or specific run standard. Electrophoresis was performed for 40 min at 90v (Table 5).

carga (Loading dye Promega Corp.) en una relación 7:3. Se inyectó un marcador (DNA Ladder Promega Corp.) de peso molecular de 1000 pares de bases (pb) como referencia o patrón de corrida conocido. La electroforesis se realizó durante 40 min a 90v (Tabla 5).

Results and Discussion

The positive presence of the tlh+ gene of *V. parahaemolyticus* was detected in oysters from Veracruz lagoons of Pueblo Viejo, Tamiagua, La Mancha and Mandinga (Table 6). The results of NMP/g of these bacteria in the coastal lagoons is below the maximum permissible limits (104 MPN/g), according to the official Mexican standards, and than the limits set by international organizations as NSSP USA (5,000

Resultados y Discusión

La presencia positiva del gen tlh+ de *V. parahaemolyticus* se detectó en ostión proveniente de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiagua, La Mancha y Mandinga (Tabla 6). Los resultados del conteo de NMP/g de esta bacteria en las lagunas costeras está debajo de los límites máximos permitidos (104 MPN/g), de acuerdo a las normas oficiales mexicanas y los límites establecidos por

Table 6.
Presence of *Vibrio parahaemolyticus* (TLH) and its hemolysins (TDH and TRH) in oyster *Crassostrea virginica* of coastal lagoons in Veracruz, Mexico.

Tabla 6.
Presencia de *Vibrio parahaemolyticus* (TLH) y sus hemolisinas (TDH y TRH) en ostra *Crassostrea virginica* de lagunas costeras en Veracruz, México.

Sample Number	Lagoon System	Bivalve Mollusc	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (tlh)	MPN/50 gr	Hemolysins TDH/TRH
1	Pueblo Viejo, Ver.		Positive	>1100	Negative
2	Tamiahua, Ver.	<i>C. virginica</i>	Positive	35	Negative
3	La Mancha, Ver.		Positive	290	Negative
4	Mandinga, Ver.		Positive	>1100	Negative

MPN/g), FAO/WHO and FDA (10,000 MPN/g). According to the pathogenicity test performed, a negative result is obtained at *tdh* and *trh* genes, which are related to the toxicity of the bacteria (Figure 2). The presence of heat-labile hemolysin (TLH) is found when amplification occurs at 450 bp, but not at 270 bp (Figure 3).

Although the pathogenicity test for the presence of TDH and TRH hemolysins was negative; it is reported that pathogenic strains may not produce the TDH hemolysin. However, they should be considered as potential carriers of virulence genes as they represent a risk to human health. Unlike *V. parahaemolyticus* strains, isolated from clinical samples, that show virulence-related

organizaciones internacionales como NSSP USA (5,000 NMP/g), FAO/OMS y FDA (10,000 NMP/g). De acuerdo con la prueba de patogenicidad realizada a las muestras analizadas, se obtuvo un resultado negativo a los genes *tdh* y *trh*, los cuales son relacionados con la toxicidad de la bacteria (Figura 2). Al presentarse amplificación a 450 pb, pero no a 270 pb, se comprueba la presencia de la hemolisina termolábil (TLH) (Tabla 5).

Aún cuando la prueba de patogenicidad por la presencia de las hemolisinas TDH y TRH resultó negativa; se reporta que cepas patogénicas pueden no producir la hemolisina TDH. Sin embargo, deberían considerarse como portadores potenciales de genes de virulencia, ya que representan

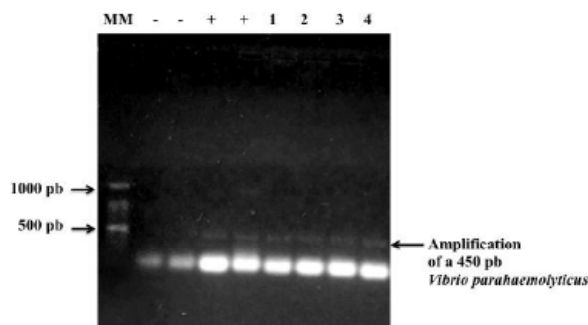


Figure 2. Amplification at 450 bp of *V. parahaemolyticus* gene in oyster samples using primers F and R *tlh*. Positive control (+) and negative control (-).

Figura 2. Amplificación a 450 pb del gen *V. parahaemolyticus* en muestras de ostión utilizando iniciadores F y R *tlh*. Control positivo (+) y control negativo (-).

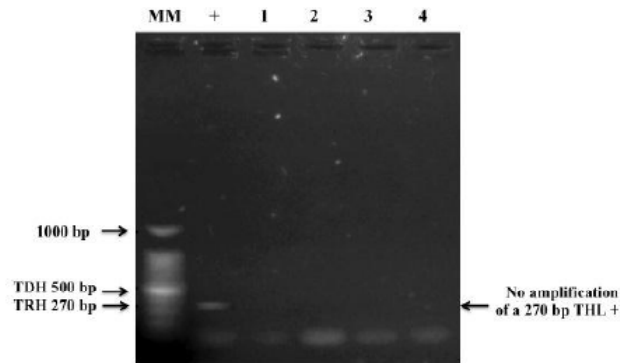


Figure 3. Presence of hemolysins tdh and trh of *V. parahaemolyticus*. No amplification at 270 bp. Positive thl in oyster from lagoons of Veracruz. Positive control (+).

Figura 3. Presencia de hemolisinas tdh y trh de *V. parahaemolyticus*. No amplificación a 270 pb. thl positivo en ostión de lagunas de Veracruz. Control positivo (+).

factors in 99 %; the ones isolated from environmental sources have only 1 % or less, which explains the results obtained in this study (San Cristobal *et al.*, 2008).

According to Cantarero (2009), *V. parahaemolyticus* strains causing disease in humans are mainly positive Kanagawa (tdh+) cases, and isolated recovered from seafood, negative Kanagawa (tdh-); the latter was observed in the results obtained.

The presence of *V. parahaemolyticus* in fishery products, fresh, chilled or frozen; it is limited to a maximum of 104 NMP/g, according to the Official Mexican Standard NOM-242-SSA1-2009, and the limits set by international organizations as NSSP USA (5,000 MPN/g), FAO/WHO and FDA (10,000 MPN/g). The analysis results of oyster samples from the lagoons of Pueblo Viejo (>22 MPN/g), Tamiahua (0.7 MPN/g), La Mancha (5.8 MPN/g) and Mandinga (>22 MPN/g) are found below the maximum allowable limits nationally and internationally.

Likewise, Cabrera-García *et al.*, (2004) found *V. parahaemolyticus* in oyster samples from the lagoon of Pueblo Viejo, Veracruz, and mention that their constant presence in the Gulf of Mexico is due to the water temperature, which does not descend from 11.6°C approximately. In 2010, Minguez-Rodríguez *et al.* found samples positives (tdh+) for pathogenic *V. parahaemolyticus* in higher densities (290.5 MPN/g)

un riesgo a la salud humana. A diferencia de cepas de *V. parahaemolyticus*, aisladas de las muestras clínicas que muestran factores de virulencia relacionados en 99 %, las aisladas de fuentes ambientales tienen solo 1 % o menos, lo cual explica los resultados obtenidos en este estudio (San Cristobal *et al.*, 2008).

De acuerdo a Cantarero (2009), las cepas de *V. parahaemolyticus* que ocasionan enfermedades en humanos son principalmente casos de Kanagawa positivos (tdh+), y aislados de mariscos recuperados, Kanagawa negativo (tdh-); esto último fue observado en los resultados obtenidos.

La presencia de *V. parahaemolyticus* en productos de la pesca frescos, refrigerados y congelados; está limitada a un máximo de 104 NMP/g, de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, y a los establecidos por las organizaciones internacionales como NSSP USA (5,000 NMP/g), FAO/OMS y FDA (10,000 NMP/g). Los resultados del análisis de las muestras de ostión de las lagunas de Pueblo Viejo (<22 NMP/g), Tamiahua (0.7 NMP/g), La Mancha (5.8 NMP/g) y Mandinga (>22 NMP/g), se encuentran por debajo de los límites máximos permisible nacionales e internacionales.

Asimismo, Cabrera-García *et al.*, (2004) encontraron *V. parahaemolyticus* en muestras de ostiones de la laguna de Pueblo Viejo, Veracruz, y mencionan que la presencia constante en el Golfo de México se debe a la temperatura del agua, la cual no desciende de 11.6 °C aproximadamente. En 2010, Minguez-

in the Pueblo Viejo lagoon. According with Lopez-Hernandez *et al.*, (2015), the salinity and temperature conditions in the Gulf of México regulate the dynamics of *V. parahaemolyticus*, allowing harboring potentially pathogenic genotypes within the oyster; therefore, found evidence of the pandemic clone orf8 in *C. virginica* in relation ($R^2 = 0.964$, $P < 0.001$) with the environmental parameters temperature, salinity and pH. Also, Reyes-Velazquez *et al.*, (2010) mentioned that the observed concentrations of *V. parahaemolyticus* in *C. virginica* may also be produced by seasonal variation of the population by “hibernating” in the sediment or in partnership with the marine fauna, followed by population growth from runoff into lagoons like Mandinga, Veracruz, having high concentrations of organic matter and nutrients.

Paranjpye *et al.*, (2013), mentioned that to differentiate avirulent and virulent strains and evaluate the pathogenic potential of strains of this species have been largely focused on these virulence factors, such as the different hemolysins (TDH and TRH) or the contributions of the type 3 secretion systems (T3SS) also called injectisome or injectosome. According with these authors, several *in vivo* or *in vitro* models have been used to assess the distinct effects of pathogenicity such as cytotoxicity and enterotoxicity of these virulence factors. However, comparison of the cumulative virulence of *V. parahaemolyticus* strains has been difficult to assess.

Conclusions

The presence of *V. parahaemolyticus* in oysters from the lagoons of Pueblo Viejo, Tamiahua, La Mancha and Mandinga, Veracruz, was detected. The count (MPN) of *V. parahaemolyticus* in the analysed samples was recorded below the maximum permissible limits (104 MPN/g), according the official Mexican standards, and than the limits set by international organizations as NSSP USA (5,000 MPN/g), FAO/WHO and FDA (10,000 MPN/g). Although analysed oyster samples were negative for *tdh* and *trh* genes, which are related to toxicity, the presence of this bacterium poses a risk to public health.

References

Barrow, G. I. and Miller, D. C. (1972). *Vibrio parahaemolyticus*: a potencial pathogen from marine sources in Britain. *The Lancet*, 299(7748): 485-486. DOI: [10.1016/S0140-6736\(72\)90134-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(72)90134-1)

Rodriguez *et al.*, (2015) encontraron muestras positivas (*tdh+*) para *V. parahaemolyticus* patogénico en densidades más altas (290.5 MPN/g) en la laguna de Pueblo Viejo. De acuerdo con Lopez-Hernandez *et al.*, (2015), las condiciones de salinidad y temperatura en el Golfo de México regulan la dinámica de *V. parahaemolyticus*, permitiendo el albergue potencial de genotipos dentro del ostión; por tanto, se encontró evidencia del clon pandémico orf8 en *C. virginica* en relación ($R^2 = 0.964$, $P < 0.001$) con los parámetros de temperatura ambiental, salinidad y pH. También, Reyes-Velazquez *et al.*, (2010) mencionan que las concentraciones observadas de *V. parahaemolyticus* en *C. virginica* pueden también ser producidas por la variación estacional de la población por “hibernación” en el sedimento o en conjunto con la fauna marina, seguidos por el crecimiento poblacional y escorrentías de altas concentraciones de materia orgánica y nutrientes a las lagunas como Mandinga, Veracruz.

Paranjpye *et al.*, (2013) mencionan que para diferenciar las cepas virulentas y no virulentas, y evaluar el potencial patogénico de las cepas de estas especies; se ha enfocado siempre a los factores de virulencia, tales como las diferentes hemolisinas (TDH y TRH) o la contribución de los sistemas de secreción tipo 3 (T3SS) también llamados inyectisoma o inyectosoma. De acuerdo a estos autores, varios modelos *in vivo* o *in vitro* se han utilizado para asesorar los distintos efectos de patogenicidad tales como citotoxicidad y enterotoxicidad de estos factores de virulencia. Sin embargo, la comparación de la virulencia acumulativa de cepas de *V. parahaemolyticus* ha sido difícil de evaluar.

Conclusiones

Se detectó la presencia de *V. parahaemolyticus* en ostiones de las lagunas de Pueblo Viejo, Tamiahua, La Mancha y Mandinga, Veracruz. El conteo (NMP) de *V. parahaemolyticus* en las muestras analizadas se registró por debajo de los límites máximos permisibles (104 NMP/g) que marca la normatividad mexicana e internacional, como; NSSP USA (5,000 MPN/g), FAO/OMS y FDA (10,000 MPN/g). Aun cuando las muestras de ostión analizadas resultaron negativas a los genes *tdh* y *trh* relacionados con la toxicidad, la presencia de esta bacteria representa un riesgo para la salud pública.

- Baumann, P. and Schubert, R. H. W. (1984). Section 5. Facultatively anaerobic Gram-negative rods, Family II. Vibrionaceae. In: J. G. Holt, and N. R. Krieg (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, MD. Williams & Wilkins, 1: 516-550.
- Bej, A. K., Patterson, D. P., Brasher, C. W., Vickery, M. C., Jones, D. D. and Kaysner, C. A. (1999). Detection of total and hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish using multiplex PCR amplification of tl, tdh and trh. *Journal of Microbiological Methods* 36(3): 215-225. DOI: [10.1016/S0167-7012\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00037-8)
- Bockemuhl, J. and Triemer, A. (1974). Ecology and epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* on the coast of Togo. *World Health Organization* 51(4): 353-360. In: <file:///C:/Users/ivan/Downloads/bullwho00470-0030.pdf>
- Bradshaw, J. G., Shah, D. B., Wehby, A. J., Peeler, J. T. and Twedt, R. M. (1984). Thermal inactivation of the Kanagawa hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in buffer and shrimp. *Journal of Food Science* 49(1): 183-187. DOI: [10.1111/j.1365-2621.1984.tb13702.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1984.tb13702.x)
- Cabanillas-Beltrán, H., Llausás-Magaña, E., Romero, R., Espinoza, A., García-Gasca, A., Nishibuchi, M., Ishibashi, M. and Gomez-Gil, B. (2006). Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters* 265(1): 76-80. DOI: [10.1111/j.1574-6968.2006.00475.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00475.x)
- Cabrera-García, M. A., Vásquez-Salinas, C. and Quiñonez-Ramirez, E. (2004). Serologic and molecular characterization of *vibrio parahaemolyticus* strains isolated from seawater and fish products of the Gulf of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 70(11): 6401-6406. DOI: [10.1128/AEM.70.11.6401-6406.2004](https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6401-6406.2004)
- Cantarero, M. E. E. (2009). Evaluación y comparación de siembra inmunológica directa e hibridación de ADN para la detección y enumeración de *Vibrio parahaemolyticus*. (tesis de maestría). Escuela Agrícola Panamericana. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/269/1/AGI-2009-T007.pdf>
- Castañeda Chávez, M. R., Pardio Sedas, V., Orrantía Borunda, E. and Lango Reynoso, F. (2005). Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 50(12):1641-1648. DOI: [10.1016/j.marpolbul.2005.06.036](https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.06.036)
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E. and Toti, L. (2001). Detection of Vibrionaceae in mussels and in their seawater growing area. *Letters in Applied Microbiology* 32(1): 57-61. DOI: [10.1111/j.1472-765X.2001.00855.x](https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2001.00855.x)
- Croci, L., Suffredini, E., Cozzi, E. and Toti, L. (2002). Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* 92(3): 460-465. DOI: [10.1046/j.1365-2672.2002.01548.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01548.x)
- Dadisman, T. A., Nelson, R., Molenda, J. R. and Garber, H. J. (1973). *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: Clinical and Epidemiologic aspect. *Journal Milk Food Technology* 36(2): 111-112. <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0022-2747-36.2.111?code=fopr-site>
- Da Silva, N., Taniwaki, M. H., Junqueira, V. C., Silveira, N., Do Nascimento, M. D. S. and Gomes, R. A. R. (2012). *Microbiological examination methods of food and water: a laboratory manual*. CRC Press. Di Pinto, A., Ciccarese, G., Fontanarosa, M., Terio, V., and Tantillo, G. (2006). Detection of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish samples using collagenase targeted MULTIPLEX PCR. *Journal of Food Safety* 26(2): 150-159.
- Doyle, J. J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Farmer, J. J., Arduino, M. J. and Hickman-Brenner, F. W. (1992). The genera *Aeromonas* and *Pleisiomonas*. In: *The Prokaryotes*. 2nd Ed. A Balows HG, Truper M, Dworkin W, Harder KH, Schleifer KH. New York, N.Y. Springer-Verlag, 3012-3028.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyana, A., Mukai, T. and Ueho T. (1951). On the bacteriological examination of shirasu food poisoning. *Journal of Japanese Association For Infectious Diseases* 35- 11.
- Gil, R. M. E., Peral, L. A. M. and Ruíz, R. (1974). Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en caso de gastroenteritis y en mariscos crudos en la ciudad de Puebla. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 16: 85-88.
- Graü de Marín, C., La Barbera, A., Zerpa, A., Simón, S. and Gallardo, O. (2004). Aislamiento de *vibrio* spp. y evaluación de la condición sanitaria de los moluscos bivalvos *Arca zebra* y *Perna perna* procedentes de la costa nororiental del estado. Sucre. *Venezuela. Revista científica* 14(6): 1-17. <http://www.redalyc.org/pdf/959/95914605.pdf>
- Haghighi, L. and Waleh, N. S. (1978). Isolation of *Vibrio parahaemolyticus* from Persian Gulf. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81(12): 255-257. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/748571>
- Honda, T., Ni, Y. and Miwatani, T. (1988). Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infection Immunology* 56(4): 961-965. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC259398/pdf/iai00076-0249.pdf>

- Minguez-Rodríguez, M. M., Castañeda-Chávez, M. R., Hernández-Zárate, G., Lango-Reynoso, F. and Reyes-Velázquez, C. (2010). Densities of total pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea virginica*) from the Pueblo Viejo Lagoon, Veracruz, Mexico. Paper presented at the Vibrios in the environment Biloxi, Mississippi, USA. [Review 2015 may 15]. http://vintage.joss.ucar.edu/vibrios_2010/abstracts/seafood_safety/reyesvelazquez.pdf
- Molina, G. O., Martínez, B. C., Pérez, M. C. and Peral, L. A. M. (1983). Frecuencia de anticuerpos séricos anti-*Vibrio parahaemolyticus* en manejadores de alimentos. *Salud Pública de México* 25(3): 273-278. <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/622/609>
- Monsreal, J. and Flores, A. J. J. (1989^a). Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en productos marinos y en heces de manipuladores de alimentos. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 30: 223-227.
- Monsreal, J. and Flores, A. J. J. (1989^b). Prevalencia de *Vibrio parahaemolyticus* en productos marinos de restaurantes de la ciudad de Mérida, Yucatán. *Salud Pública de México* 31: 314-325. <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/80/78>
- NOM-015-PESC-1994, Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana para regular la extracción de las existencias naturales de ostión en los sistemas lagunarios estuarinos del Estado de Tabasco.
- Otwell, W. S., Larusson, T., Balaban, M. O. and Yeralan, S. (1991). Application of computer vision to seafood quality evaluation. In: Proceedings of Second Joint Conferences, Tropical and Subtropical Fisheries Technology and Atlantic Fisheries Technology Societies; Orlando, FL.
- Paranjpye, R. N., Myers, M. S., Yount, E. C. and Thompson, J. L. (2013). Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence. *Microbiology (United Kingdom)* 159(12): 2605–2615. DOI: [10.1099/mic.0.067637-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.067637-0)
- Paris, E., Rios, C., Bettini, M., Mieres, J., Sanchez, P. and De la Barra, T. (2005). Intoxicación por *Vibrio Parahaemolyticus*. *Cuadernos Médicos Sociales* 45(1): 43-47. <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-425151>
- Pérez, M. E., Vélez, G. M. L. and Galván, R. F. (1980). Búsqueda de *Vibrio parahaemolyticus* en heces de manejadores de alimentos del puerto de Acapulco, Guerrero. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 22, 18.
- Reyes-Velazquez, C., Castañeda-Chávez, M. R., Lango-Reynoso, F. and Minguez-Rodríguez, M. M. (2010). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in *Crassostrea virginica* from the lagoon system of Mandinga, Veracruz, Mexico. Paper presented at the Vibrios in the environment 2010 Biloxi, Mississippi, USA. [Review 2015 May 15] http://vintage.joss.ucar.edu/vibrios_2010/abstracts/seafood_safety/reyesvelazquez2.pdf
- Rippey, S. R. (1994). Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clinical Microbiology Reviews* 7(4): 419-425. <file:///C:/Users/ivan/Downloads/cmr00033-0007.pdf>
- SAGARPA. (2012). Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Carta Nacional Pesquera. [Review 2015 October 25] <http://www.inapesca.gob.mx/portal/documentos/publicaciones/CARTA%20NACIONAL%20PESQUERA/24082012%20SAGARPA.pdf>
- Sakazaki, R., Tamura, K., Koto, T., Obara, Y. and Yamai, S. (1968). Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Japanese Journal of Medicine Science and Biology* 21(5): 325-331.
- San Cristóbal, S. W., Olea, A., Cubillos, V., Órdenes, J., Cabrera, D., and Hormazábal, J., (2008). Manual de Procedimientos, Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Ministerio de Salud - Instituto de Salud Pública CHILE; 45.
- Theron, J., Cilliers, J., Du Preez, M., Brözel, V. S. and Venter, S. N. (2000). Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* from environmental water samples by an enrichment broth cultivation-pit-stop seminested PCR procedure. *Journal of Applied Microbiology* 89 suppl 3: 539-546. DOI: [10.1046/j.1365-2672.2000.01140.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01140.x)
- Turner, W. J. (2010.) Environmental factors and reservoir shifts contribute to the seasonality of pathogenic vibrio species. (Dissertation). Athens, Georgia. <http://armbrustlab.ocean.washington.edu/files/Turner.dissertation.pdf>
- WHO. (2012). Salud en las Américas. Organización Mundial de la Salud. Ed. [Review 2015 November 30] http://www.paho.org/saludenlasamericas/index.php?option=com_content&view=article&id=9&Itemid=14&lang=

Cite this paper/Como citar este artículo: Galaviz-Villa, I., Castañeda-Chavez, M. R., Lango-Reynoso, F., Amaro-Espejo, I. A., Romero-González, L., Salcedo-Garduño, M. G., Sánchez-Chavez, A. (2017). Detection of *Vibrio parahaemolyticus* (tih) and virulence factors in Oyster *Crassostrea virginica* in the Gulf of Mexico. *Revista Bio Ciencias* 4(6), 15 pages, Article ID: 04.06.03. <http://dx.doi.org/10.15741/revbio.04.06.03>

