



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**PREVALENCIA DE *Vibrio parahaemolyticus* Y *Listeria
monocytogenes* EN EL PROCESO DE CAMARÓN
CRUDO CONGELADO**

por:

Ivan Javier Cabanillas Mata

Tesis aprobada por la

**COORDINACIÓN DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD Y
APROVECHAMIENTO SUSTENTABLE DE RECURSOS
NATURALES**

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ivan Javier Cabanillas Mata, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias




Dra. Lorena Olivia Noriega Orozco
Director de Tesis



Dra. Evelia Acedo Félix
Asesor



Dra. Dolores Graciela Ávila Quezada
Asesor



M.C. María de la Cruz Paredes Aguilar
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

A **CONACYT** por el apoyo prestado durante el posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C** por brindarme la oportunidad y todo lo necesario para llevar a cabo este posgrado.

A **Dios** por ponerme en este camino de aprendizaje, por darme la fuerza para sacar este trabajo lo mejor posible y poner en mi camino a las personas adecuadas para desarrollarlo.

A la **Dra. Lorena Olivia Lorena Noriega**, por todo lo aprendido de ella, por todo el apoyo que me brindo desde el inicio hasta el final del posgrado, por su paciencia, entusiasmo y dedicación. Muchas gracias.

A la **M.C. María de la Cruz Paredes Aguilar**, por compartir sus conocimientos, por siempre tener tiempo para mis dudas, por sus aportaciones y revisar este trabajo. Gracias.

A mi comité de tesis, la **Dra. Evelia Acedo Félix** y la **Dra. Dolores Graciela Ávila**, por las aportaciones y revisión de este trabajo.

A la **I.B Elsa Evelia López**, por su apoyo durante todo el experimental, por los buenos momentos y por su amistad.

A la **M.C. Karina Lizbeth Rivero Montes**, por siempre resolver mis dudas, por sus consejos para llevar a cabo lo mejor posible este posgrado y por su amistad, al igual que a la **I.P.A. Olga Janeth Córdova** por el apoyo en la parte experimental, los buenos momentos en el laboratorio y su gran amistad.

A la **Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota**, por apoyarme durante todo el posgrado con sus conocimientos.

A **Jiapsi Millan, Dulce Ruiz, Gabriel Terrazas** y la **Lic. Gabriela Cardoza**, por su amistad, buenos momentos y apoyo cuando más lo necesitaba durante mi estancia lejos de casa. Muchas gracias.

En general al **CIADE** por todo lo compartido con ellos y por siempre contar con su apoyo y buenos consejos.

A mi familia por siempre apoyarme en mis decisiones, por sus oraciones, por ser mi motivación.

A mis amigos los **I.I.A Marcela Villarreal, Mayela Ayala, Fernando Flores** y **Oscar Eduardo Santana**, por todos estos años de amistad y por su apoyo durante esta etapa. Muchas gracias.

Dedicatoria

Este trabajo está dedicado a quienes siempre han estado conmigo, quien son parte de mi vida, quienes me llenan de fuerza, quienes me regalan sus oraciones día a día, quienes me esperan en casa siempre con los brazos abiertos y sobre todo a los que siempre me han apoyado:

A mi madre Elvia Mata González quien inicio esta etapa a mi lado, y siempre ha estado con sus consejos y oraciones, para quien no tengo palabra para agradecerle todo lo que por mi ha hecho y de lo que de mí ha hecho. Te Amo Mama!

A mi padre Laurencio Cabanillas Diaz, por hacer de mí una persona de bien, por siempre ser para mí un ejemplo, por estar conmigo día a día y por todo su apoyo. Muchas gracias mi viejo.

A mis hermanos José Cabanillas y Raúl Cabanillas, por cada risa que me regalan día a día, por siempre estar cuando los necesito, pero sobre todo por aguantarme. Muchas gracias por de dos.

Y por último a Alma Marlen Zavala Urtusuastegui, primero por siempre apoyarme en mis decisiones, por entenderme, por aguantar estos dos años separados, por ser uno de mis más grandes ejemplos de lucha, por ser mi motivación y sobre todo por todo tu amor... ¡Gracias mi manzanita!

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Camarón.....	4
2.2 Producción de Camarón.....	5
2.3 Generalidades del Proceso de Camarón Crudo Congelado.....	7
2.4 Marco Normativo.....	11
2.4.1 Nacional.....	14
2.5 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	16
2.6 <i>Listeria monocytogenes</i>	19
III OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo General.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
4.1 Cepas.....	23
4.2 Estandarización de PCR.....	23
4.2.1 Solución de Trabajo.....	23
4.2.2 Primers.....	24
4.2.3 Condiciones de PCR.....	24
4.2.3.1 <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> :.....	24
4.2.3.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	25
4.2.4 Visualización de Productos de PCR.....	25
4.3 Límite de Detección de PCR.....	26
4.3.1 <i>L. monocytogenes</i> y <i>V. parahaemolyticus</i> en Matriz de Buffer.....	26
4.3.2 <i>L. monocytogenes</i> en Camarón.....	27
4.3.3 <i>V. parahaemolyticus</i> en Camarón.....	27
4.4 Muestreo y Análisis de Muestras.....	27
4.4.1 Análisis de Muestras: Detección, Identificación y Cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Listeria</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i>	30
4.4.1.1 <i>V. parahaemolyticus</i>	30
4.4.1.2 <i>Listeria</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i>	31
4.5 Análisis de las Diferentes Etapas del Proceso y Determinación los Posibles Puntos o Medidas de Control.....	31
4.6 Análisis Estadístico.....	32

CONTENIDO (continuación)

V.	RESULTADOS	33
5.1	Estandarización de PCR.....	33
5.2	Límite de Detección	33
5.2.1	<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en Matriz de Buffer.....	33
5.2.2	<i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en Camarón	36
5.3	Análisis de Muestras: Detección, Identificación y Cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Listeria</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i>	38
5.3. 1	<i>V. parahaemolyticus</i>	38
5.3 2	<i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	44
5.4	Análisis de las Diferentes Etapas del Proceso y Determinación los Posibles Puntos o Medidas de Control.....	49
5.4.1	<i>V. parahaemolyticus</i>	49
5.4 2	<i>L. monocytogenes</i>	51
5.5	Análisis Estadístico.....	51
5.5.1	<i>V. parahaemolyticus</i>	51
5.5 2	<i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	52
VI.	DISCUSION	57
6.1	Límite de Detección	57
6.2	Análisis de Muestras: Detección, Identificación y Cuantificación de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Listeria</i> spp. y <i>Listeria monocytogenes</i>	59
6.2.1	<i>V. parahaemolyticus</i>	59
6.2.2	<i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	63
6.3	Análisis de las Diferentes Etapas del Proceso y Determinación los Posibles Puntos o Medidas de Control.....	64
6.3.1	<i>V. parahaemolyticus</i>	64
6.3.2	<i>L. monocytogenes</i>	66
VII.	CONCLUSIÓN	67
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	70

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Principales Estados productores de camarón vivo en México	6
2. Clasificadora mecánica de camarón	10
3. <i>Vibrio parahaemolyticus</i> visto por microscopio electrónico de barrido, amplificado 21815X.....	17
4. Micrografía electrónica de <i>L. monocytogenes</i> flagelada, amplificada 41250X.....	20
5. Puntos de muestreo y tipo de muestras tomadas durante el proceso de camarón crudo congelado.....	29
6. Visualización mediante electroforesis de la estandarización de PCR.....	34
7. Diluciones seriadas del límite de detección para <i>L. monocytogenes</i> en matriz de buffer	35
8. Diluciones seriadas del límite de detección para <i>V. parahaemolyticus</i> (CAIM 320) en matriz de buffer	36
9. Niveles de concentración promedio de <i>V. parahaemolyticus</i> , en músculo de camarón en las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado.....	38
10. Niveles de concentración promedio de <i>V. parahaemolyticus</i> en agua y superficies de contacto por planta, en las diferentes etapas de proceso del camarón crudo congelado.....	40
11. Niveles de <i>V. parahaemolyticus</i> en músculo de camarón obtenido durante el proceso de camarón crudo congelado a diferentes meses de muestreo	41
12. Niveles de <i>V. parahaemolyticus</i> , por mes de muestreo en agua y superficies de contacto directo a lo largo de las diferentes etapas del proceso del camarón crudo congelado.....	42
13. Niveles promedio de <i>V. parahaemolyticus</i> en músculo de camarón, por origen de muestra en las diferentes etapas del proceso del camarón crudo congelado.....	43

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
14.	Niveles promedios de <i>V. parahaemolyticus</i> en aguas y superficies de contacto directo por origen de la muestra a lo largo de las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado	44
15.	Diagrama de flujo del proceso de producción del camarón crudo congelado.....	50

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Límite máximo permitido para <i>L. monocytogenes</i> en diferentes países para varios tipos de alimentos	13
2.	Límite máximo de <i>V. parahaemolyticus</i> permitido en alimentos de origen marino en diferentes países	14
3.	Límites microbiológicos nacionales para productos frescos, refrigerados y congelados (Parte comestible)	15
4.	<i>Primers</i> utilizados para la identificación por PCR de <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp.	24
5.	Tipo y cantidad de muestras colectadas en las diferentes áreas y etapas del proceso de camarón crudo congelado	28
6.	Límite detectado para <i>L. monocytogenes</i> en matriz de músculo de camarón.	37
7.	Límite detectado de <i>V. parahaemolyticus</i> en matriz de músculo de camarón	37
8.	Resultados de <i>Listeria</i> spp. para las tres plantas procesadoras muestreadas.....	45
9.	Resultados de <i>L. monocytogenes</i> para las tres plantas procesadoras muestreadas	46
10.	Prevalencia de <i>Listeria</i> spp. para las tres plantas procesadoras muestreadas.....	47
11.	Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> para las tres plantas procesadoras muestreadas.....	48
12.	Muestras positivas para <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i> agrupadas por tipo de muestra	49
13.	Coefficiente de correlaciones ($\alpha = 0.05$) para cada par de variables de respuesta consideradas (<i>V. parahaemolyticus</i>).....	53
14.	Nivel de significancia estadística para las correlaciones entre variables (<i>V. parahaemolyticus</i>)	54

LISTA DE TABLAS (continuación)

Figura		Página
15.	Coefficiente de correlaciones ($\alpha = 0.05$) para cada par de variables de respuesta consideradas (<i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>).....	55
16.	Nivel de significancia estadística para las correlaciones entre variables (<i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>)	56
17.	Comparativo de costos entre técnicas	58

RESUMEN

Numerosos casos de enfermedades transmitidas por alimentos se han relacionado con el consumo de productos de origen marino. Ante esta problemática, a nivel nacional e internacional se han desarrollado e implementado regulaciones con un mayor control sobre la inocuidad de estos productos. Para los crustáceos, como el camarón, se establece en la normatividad mexicana la determinación de *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*, causantes de listeriosis y gastroenteritis respectivamente. Sin embargo, el proceso de camarón crudo congelado no cuenta con suficiente información relacionada a los niveles de estas bacterias para establecer sus puntos de control. Por lo anterior, el presente estudio se buscó determinar la prevalencia y niveles de contaminación para *Listeria* spp., *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* como riesgos asociados al procesamiento del camarón crudo congelado. Se hicieron tres muestreos a lo largo de la línea de procesamiento de camarón crudo congelado en tres plantas procesadoras, ubicadas en Guaymas, Sonora. Las muestras fueron analizadas por la técnica propuesta de NMP-PCR previamente estandarizada. El límite de detección para cada patógeno se estableció en 0.015 UFC/g o mL. Se encontró que *V. parahaemolyticus* se encuentra distribuido a lo largo de todo el proceso de producción, sin embargo, sus niveles se vieron influenciados por el origen del producto, mes de muestreo y etapa del proceso. Los niveles más altos se encontraron al inicio del proceso, en la etapa de recepción de producto para camarón de bahía (1,665 NMP/g). *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* se encontraron a niveles muy bajos (< 1NMP/g), sin correlación con el proceso u otra variable, por lo que estas no parecen estar relacionadas con el proceso de camarón crudo congelado, sino que más bien se encuentran debido a contaminación incidental. En el caso de *V. parahaemolyticus* se recomienda establecer un punto de control en la etapa de recepción de producto de bahía. Para ambos patógenos, es importante que se establezcan y lleven a cabo buenas prácticas de manufactura a lo largo del proceso de camarón crudo congelado.

Palabras claves: Camarón crudo congelado, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT

Many cases of food poisoning have been linked to the consumption of seafood. Before this problem at the national and international levels, have been developed and implemented regulations with greater control over the safety of these products. For crustaceans, such as shrimp, national regulations set determining *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus*, causing listeriosis and gastroenteritis respectively. However, the process of frozen raw shrimp does not have sufficient background to establish points of control for these pathogens. Therefore the present study sought to determine the prevalence of *Listeria* spp., *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* as risk associated with frozen raw shrimp process. For this were at least three sampling throughout the process of raw frozen shrimp in three processing plants located in Guaymas, Sonora. The samples were analyzed by the MPN-PCR technique; this technique had a previous standardization and determination of the limit of detection for each pathogen (0.015 FCU/g o mL). Finding that *V. parahaemolyticus* is distributed throughout the production process, however levels were influenced by the origin of the product, sampling month and the stages of the process, finding the highest levels at the beginning in the stage of receipt of product. *Listeria* spp. And *L. monocytogenes* had a very low and variable prevalence in each replicate sampling, consequently these bacteria are not related with the process of frozen raw shrimp. Thus for *V. parahaemolyticus* is recommended to establish a control point at the stage of receipt of product, nevertheless for *L. monocytogenes* is not necessary any specific control point, however for both pathogens, it is important to establish and carry out good manufacturing practices throughout the process of frozen raw shrimp.

Key words: frozen raw shrimp, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*.

I. INTRODUCCIÓN

El camarón es uno de los principales productos de la pesca y acuicultura, tanto por su valor comercial como por los volúmenes de producción. A nivel mundial, la producción de este crustáceo es de aproximadamente 1.5 millones de toneladas anuales (Cifuentes *et al.*, 2002). Los tres principales países productores de camarón son China, Tailandia e Indonesia (Cifuentes *et al.*, 2002). Durante el 2011, México ocupó el sexto lugar en la producción de camarón a nivel mundial con 184,124 toneladas en peso vivo, lo que lo sitúa como el principal producto de origen marino por su valor económico y en el segundo lugar por su volumen de producción. Del total de la producción mexicana de este crustáceo, el 98.5 % es congelado en bloque, siendo Estados Unidos de América, Japón y España los principales destinos del camarón mexicano (Conapesca, 2011). Este crustáceo es uno de los productos de origen marino preferidos por el consumidor norteamericano, teniendo un consumo per cápita entre 1.3 a 1.6 Kg anuales (Briggs *et al.*, 2005).

Debido a las características propias del camarón y al manejo al que es sometido desde la captura hasta su consumo, este producto al igual que otros alimentos, se ha visto implicado en la propagación de enfermedades al consumidor causadas por microorganismos patógenos. La OMS estima que las enfermedades diarreicas transmitidas por alimentos (ETAs), provocan la muerte a cerca de 2.2 millones de personas cada año, por lo que son consideradas un problema de salud pública creciente (OMS, 2013).

La propagación e incremento de los problemas de salud asociados al consumo de alimentos marinos contaminados, ha llevado al sector industrial a adoptar sistemas de aseguramiento de calidad e inocuidad para ofrecer productos que no dañen la salud del consumidor. Las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y el Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) tienen la finalidad de prevenir más que corregir, basándose en estudios científicos de los posibles peligros que afectan al proceso y/o productos.

Por otro lado, los diferentes países emiten normas y regulaciones para garantizar la inocuidad del producto. Como consecuencia del incremento generalizado de las ETAs, las agencias reguladoras consideran la implementación de sistemas basados en el control de los parámetros del proceso como garantía del control de los riesgos asociados al proceso. Así, a través de medidas de control, se pueden garantizar las especificaciones sanitarias sin necesidad del análisis total de la producción. En el caso de los productos marinos, los procesadores deben garantizar el cumplimiento de los criterios sanitarios del mercado al que van destinados sus productos, así como las especificaciones emitidas por la Secretaría de Salud en México. En cuestión de riesgos microbiológicos relacionados con el camarón, tradicionalmente se incluían criterios como *Salmonella*, *S. aureus*, *V. cholerae* y coliformes fecales, pero recientemente se ha incluido a *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes* dentro de las especificaciones mexicanas para la parte comestible de crustáceos frescos refrigerados y congelados. En México y Estados Unidos de América, el límite máximo permitido de *V. parahaemolyticus* es de 1×10^4 NMP/g, mientras que en la Unión Europea y Japón es de tan solo 100 NMP/g. En el caso de *L. monocytogenes*, las variables entre límites permisibles pueden ser aún mayores, ya que no en todos los países es obligatorio su determinación en crustáceos frescos refrigerados y congelados.

El comportamiento de ambos patógenos es muy diferente, pero presentan características o condiciones que favorecen su presencia en el

proceso del camarón crudo congelado. *V. parahaemolyticus* es una bacteria que se encuentra de manera natural en el medio marino, por lo que su presencia es común en aguas costeras y productos marinos, además de presentar una afinidad por la quitina presente en la cáscara del camarón. Por lo que no es extraño que se encuentre en productos marinos y sea una de las principales causas de enfermedades asociadas al consumo de camarón (Zamora et al., 2005). Por otro lado, *L. monocytogenes* se encuentra diseminada en todo el medio ambiente, por lo que la contaminación del alimento se puede dar a través de cualquier medio, siendo los principales contaminantes el agua y el polvo (Elliot y Elmer, 2007). Además, esta bacteria es psicrófila y halotolerante, pudiendo crecer en un amplio rango de temperaturas (-0.4 a 45 °C), por lo que se le asocia a ductos y sistemas de refrigeración. Esta bacteria se ha asociado mucho más a productos que han recibido tratamiento térmico y se encuentran listos para su consumo (Kramarenko et al., 2013).

Por todo lo anterior, se considera que el proceso de camarón congelado en bloque puede presentar condiciones favorables y al mismo tiempo limitaciones para la supervivencia y/o crecimiento de ambos patógenos. En el caso de *V. parahaemolyticus*, puede llegar al proceso al encontrarse asociado al origen del producto, aunque las condiciones de proceso no le sean favorables. Mientras que para *L. monocytogenes* no se asocia al origen del proceso, pero las condiciones presentes en la planta procesadora no necesariamente limitan su desarrollo. A pesar de ello, no existen estudios que documenten los niveles de estos patógenos a lo largo de la línea de proceso del camarón congelado en bloque, por lo que para garantizar el cumplimiento normativo del camarón mexicano, es necesario conocer los niveles presentes de ambas bacterias en este proceso, para en caso necesario, determinar las medidas óptimas de control.

II. ANTECEDENTES

2.1 Camarón

El camarón es un producto muy apreciado tanto por su palatabilidad como por sus características nutricionales, por lo que las diversas especies de este crustáceo constituyen un importante recurso acuícola y pesquero. En México, se estima que el promedio de producción de camarón durante el periodo del 2001 al 2010 fue de 114,400 ton de peso vivo, correspondiendo el 40.3% a la producción acuícola y el 59.7% a la captura silvestre (Pasquier, 2000; Beltrán, 2006; Conapesca, 2010).

El cuerpo de este crustáceo se encuentra dividido en tres partes o regiones: cefalotórax (cabeza); abdomen y telson (cola), las cuales están protegidas por un exoesqueleto de alto contenido de quitina. El abdomen es en sí la parte del camarón más apreciada y la que influye en gran medida en el grado de calidad de este producto, ya que su integridad es uno de los atributos más buscados por el consumidor (De Andrade *et al.*, 2012; Manjarrez, 2006). Este crustáceo puede ser capturado en altamar, esteros y bahías, o cultivado en estanques acuícolas. La captura en altamar se realiza por temporadas, una vez que el camarón cumple su ciclo de vida; el camarón de cultivo es cosechado manual o mecánicamente después de que la post-larva alcanza la talla comercial durante la etapa de engorda (Cifuentes *et al.*, 2002; FAO, 1988).

2.2 Producción de Camarón

En México, el camarón es uno de los principales productos pesqueros y acuícolas, ya que ocupa el segundo lugar por su volumen de captura y el primer lugar por su valor comercial, es uno de los principales productos de exportación, principalmente hacia Estados Unidos de América, Japón y España. Debido a sus grandes volúmenes de captura y a la derrama económica que genera, el camarón es un recurso de gran importancia a nivel nacional e internacional, siendo los principales productores China, Tailandia, Indonesia, Vietnam, Canadá, Estados Unidos de América y México, el cual aporta el 2.2% de la producción mundial (Conapesca, 2010).

En el 2011, se produjeron en México 184,123 toneladas de camarón en peso vivo, siendo los principales productores los estados de Sinaloa, Sonora y Nayarit (Figura 1). De la producción total nacional, el 23.3% corresponde a la captura en altamar (la cual se realiza en aguas del Océano Pacífico, Golfo de México y Mar Caribe), un 17% al capturado en bahías y esteros y el 59.7% corresponde al producto obtenido por acuicultura (SAGARPA, 2010; Conapesca, 2010; Gillett, 2010; Conapesca, 2011). De la producción total de camarón, México destina el 98.5% a la congelación, ocupando el sexto lugar a nivel mundial en la producción de este tipo de producto, ya que la mayor parte del camarón mexicano se comercializa fresco-congelado y en menor proporción como fresco, seco, seco-salado, enlatado, en salmuera, cocido, entre otros (Conapesca, 2011).

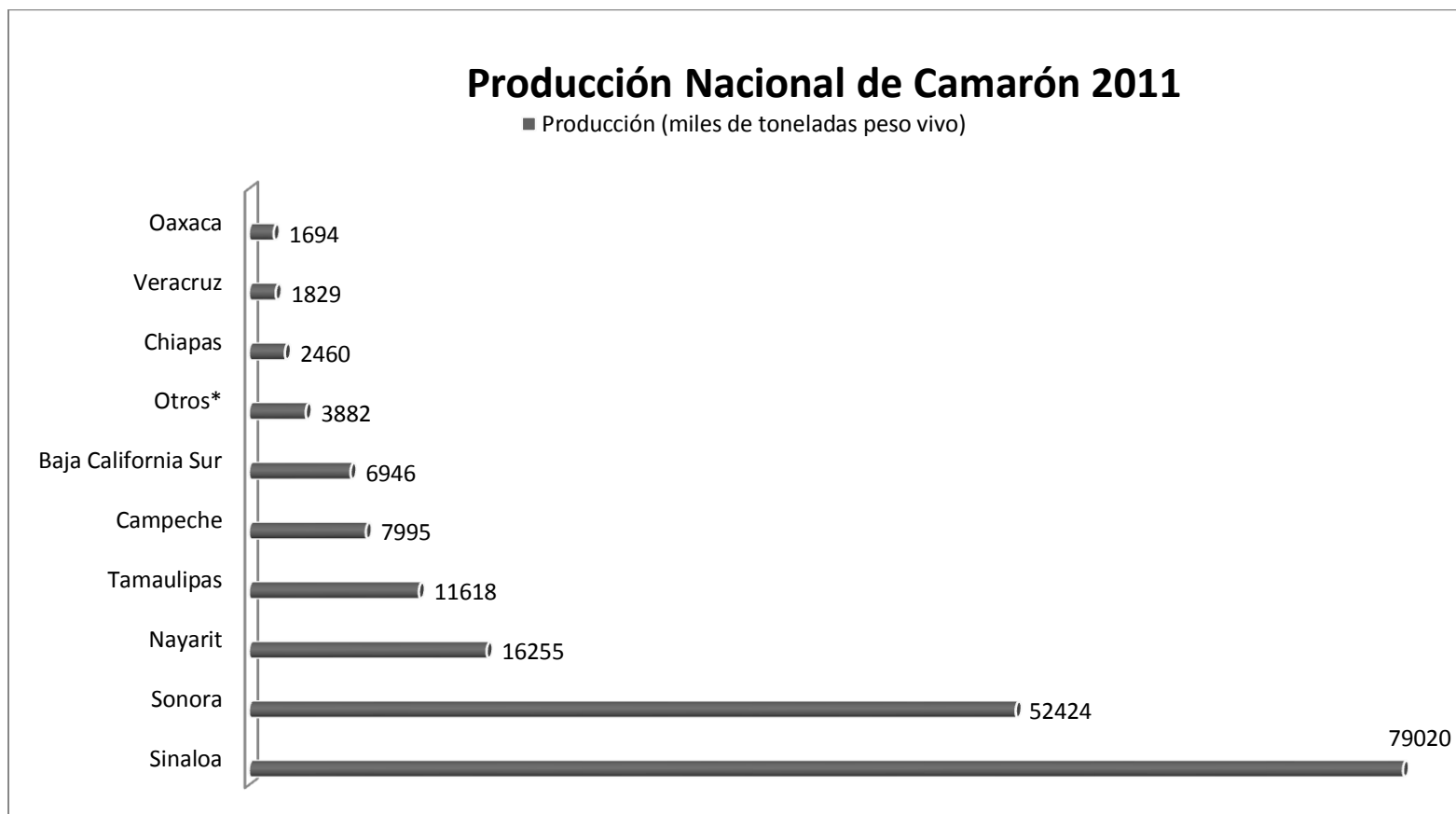


Figura 1. Principales Estados productores de camarón vivo en México (Conapesca, 2011).

2.3 Generalidades del Proceso de Camarón Crudo Congelado

El proceso para la producción de camarón crudo congelado, independientemente del tamaño de la empresa o recursos con que cuente es básicamente el mismo entre plantas procesadoras. Las diferencias radican principalmente en la aplicación de las buenas prácticas de manufactura, en la infraestructura o equipamiento con que se cuenta, en la presentación final del producto y en el origen de la materia prima, ya que el camarón de acuicultura generalmente requiere de una etapa de descabezado. En general, el procesamiento del camarón sin cabeza fresco-congelado en bloque, consta de las siguientes etapas:

a) Recepción: Esta etapa es el inicio del proceso de producción del camarón crudo congelado, la cual es el punto de entrada del producto a la planta procesadora, el cual debe de venir a bajas temperaturas y en contenedores cerrados y limpios. Si el camarón proviene de embarcaciones mayores, generalmente se recibe descabezado y congelado; si proviene de esteros, bahía o acuicultura, el producto es recibido enhielado con o sin cabeza. En este punto generalmente se realiza una inspección del producto, en la cual se revisa la temperatura de llegada, el color, el olor y cualquier otra anomalía que el camarón pudiese presentar (Cárdenas-Bonilla y Noriega-Orozco, 2003).

b) Lavado: Esta etapa del proceso tiene como finalidad disminuir la contaminación en el producto, ya que remueve arena, tierra, microorganismos y materia extraña. Dependiendo de la planta procesadora, se pueden realizar uno o más lavados, realizando el primer lavado durante la recepción del producto o como etapa que completamente a ésta. Los lavados posteriores se realizan principalmente para mantener el producto a bajas temperaturas (agua/hielo) y evitar el aumento de la carga bacteriana.

El lavado del producto se realiza en una tolva con agua fría y/o hielo potable, a la cual se le adiciona cloro para obtener una concentración entre 10 y 250 ppm, lo cual dependerá del origen del camarón y del número de lavados realizados.

Como parte de las buenas prácticas de manufactura (BPM), es necesario cambiar el agua de lavado con la frecuencia necesaria, o al menos entre cada lote de producción.

c) Pesado: El producto es removido de la tolva del primer lavado y colocado en la báscula para ser pesado; esta etapa sirve para verificar el rendimiento de la producción final. El producto pesado, pasa a bandas transportadoras, las cuales llevarán el producto a la siguiente etapa del proceso.

d) Selección por tallas: En esta etapa, el camarón es separado en función de su tamaño antes de ser empacado, lo cual comúnmente es realizado mediante el uso de seleccionadoras mecánicas (Figura 2), aunque la selección por tallas puede realizarse completamente manual. Cuando se realiza mecánicamente, una banda transportadora lleva el producto hasta la seleccionadora, la cual realiza la separación por tallas cuando el camarón pasa entre rodillos giratorios que están separados entre sí a diferentes longitudes de un extremo a otro y que funcionan como aperturas de caída para el producto. Dependiendo del número de máquinas seleccionadoras instaladas de manera continua, se puede o no lograr la separación total por tallas, aunque generalmente se realiza una separación parcial.

e) Selección y empaque: En esta etapa, personal debidamente entrenado selecciona manualmente el camarón, el cual en base a su talla comercial y calidad lo va acomodando o empacando en charolas plásticas que pueden o no contener un lienzo de polietileno que sirve para proteger el producto (Economía, 2013).

f) Pesado y clasificado: En esta etapa, el producto ya empacado en las charolas, es inspeccionado para garantizar la uniformidad de talla y calidad. Así mismo, las charolas con el producto son pesadas individualmente para ajustarlas al peso correspondiente.

g) Primer glaseado: Al camarón ya acomodado, pesado y clasificado en las charolas, se le adiciona agua potable fría (0-2°C) para llenar el espacio vacío entre los camarones y proteger al producto durante su congelación y

almacenamiento. Posteriormente, el lienzo de polietileno (cuando se tiene) es doblado o cerrado sobre la superficie de los camarones y las charolas son colocados en los carritos que las llevarán al área de congelación.

h) Congelación: El producto es transportado hasta los congeladores, en los cuales la temperatura está entre los -30 a -35°C con el fin de proporcionar una congelación rápida que evite dañar lo menos posible al producto. Una vez congelado, el producto es retirado del congelador y llevado a la siguiente área de proceso (Cárdenas-Bonilla y Noriega-Orozco, 2003).

i) Empaque primario: El producto ya congelado se saca de las charolas plásticas en forma de bloque (marqueta), el cual se coloca dentro de una caja de cartón parafinado (funda). Si el producto fue congelado en su empaque primario, pasan directamente al segundo glaseo.

j) Segundo Glaseado: El camarón en su empaque primario, es sumergido en agua potable fría (0 °C) durante pocos segundos. Esta agua forma una capa delgada que ayuda a prevenir la deshidratación del producto durante su almacenamiento en congelación y ayuda a alargar su vida de anaquel.

k) Empaque secundario: Inmediatamente después del segundo glaseado, las marquetas de camarón son colocadas en cajas de cartón corrugado y encerado (master), lo cual le proporciona mayor protección al producto y facilita su manejo. Posteriormente las cajas son cerradas, flejadas y acomodadas en tarimas para su almacenamiento (Economía, 2013).

l) Almacenamiento: En esta etapa, el producto final es conservado a una temperatura de -20 a -25°C, para lo cual, los master estibados son acomodados dentro de las cámaras de congelación de tal forma que se permita el flujo de aire frío entre las cajas. Para evitar contaminaciones cruzadas o pérdida de calidad en el producto, también es importante mantener el orden y la limpieza dentro de estas cámaras (Cárdenas-Bonilla y Noriega-Orozco, 2003).



Figura 2: Clasificadora mecánica de camarón (Balzo, 2013).

2.4 Marco Normativo

Uno de los principales objetivos de las agencias reguladoras a nivel mundial es el de proteger la salud pública, es por ello que dichas agencias se encargan de emitir normas y especificaciones sanitarias, así como de vigilar su cumplimiento (Huss, 1995). Cada País tiene diferentes condiciones de producción y procesamiento, por lo que es común contar con políticas y marcos regulatorios diferentes entre países (Ababouch, 2005). Sin embargo, la participación activa de las agencias reguladoras, productores y consumidores en el desarrollo de normas y criterios específicos, facilita la aceptación de los productos tanto en los mercados nacionales como internacionales (Chávez y Montoya, 2007).

Con el fin de garantizar la calidad y la protección de la salud del consumidor, la legislación alimentaria referente a productos marinos aborda aspectos de calidad, producción, inocuidad e información al consumidor, entre otros. Siendo este último quien en los últimos años ha mostrado una creciente preocupación por el valor nutricional y la inocuidad de los alimentos que consume (Chávez y Montoya, 2007; OMS, 2009; Beulens *et al.*, 2005). Es por ello que el garantizar la inocuidad de los productos alimenticios, es responsabilidad compartida entre procesadores, agencias reguladoras y consumidores, ya que cada uno juega un papel muy importante. Actualmente, las agencias gubernamentales promueven la implantación de programas enfocados a realizar mejoras en los procesos productivos y de manufactura, buscando con esto el garantizar la inocuidad de los alimentos. Ejemplo de ello, es la aplicación del sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP, por sus siglas en inglés) y de las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). Ambos ayudan a la producción de alimentos inocuos, basándose en la prevención y control en cada etapa de proceso, más que en la inspección del producto final (Chávez y Montoya, 2007).

A pesar de las diferencias en cuanto a legislación, la adopción como base de la regulación de pescados y mariscos de los siete principios básicos del Sistema HACCP, ha favorecido la producción y la comercialización entre países de estos productos (Higuera-Ciapara y Noriega-Orozco, 2000). La correcta implementación de las BPM y del Sistema HACCP, le brinda a las empresas productoras la oportunidad de incursionar en los mercados internacionales. Además, el contar con sistemas de vigilancia de la inocuidad de los alimentos, tanto en países exportadores como importadores, ayuda a reforzar el cumplimiento de la regulaciones locales e internacionales (Gardea *et al.*, 2007; Schillhorn y Tjaart, 2005; Lin, 2011; OMS, 2009). Para una correcta implementación de estos sistemas, y poder garantizar la inocuidad de los productos marinos, es imprescindible identificar y conocer los peligros potenciales existentes en cualquier eslabón de la cadena productiva. De esta manera, la prevención de estos peligros se convierte en una de las herramientas esenciales para lograr la inocuidad de los productos. Por lo anterior, las empresas procesadoras se enfocan en el control los parámetros del proceso y de las bacterias patógenas para mantenerlos dentro de los límites aceptables en el país de producción y/o en el mercado de destino (Beulens *et al.*, 2005). Es común que existan especificaciones que indiquen los requerimientos para las materias primas, para el procesamiento, y para el producto terminado. En el caso de los pescados y mariscos, al igual que en otros alimentos, las especificaciones sanitarias varían en función del país u organismo que las emite, lo que muchas veces dificulta su comercialización, ya que pueden ser la causa de rechazo, detención o destrucción del producto en los puntos de frontera del país de ingreso (Abdullah *et al.*, 2013).

A nivel internacional, las mayores diferencias en cuanto a la regulación alimentaria, se ve entre los países desarrollados y los no desarrollados, siendo estos últimos los que generalmente adoptan las especificaciones del mercado al que se quiere exportar, especialmente cuando cuentan con especificaciones más estrictas (Gardea *et al.*, 2007; Schillhorn y Tjaart, 2005). La Unión Europea es un ejemplo de lo anterior, ya que generalmente cuenta con especificaciones

más estrictas que los países a los que importa sus diferentes productos (Stauffer, 1994; Gardea *et al.*, 2007).

Para los principales importadores de productos marinos como la Unión Europea, Estados Unidos de América y Japón, los problemas asociados a la inocuidad de pescados y mariscos son los ocasionados por bacterias patógenas y toxinas químicas. Pero a pesar de reconocer una misma problemática, no cuentan con normativas homologadas y establecen diferentes especificaciones sanitarias para sus productos. Ejemplo de ello, es la discrepancia entre valores permisibles establecidos para *Listeria monocytogenes* (Tabla 1) y *Vibrio parahaemolyticus* (Tabla 2) entre los diferentes países (Lake *et al.*, 2003; Ababouch, 2005; DaSilva, 2010; Ferri *et al.*, 2010).

Tabla 1: Límite máximo permitido de *L. monocytogenes* en diferentes países para varios tipos de alimentos (Zeland, 2003; Ababouch, 2005).

País	Alimento	Límite máximo
EUA	LPC de origen marino	Ausente en 25 g
Austria	LPC de origen marino	Ausente en 25 g
Nueva Zelanda	LPC de origen marino	Ausente en 25 g
Italia	LPC de origen marino	Ausente en 25 g
Canadá	LPC	Ausente en 25 g
Alemania	En punto de consumo	< 100 UFC/g
Holanda	En punto de consumo	< 100 UFC/g
Francia	En punto de consumo	< 100 UFC/g
Canadá	Alimentos que favorecen el crecimiento durante su almacenamiento	< 100 UFC/g
Dinamarca		< 100 UFC/g

LPC: Listos Para el Consumo UFC: Unidades Formadoras de Colonias

Tabla 2: Límite máximo de *V. parahaemolyticus* permitido en alimentos de origen marino en diferentes países (Lake *et al.*, 2003; Ababouch, 2005; DaSilva, 2010; Ferri *et al.*, 2010).

País	Alimento	Límite máximo
Japón	De origen marino	< 100 NMP/g
España	De origen marino	100 NMP/g
Nueva Zelanda	De origen marino	1,000 NMP/g
México	De origen marino	10,000 NMP/g
EUA	De origen marino	10,000 NMP/g

UFC: Unidades Formadoras de colonias

2.4.1 Nacional

En la República Mexicana, la autoridad sanitaria responsable de la regulación, el control y el fomento sanitario de los productos alimenticios es la Secretaría de Salud, la cual, a lo largo del tiempo, ha desarrollado e implementando normatividades con la finalidad de lograr una base legal enfocada, entre otros aspectos, en la inocuidad de los alimentos (FAO y OMS, 2002).

Dentro de las medidas que ha diseñado el Gobierno Mexicano, se encuentra el desarrollo, modificación e implementación de nuevas leyes y reglamentos para garantizar la inocuidad alimentaria. Un ejemplo de esto es la implementación de la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, la cual establece las especificaciones sanitarias de los productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados, incluyendo las áreas de captura de moluscos bivalvos; los establecimientos que procesan estos productos y las embarcaciones de pesca y recolección. En el caso de los productos frescos refrigerados o congelados, esta norma establece las especificaciones microbiológicas (Tabla 3) para coliformes fecales y/o *E. coli*, *Salmonella* spp.,

Vibrio cholerae, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Listeria monocytogenes*, entre otras (SSA, 2011).

Tabla 3: Límites microbiológicos nacionales para productos frescos, refrigerados y congelados (Parte comestible) (SSA, 2011).

ESPECIFICACIÓN	ESPECIES	LÍMITE MÁXIMO
Coliformes fecales y/o <i>E. coli</i>	Pescados y crustáceos	400 NMP/g
	Moluscos bivalvos	230 NMP/100 de carne y líquido valvar
	Moluscos cefalópodos y gasterópodos	230 NMP/100 de de carne
<i>Vibrio cholerae</i> O:1 y no O:1	Moluscos bivalvos	Ausente en 50 g
	Demás productos de la pesca	Ausente en 50 g
<i>Salmonella</i> spp.	Todas	Ausente en 25 g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Moluscos bivalvos y crustáceos	10 ⁴ NMP/g
<i>Vibrio vulnificus</i>	Moluscos bivalvos	Ausente en 50 g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Todas	Ausente en 25 g
<i>Clostridium botulinum</i>	Todas (solo en productos preenvasados al vacío)	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Todas	1000 UFC/g
Enterotoxinas estafilococcicas	Todas	Negativo

Esta nueva Norma Oficial Mexicana, en cuestión de riesgos microbiológicos, ya contempla las especificaciones para *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes* en la parte comestible de los crustáceos frescos refrigerados y congelados, ya que anteriormente solo se incluían los criterios para *Salmonella*, *S. aureus*, *V. cholerae*, coliformes fecales y bacterias mesofílicas. Un aspecto de importancia a considerar en las especificaciones para la determinación y cuantificación de *V. parahaemolyticus*, es la falta de técnicas para comprobar la presencia o ausencia de este patógeno y en el mismo caso también la falta de técnicas oficiales para la cuantificación de este patógeno. Debido a lo anterior en nuestro país la determinación de *V. parahaemolyticus* se lleva a cabo en base a la Norma Oficial NOM-242-SSA1-2009, esto conforme a la técnica establecida para *V. cholerae*. Mientras que para la cuantificación en

Numero Más Probable (NMP) es utilizada la técnica descrita en la Norma Oficial NOM-112-SSA1-1994; La técnica de NMP proporciona una estimación estadística de la densidad microbiana presente con base a que la probabilidad de obtener tubos con crecimiento positivo disminuye conforme es menor el volumen de muestra inoculado (SSA, 1994). En el caso de Estados Unidos de América, la regulación establecida por la Food and Drug Administration (FDA, por sus siglas en inglés) para la identificación de *V. parahaemolyticus* acepta como alternativa la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Kaysner y DePaola, 2004); La idea básica de la técnica es duplicar repetidamente un fragmento de ADN, utilizando entre otros reactivos una polimerasa, para lograr esta duplicación se constan de tres etapas (desnaturalización, alineación y extensión) las cuales son realizadas en repetidas ocasiones (de 30 a 40 ciclos) (Eguiarte *et al.*, 2007).

2.5 *Vibrio parahaemolyticus*

Las bacterias del género *Vibrio* se encuentran de manera natural en el medio marino, sin embargo, las aguas costeras contaminadas pueden contener especies patógenas de este tipo de bacterias, las cuales pueden ocasionar problemas de salud a los consumidores de los productos de la pesca que se extraen de estas aguas contaminadas. Las principales especies de *Vibrio* relacionadas con enfermedades humanas son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. mimicus* (Austin, 2010; Vora *et al.*, 2005). En Japón se estima, que entre el 50 y 70% de los casos de diarrea asociados con el consumo de productos marinos, son ocasionados por *V. parahaemolyticus* (Venkateswaran *et al.*, 1998).

Vibrio parahaemolyticus (Figura 3) es un microorganismo Gram negativo, de 1.4-2.6 μm de longitud por 0.5-0.8 μm de diámetro, presenta movilidad, mediante un solo flagelo polar. Crece en condiciones de salinidad entre 3 y 8% de NaCl, en un rango de temperatura de 10 a 44 °C, con una óptima de

crecimiento de 35 a 37°C, el rango de pH varía entre 5 y 11, con un intervalo óptimo de 7.5 a 8.6; presenta un tiempo de generación estimado de 10-12 minutos y un rango de actividad acuosa de 0.940 a 0.996, siendo el óptimo de 0.98 (Zamora *et al.*, 2005; Broberg *et al.*, 2011). Esta bacteria es anaerobia facultativa, presenta metabolismo oxidativo y fermentativo, y es productora de catalasa. Fermenta diversos azúcares como el manitol, arabinosa y manosa, así como la glucosa sin producción de gas; es incapaz de degradar la sacarosa, lactosa e inositol; presenta un comportamiento variable en la degradación de ramnosa y en la producción de ureasa (Zamora *et al.*, 2005; Broberg *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2008; Vongxay *et al.*, 2006; Yi-Cheng y Chengchu, 2007; Lake *et al.*, 2003).

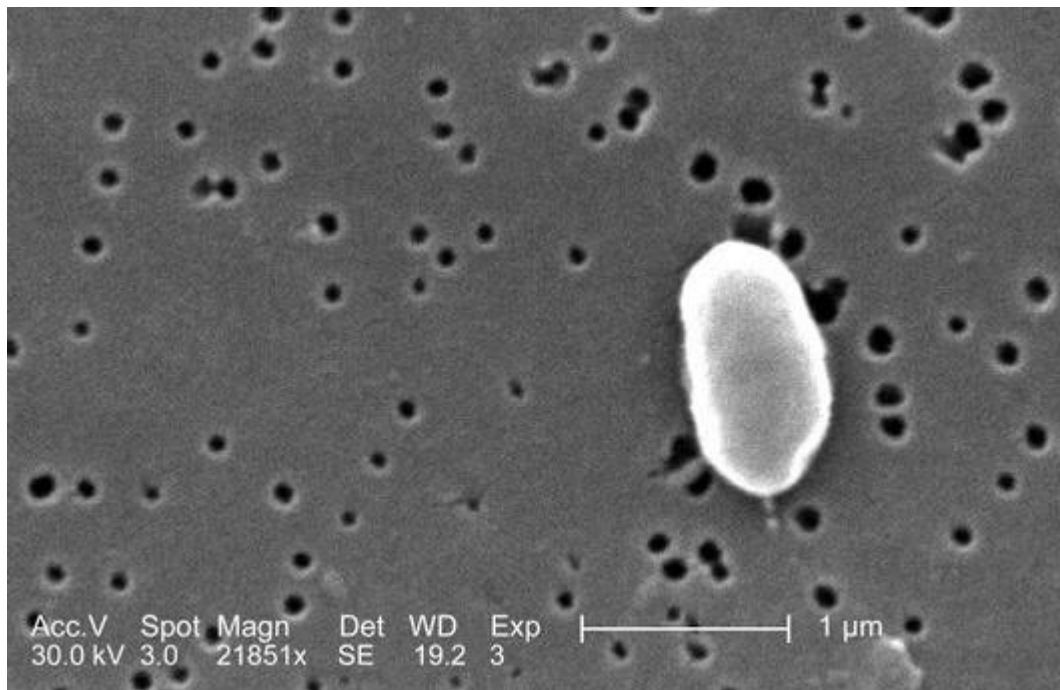


Figura 3 *Vibrio parahaemolyticus* visto por microscopio electrónico de barrido, amplificada 21815X (Carr, 2012).

El hábitat natural de este microorganismo es acuático y su distribución es dependiente de la temperatura, de la concentración de sodio y de los nutrientes presentes en la columna de agua, por lo que *Vibrio parahaemolyticus* es aislado del sedimento, plancton, bivalvos (mejillones, almejas y ostras), bacalao,

sardina, caballa, lenguado, pulpo, langosta, cangrejos y camarones; siendo estos últimos una de las principales vías de transmisión al humano, ya que la bacteria se adhiere a la quitina contenida en la cáscara del camarón y ahí se sigue desarrollando (Silva *et al.*, 2008; Broberg *et al.*, 2011; Yi-Cheng y Chengchu, 2007; Zamora *et al.*, 2005). Este microorganismo también ha sido asociado al consumo de ancas de rana, ceviches, frutas y vegetales crudos. La dosis infectiva de *V. parahaemolyticus* está reportada entre 1×10^5 a 1×10^7 UFC/mL (Zamora *et al.*, 2005). La transmisión de la infección al humano se da principalmente cuando este microorganismo se desarrolla y logra alcanzar la dosis infectiva en el alimento consumido, lo cual puede presentarse cuando los alimentos no son manejados adecuadamente. Existen reportes que muestran una disminución de 4 a 5 ciclos logarítmicos al someter el alimento contaminado a 60 °C por 5 minutos. Sin embargo esto no es determinante, ya que también se ha comprobado la habilidad de este patógeno para incrementar su resistencia a esta combinación de tiempo-temperatura cuando la matriz del alimento se encuentra en un medio salino (Adams y Moss, 2004).

Una vez en el organismo, el periodo de incubación varía de 2 horas a 4 días, aunque usualmente se manifiestan los síntomas entre las 9 y 25 horas de haber consumido el alimento contaminado. La velocidad con la que aparecen los primeros síntomas está directamente relacionada con su alta capacidad de reproducción (10 a 12 minutos) (Zamora *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008). La patogenicidad o factor de virulencia más importante de *V. parahaemolyticus* es debida a la producción de una proteína con actividad hemolítica, la cual es conocida como toxina TDH (hemolisina directa termoestable). Otro factor importante en la virulencia de esta bacteria es la provocada por la hemolisina directa relacionada (TRH), la cual es una toxina con factores de adherencia y actividad citotóxica en el tejido y está relacionada a la toxina TDH, (Rosec *et al.*, 2009; Austin, 2010). La interacción de estas toxinas con el organismo humano da como resultado el desarrollo de una gastroenteritis aguda caracterizada por diarrea, dolor de cabeza, vómitos, náuseas, calambres abdominales y fiebre baja. Aun cuando la gastroenteritis causada por este microorganismo suele ser

autocontrolada, en ocasiones la infección puede causar septicemia y amenazar la vida de personas con enfermedades en hígado o bien personas inmunocomprometidas (Yi-Cheng y Chengchu, 2007; Thompson, 2006).

Esta bacteria, es considerada como un patógeno emergente en algunos países. Entre los países donde se han dado mayores incrementos en los casos asociados a *V. parahaemolyticus* se encuentran Japón, China, Nueva Zelanda, España, Estados Unidos de Norte América, Indonesia y Chile (Vongxay *et al.*, 2006; Rosec *et al.*, 2009). En México, el último reporte documentado debido a esta bacteria se presentó en el 2004 al sur del estado de Sinaloa, en el cual se afectaron más de 1,250 personas por el consumo de camarón semi-cocido o crudo (Cabanillas *et al.*, 2005; Cabanillas-Beltrán *et al.*, 2006). También existen casos no documentados de este patógeno que son reconocidos por la Secretaría de Salud en el estado de Sonora, los cuales fueron asociados al consumo de camarón durante el mes de septiembre del 2012 (Gutiérrez Ruelas, 2012; Sanchez, 2012; Rábago, 2012).

2.6 *Listeria monocytogenes*

El género *Listeria* está conformado por más de diez diferentes especies, siendo algunas de ellas las siguientes: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. ivanovii* y *L. grayi*, las cuales pueden ser distinguidas entre sí por sus fenotipos hemolíticos, sus habilidades para reducir nitratos y por sus capacidades en la fermentación de azúcares específicos (Groisman, 2001).

Listeria monocytogenes (Figura 4) es una bacteria Gram positiva en forma de bacilo, es psicrotrofica y halotolerante; crece a un rango de pH de 4.4 a 7.5 y a una actividad de agua de 0.92. Debido a su habilidad para desarrollarse en ambientes con o sin oxígeno, algunos autores la clasifican como aerobio y otros como anaerobio facultativo (Elliot y Elmer, 2007; Health, 2011). Otra importante característica de este microorganismo es su habilidad

para crecer en un amplio rango de temperaturas, que van desde los -0.4 hasta los 45 °C (Chasseignaux *et al.*, 2002). Esta última característica es una de las causas principales de que este patógeno reciba especial atención, pues su rango óptimo de crecimiento va desde la temperatura ambiente hasta las temperaturas normales de refrigeración que se manejan en una planta procesadora de pescados y mariscos. Esta bacteria, se ubica de manera general en el medio ambiente, por lo que la contaminación del alimento se puede dar principalmente por contaminantes como el agua y polvo (Elliot y Elmer, 2007). Por lo anterior, es muy común poder aislar este microorganismo del agua dulce y de las áreas costeras expuestas a la contaminación industrial y desechos de origen animal o humano. Los principales alimentos donde se reporta una mayor incidencia de esta bacteria son la col, el apio, tomate, lechuga, carnes, chorizo, salchichas de pavo, nuggets, salami, jamón, carnes en conserva, queso de cerdo, paté, leche, quesos frescos, quesos mal procesados y crema (Adams y Moss, 2004).

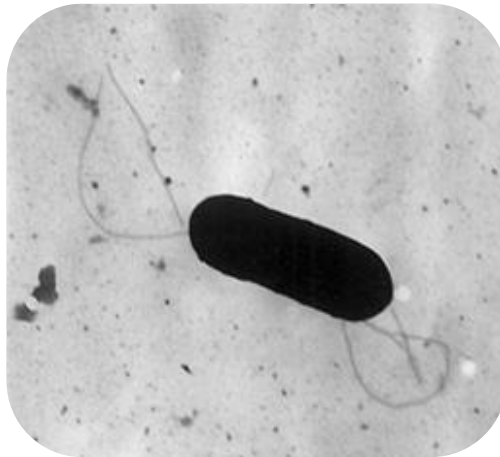


Figura 4: Micrografía electrónica de *L. monocytogenes* flagelada, amplificada 41250X (Greenemeier, 2008).

Tomando en cuenta las características antes mencionadas y ubicándolas en el contexto de las condiciones reales de la industria de alimentos, *Listeria monocytogenes* encuentra las condiciones idóneas de crecimiento en las diferentes áreas del proceso. Existen reportes del aislamiento de esta patógeno de pisos, drenajes y equipos dentro de las instalaciones, sobre todo en la

atmósfera fría y húmeda de las cámaras de refrigeración (Simpson *et al.*, 2010; Boonyawantang *et al.*, 2012; Carpentier y Cerf, 2011). Es por ello que debido a deficiencias de higiene y sanitización o a malas prácticas de manufactura, esta bacteria puede llegar a contaminar los alimentos durante su procesamiento y provocar listeriosis en las personas que los consuman, la cual está mayormente relacionado con los productos clasificados como listos para consumirse, de consumo crudo y de bajo cocimiento (FAO y OMS, 2004). La listeriosis es una enfermedad que se presenta cuando la bacteria entra en el hospedero a través del intestino, se adhiere a la superficie de la célula y penetra a ella mediante fagocitosis (López *et al.*, 2006). La dosis infectiva de esta bacteria para personas o grupos de riesgo (inmunocomprometidas, mujeres embarazadas, recién nacidos y adultos mayores) es de 1×10^2 UFC/mL; mientras que para personas en general es de 1×10^4 UFC/mL, situándose en una de las tasas de mortalidad más altas, con un 20 a 40% a nivel mundial durante los últimos 20 años (Cruz *et al.*, 2012; López *et al.*, 2006; FAO y OMS, 2004; Wan *et al.*, 2010).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Listeria monocytogenes* como riesgo asociado al proceso de camarón crudo congelado.

3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar una metodología basada en la combinación de las técnicas de Número más probable y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (NMP-PCR) para la identificación y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes*.
- Determinar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* y *Listeria monocytogenes* en las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado.
- Cuantificar *Vibrio parahaemolyticus* y *Listeria monocytogenes* en las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado.
- Determinar los puntos de control en las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas

El presente estudio utilizó cepas control ATCC (American Type Culture Collection) y cepas CAIM (Collection of Aquatic Important Microorganisms-<http://www.ciad.mx/caim/CAIM.html>). Se utilizaron cepas de *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) y de *Vibrio parahaemolyticus* (CAIM 320) como control positivo y de *Escherichia coli* (ATCC 95922) como control negativo. La cepa de *L. monocytogenes* fue inoculada en el medio comercial EB (Enrichement Broth, Difco) para *Listeria* e incubada a 35 °C por 48 horas y las dos últimas fueron reactivadas en medio APW (Agua Peptonada Alcalina: Peptona 10 g, NaCl 10g y 1,000 mL de agua destilada), e incubadas a 35 °C por 24 horas.

4.2 Estandarización de PCR

4.2.1. Solución de Trabajo

La solución de trabajo o templado utilizado para la estandarización de la identificación de *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes* consistió en células bacterianas completas, sin extracción previa del ADN, en base a la metodología reportada por Venkateswaran (1998). Para ello, se mezclaron 20 µL del inóculo de cada bacteria, con 50 µL de agua estéril.

4.2.2 Primers

Para la identificación de cada bacteria, se utilizaron los iniciadores o *primers* (Tabla 4) que han sido previamente reportados como específicos para la identificación de *V. parahaemolyticus*, *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

(Aznar y Alarcon, 2002; Bej *et al.*, 1999). Para la identificación de *Listeria* se utilizaron dos pares de *primers*; el primero que amplifica un fragmento de 702 pares de bases (pb) del gen *hlyA* asociado a listeriolisina O (LM1-702 y LM2-702), que es específico para *L. monocytogenes* y el segundo (LI1-938 y U1-938) que amplifica un fragmento de 938 pb del gen 16s, específico para *Listeria* spp. (Aznar y Alarcon, 2002).

Para la identificación de *V. parahaemolyticus* se utilizó un par de *primers* (Vptl-450F y Vptl-450R) que amplifican un segmento del gen de la hemolisina termolábil (*tl*) de 450 pb (Bej *et al.*, 1999).

Tabla 4. *Primers* utilizados para la identificación por PCR de *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes* y *Listeria* spp.

<i>Primer</i>	Especie	Secuencia	Tm	Gen amplificado	Referencia
Vptl 450F	<i>V. parahaemolyticus</i>	AAAGCGGATTATG CAGAAGCACTG	69 °C	<i>tl</i>	1
Vptl 450R	<i>V. parahaemolyticus</i>	GCTACTTTCTAGC ATTTTCTCTGC	61.4 °C	<i>tl</i>	1
LM1-702	<i>L. monocytogenes</i>	CCTAAGACG CCAATCGAA	61.4 °C	<i>hlyA</i>	2
LM2-702	<i>L. monocytogenes</i>	AAGCGCTTG CAACTGCTC	64.5 °C	<i>hlyA</i>	2
LI-938	<i>Listeria</i> spp.	CTCCATAAA GGTGACCCT	56.4 °C	16 S	2
U1-938	<i>Listeria</i> spp.	CAGCMGCCG CGGTAATWC	63 °C	16 S	2

tl: Hemolisina termolábil
1: Bej *et al.* 1999

hlyA: Listeriolisina
2: Aznar y Alarcon 2002

4.2.3 Condiciones de PCR

4.2.3.1 *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. Se utilizó un volumen de reacción de 50µL, compuesto por 10 µL de Buffer 5X (PROMEGA), 3.5 µL de MgCl₂ (PROMEGA), 1 µL de dNTP's (PROMEGA), 2U de Taq polimerasa (PROMEGA), 1 µL de los *primers* LM1-702--LM2-702 y LI1-938--U1-938 (PROMEGA), 10 µL de la solución de trabajo o templado y agua destilada estéril grado PCR para ajustar volumen. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador de DNA (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems), bajo condiciones de amplificación de un ciclo a 95°C por 10 min y 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 s, 50°C por 45 s y 72°C por 45 s, terminando con un ciclo de 72°C por 5 min.

4.2.3.2 *Vibrio parahaemolyticus*. Se realizó una mezcla de reacción de 50µL, la cual contenía 10 µL de buffer 5x (PROMEGA), 3.5 µL de MgCl₂ (PROMEGA), 1 µL de dNTP's (10mM) (PROMEGA), 1 µL de los *primers* Vptl-450F y Vptl-450R (PROMEGA), 2 U de Taq polimerasa (PROMEGA), 10 µL de la solución de trabajo o templado y agua destilada estéril grado PCR para ajustar volumen. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador de DNA (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems) bajo condiciones de amplificación de ciclo a 95°C por 10 min y 95°C por 2 min, seguido de 35 ciclos a 95°C por 45 s, 54°C por 45 s y 72°C por 35 s, concluyendo con un ciclo de 72°C por 5 min (León, 2012).

4.2.4 Visualización de Productos de PCR

La visualización de los productos amplificados por PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Sigma-Aldrich), preparado con Tris-HCl 1M-EDTA 0.5M (TE 1X) a pH8, adicionado con 10 µL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) como colorante para la visualización de las bandas. En cada pozo del gel se adicionaron 5 µL del producto amplificado por PCR con 2 µL de colorante azul de bromofenol 2X (Sigma), utilizando como

referencia un marcador molecular (1Kb plus DNA Ladder Invitrogen). Las condiciones de la electroforesis fueron de 30 minutos para el gel de 10x15 cm y de 90 minutos para el gel de 15x25 cm, ambos a 100V en buffer Tris-Borato-EDTA (TBE 1X). La visualización de las bandas características de *Listeria* spp., *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* se realizó utilizando un transluminador de luz UV (Ultra-Violet-Products, Modelo TFM-04), y la imagen se obtuvo con la cámara Kodak DC290 y el programa Kodak 1D (Imagen analysis software versión 3.5.2).

4.3 Límite de Detección de PCR

4.3.1 *Listeria* spp., *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* en Matriz de Buffer

Se inocularon 5 mL de solución salina (0.85% NaCl) con 1.5×10^8 UFC/mL (ajustados con nefelómetro) de *L. monocytogenes* o *V. parahaemolyticus* y a partir de este inóculo se prepararon diez diluciones seriadas (desde 1.5×10^5 a 0.00015 UFC/mL) en un buffer de fosfatos (PB), preparado con 1.25 mL de solución stock estéril (34 g K_2HPO_4 en 500 mL de agua destilada) y 1000 mL de agua destilada estéril para *L. monocytogenes* y en un buffer de fosfato salino (PBS) estéril (7.65 g de NaCl, 0.724 g de Na_2HPO_4 , 0.210 g de KH_2PO_4 y 1000 mL de agua destilada) para *V. parahaemolyticus*. Se inoculó un mL de cada dilución en tubos que contenían caldo EB (*L. monocytogenes*) o APW (*V. parahaemolyticus*), los cuales fueron incubados a 35°C por 24 horas para *V. parahaemolyticus* y durante 48 horas para *L. monocytogenes*. Después de la incubación se tomó una alícuota de 20µL de cada tubo (con o sin crecimiento aparente), la cual fue utilizada como templado o solución de trabajo, tal como se describe en el punto 4.2.1. Posteriormente se procedió a realizar la PCR bajo las condiciones detalladas en el punto 4.2.3. La detección a diferentes concentraciones de cada bacteria en buffer, se realizó por triplicado.

4.3.2 *L. monocytogenes* en Camarón

A partir del músculo de camarón fresco (25g) se preparó una dilución 1:10 en caldo EB (225 mL), la cual se homogenizó (homogenizador seward 400) y esterilizó a 121°C por 15 minutos. Posteriormente se inocularon 45 mL de este homogenizado con 5 mL de una solución control de *L. monocytogenes* (solución salina al 0.85% de NaCl a una concentración bacteriana de 1.5×10^8 UFC/mL). A partir del homogenizado inoculado, se prepararon 10 diluciones seriadas (desde 1.5×10^5 a 0.00015 UFC/mL) en PB, de las cuales se tomó un mL para inocular tubos que contenían 9 mL del homogenizado estéril preparado inicialmente con caldo EB y camarón. Los tubos inoculados fueron incubados a 35°C por 48 horas. Posteriormente se tomaron 20 µL del cultivo de cada dilución (con o sin crecimiento visible) para comprobar por PCR la presencia o ausencia de la bacteria, bajo las condiciones y características de reacción antes descritas y visualizadas mediante electroforesis. La determinación del límite de detección se realizó por triplicado.

4.3.3 *V. parahaemolyticus* en Camarón

El procedimiento para la determinación del límite de detección de *V. parahaemolyticus* en una matriz de camarón, fue similar al descrito anteriormente para *L. monocytogenes*, teniendo como variantes la utilización de APW y PBS en el lugar de EB y PB. Los tubos de APW fueron inoculados por triplicado con *V. parahaemolyticus* (desde 1.5×10^5 a 0.00015 UFC/mL) e incubados a 35°C por 24 horas.

4.4 Muestreo y Análisis de Muestras

Las muestras fueron colectadas en tres diferentes plantas procesadoras de camarón crudo congelado, ubicadas en Guaymas, Sonora, México (plantas 1 a 3). Las muestras de agua, superficie y camarón fueron colectadas en las

diferentes etapas del proceso operativo de cada planta (Tabla 5), durante los meses de septiembre a noviembre del 2012. Las muestras de agua fueron colectadas en bolsas estériles, las cuales fueron previamente identificadas con los datos de la muestra (SSA, 2002). Las muestras de superficie, fueron tomadas, en un área delimitada de 100 cm², la cual fue frotada tres veces en dirección opuesta con un hisopo de algodón, que inmediatamente fue colocado dentro de un frasco que contenía 100 mL de PB estéril para el caso de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, o PBS estéril para el caso de *V. parahaemolyticus* (Downes y Ito, 2001). Las muestras de camarón fueron colectadas directamente de la línea de proceso, utilizando guantes y bolsas estériles (SSA, 1994). Inmediatamente después del muestreo, todas las muestras fueron colocadas dentro de hieleras con geles refrigerantes para ser transportadas al laboratorio, donde fueron procesadas el mismo día. Durante cada muestreo, se siguió el mismo lote a lo largo del proceso de producción, desde la etapa de recepción hasta su almacenamiento como producto terminado (Figura 5).

Tabla 5. Tipo y cantidad de muestras colectadas en las diferentes áreas y etapas del proceso de camarón crudo congelado.

Etapa o área	<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>L. monocytogenes</i> y <i>Listeria</i> spp.		
	Producto	Agua	Superficie	Producto	Agua	Superficie
Recepción de producto						
Lavado						
Selección mecánica						
Selección manual						
Ductos en área de selección manual						
Segundo glaze						
Almacén(talla principal)						
Almacén (talla rezaga)						
Total de muestras	45	9	18	36	9	36

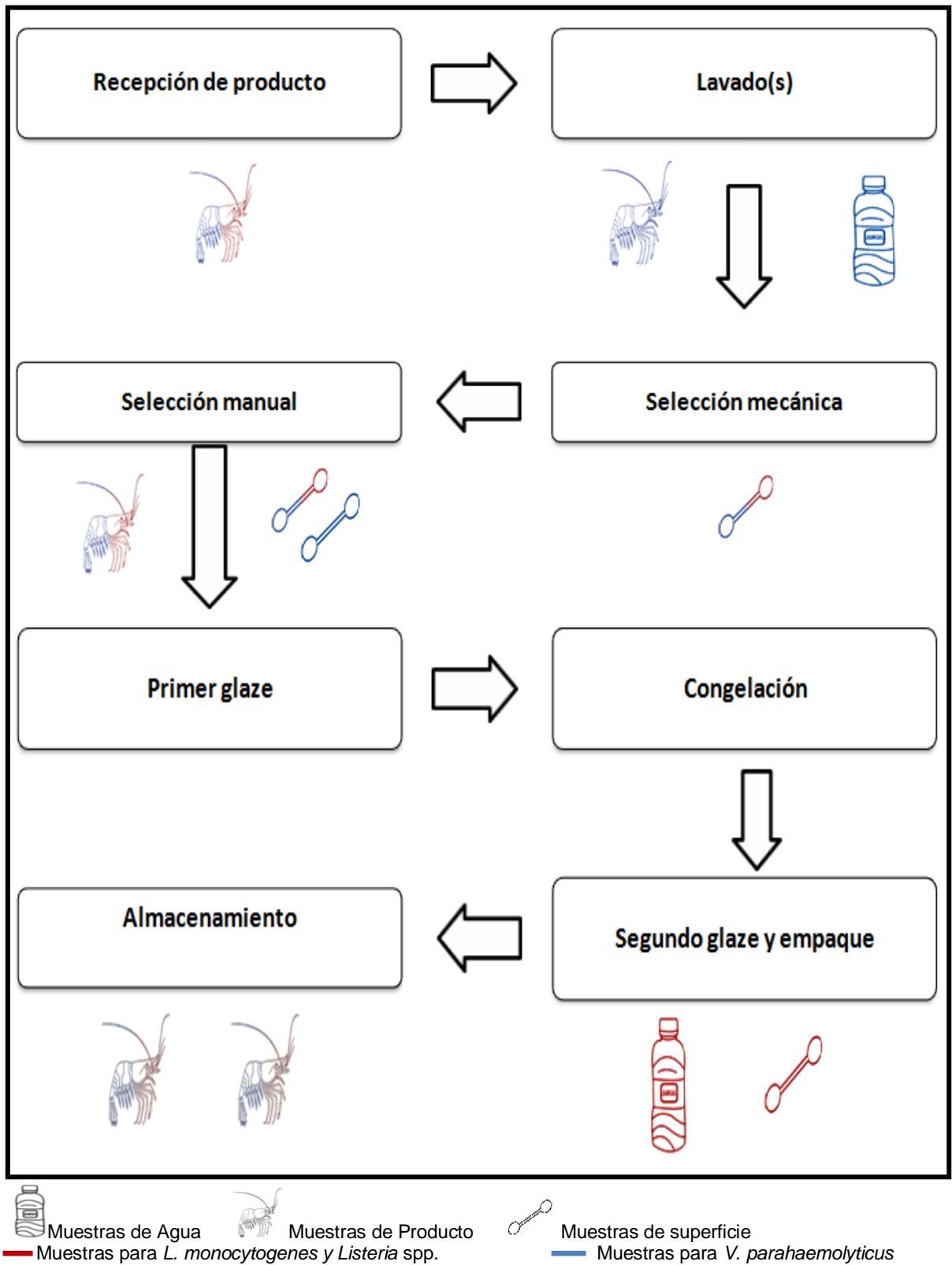


Figura 5: Puntos de muestreo y tipo de muestras tomadas durante el proceso de camarón crudo congelado.

4.4.1 Detección, Identificación y Cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes*

Primeramente se realizó un pre-enriquecimiento en base a lo descrito en el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA para cada patógeno (Kaysner y DePaola, 2004; Hitchins y Jinneman, 2011). La detección e identificación de *V. parahaemolyticus*, *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, en las muestras obtenidas de las diferentes etapas o áreas de proceso se realizó empleando la técnica de NMP-PCR previamente estandarizada (Punto 4.2). La cuantificación de cada bacteria fue realizada por técnicas moleculares (PCR), tal como se describe a continuación.

4.4.1.1 *V. parahaemolyticus*. Para la identificación y cuantificación de *V. parahaemolyticus* en las muestras de camarón, se realizó una mezcla de 25 g del músculo de camarón con 225 mL de APW, la cual posteriormente fue homogenizada a 100 rpm (Stomacher 400, Seward). Para las muestras de superficie y agua, se tomó un volumen de 25 mL de muestra y se mezcló perfectamente con 225 mL de APW mediante agitación manual. En total se prepararon seis diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-6}) en PBS, de las cuales se inocularon las series de tres tubos de APW, adicionando un mL de la dilución correspondiente a cada tubo, que posteriormente fueron incubados por 18-24 horas a 35°C (SSA, 1994; Kaysner y DePaola, 2004).

Una vez concluida la incubación, se consideraron para analizar por PCR todos los tubos que presentaron crecimiento visible, más la siguiente dilución sin crecimiento aparente. La identificación por PCR se realizó tomando una alícuota de cada tubo de acuerdo a la metodología anteriormente descrita (parte 4.2.1). La cuantificación se realizó basándose en las tablas de la técnica de NMP (Blodgett 2010), esto tomando como relación a los tubos positivos por PCR para este patógeno.

4.4.1.2 *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes*. Para la identificación y cuantificación de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en camarón, se homogenizaron a 100 rpm (Stomacher 400, Seward) 25 g del producto con 225 mL caldo de EB y para las muestras de superficies o agua se homogenizaron manualmente 25 mL de cada muestra con 225 mL de caldo EB. En total se prepararon seis diluciones en PB, de las cuales se transfirió un mL a cada serie de tres tubos con EB, que fueron posteriormente incubados por 48 horas a 35°C (SSA, 1994, 1995).

Una vez concluida la incubación, se seleccionaron las diluciones positivas y la primera serie con tres tubos negativos, para de cada tubo tomar una alícuota para la identificación por PCR de acuerdo a la metodología anteriormente descrita (parte 4.2.1). La cuantificación se realizó basándose en las tablas de la técnica de NMP (Blodgett 2010), esto tomando como relación a los tubos positivos por PCR para este patógeno.

4.5 Análisis de las Diferentes Etapas del Proceso y Determinación de los Posibles Puntos de Control

Se elaboró y documentó el diagrama de flujo para el proceso de producción de camarón crudo congelado en bloque de las plantas procesadoras, para lo cual se consideraron las diferentes variaciones encontradas en las tres plantas procesadoras que fueron muestreadas. En base a los resultados obtenidos durante el análisis de muestras (parte 4.4) se determinó si los niveles de cada bacteria alcanzaron o pudiesen alcanzar niveles inaceptables en alguna etapa del proceso de producción, tomando como referencia los límites máximos permisibles tanto nacionales como internacionales. Posterior a la determinación de los niveles de concentración de cada patógeno, en caso de proceder, se identificaron las condiciones que limitan o favorecen el crecimiento de cada una de estas bacterias en cada etapa del proceso, determinando así el o los posibles puntos de control.

4.6 Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el programa estadístico JMP 9.0.2 (2010 SAS Institute Inc), realizándose un análisis multivariante donde se consideraron como variables de respuesta el mes de muestreo, la planta procesadora muestreada, el origen de las muestras, la etapa del proceso muestreada, la concentración del patógeno en NMP/g y la concentración del patógeno en base logarítmica.

V. RESULTADOS

5.1 Estandarización de PCR

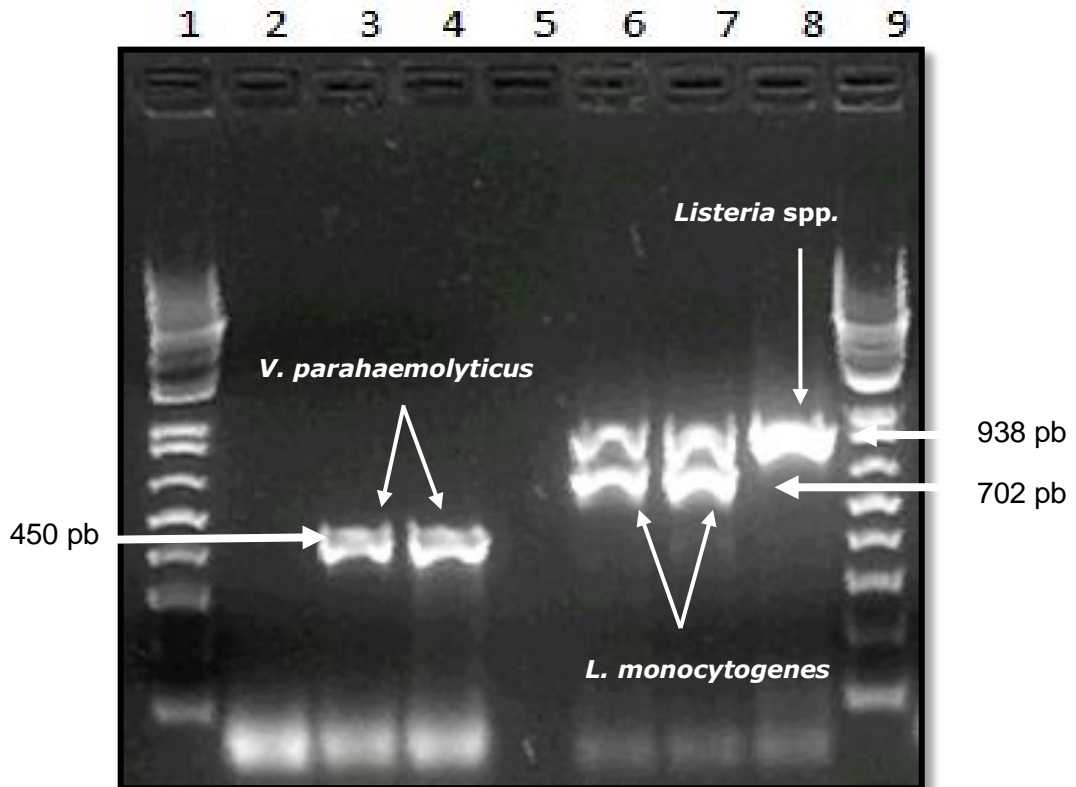
Se logró la estandarización de las condiciones de trabajo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo la solución de trabajo o templado, la mezcla de reacción, las condiciones de amplificación y su visualización por electroforesis. Los resultados obtenidos de esta estandarización se observan en la Figura 6, en la cual *V. parahaemolyticus* es visualizado a 450 pb (pozos 3 y 4), mientras que *Listeria monocytogenes* presenta una doble banda (pozos 6 y 7) que corresponde a los dos pares de *primers* utilizados, en donde la banda de 938 pb es característica de *Listeria* spp. (pozo 8) y la banda a 702 pb es específica para *L. monocytogenes* (pozo 6 y 7). Para que *L. monocytogenes* fuera considerada como positiva debió siempre presentar ambos pares de bandas.

5.2 Límite de Detección

5.2.1 *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* en Matriz de Buffer

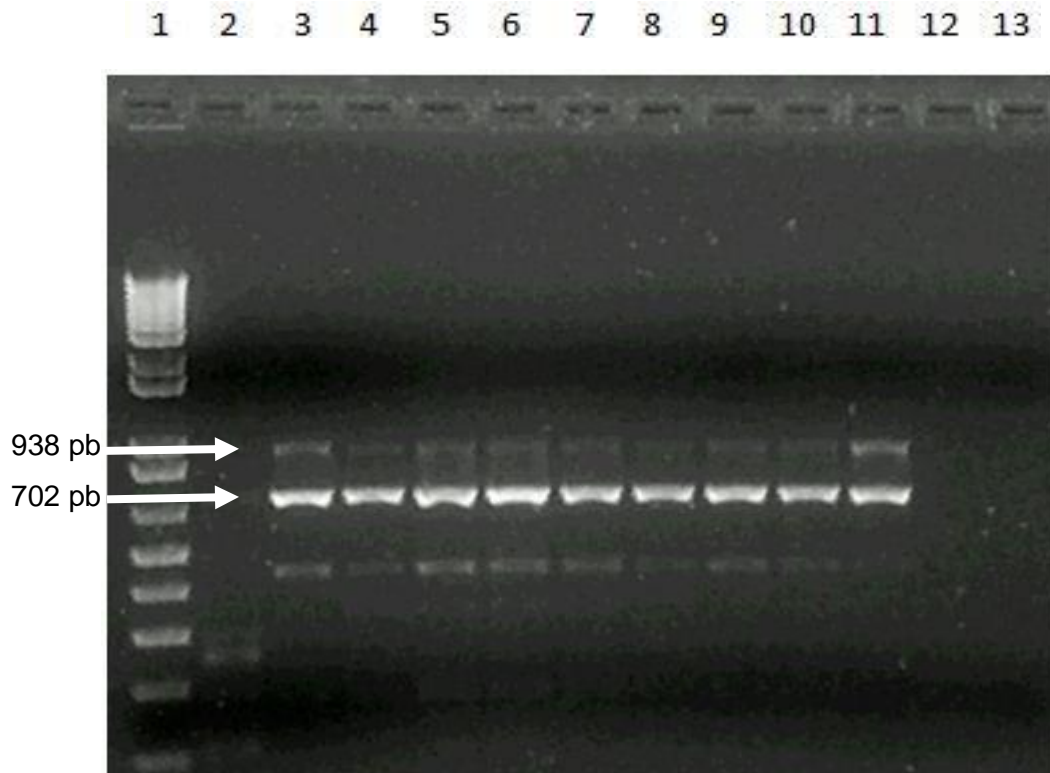
La metodología seguida para determinar el límite de detección utilizando la matriz de buffer, fue con la finalidad de simular las condiciones en que se iban a analizar las muestras de superficie y agua de proceso. Los resultados obtenidos para *L. monocytogenes* y *V. parahaemolyticus* se muestran en las Figuras 7 y 8 respectivamente, en las cuales se puede observar que para ambas bacterias se pudo detectar una concentración mínima de 0.015 UFC/ g, mL o cm².

Concentraciones menores no pudieron ser detectadas en ninguno de los triplicados que se realizaron, por lo que el límite de detección en PCR para una matriz de buffer fue establecido en 0.015 UFC/g, mL o cm²



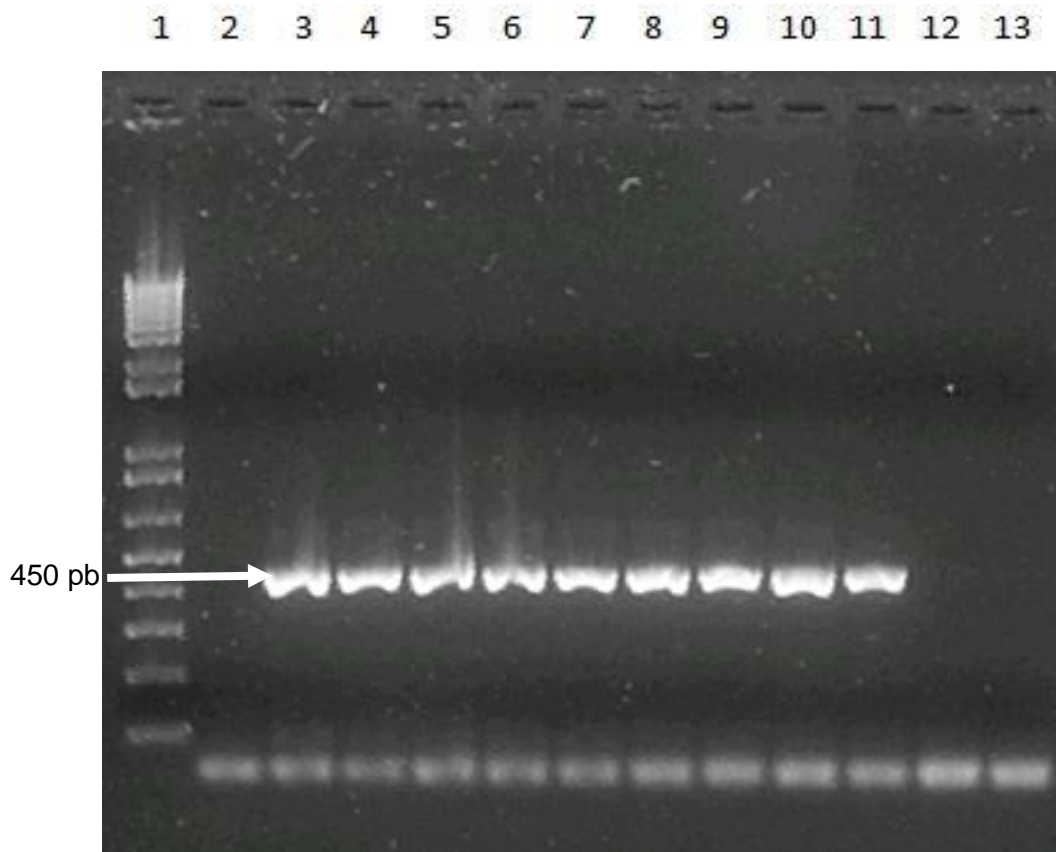
Los pozos (1 y 9) contienen un marcador (1Kb plus DNA Ladder Invitrogen); (2) *E. coli* (ATCC 95922) como control negativo; (3) *V. parahaemolyticus* (CAIM 320); (4) *V. parahaemolyticus* (identificado en camarón); (5) blanco; (6) *L. monocytogenes* (ATCC 7644); (7) *L. monocytogenes* (identificada de superficies); (8) *Listeria* spp. (identificada de superficies).

Figura 6: Visualización mediante electroforesis de la estandarización de PCR.



Pozo (1) marcador (1Kb plus DNA Ladder Invitrogen); (2) *E. coli* (ATCC 95922); (3) *L. monocytogenes* (ATCC 7644) control positivo; (4) *L. monocytogenes*: 1.5×10^5 UFC/mL; (5) *L. monocytogenes*: 1.5×10^4 UFC/mL; (6) *L. monocytogenes*: 1.5×10^3 UFC/mL; (7) *L. monocytogenes*: 1.5×10^2 UFC/mL; (8) *L. monocytogenes*: 1.5×10^1 UFC/mL; (9) *L. monocytogenes*: 1.5 UFC/mL; (10) *L. monocytogenes*: 1.5×10^{-1} UFC/mL; (11) *L. monocytogenes*: 1.5×10^{-2} UFC/mL; (12) *L. monocytogenes*: 1.5×10^{-3} UFC/mL; (13) *L. monocytogenes*: 1.5×10^{-4} UFC/mL.

Figura 7: Diluciones seriadas para *L. monocytogenes* en matriz de buffer.



Pozo (1) marcador (1Kb plus DNA Ladder Invitrogen); (2) *E. coli* (ATCC 95922); (3) *V. parahaemolyticus*(CAIM 320) control positivo; (4) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^5 UFC/mL; (5) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^4 UFC/mL; (6) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^3 UFC/mL; (7) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^2 UFC/mL; (8) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^1 UFC/mL; (9) *V. parahaemolyticus*: 1.5 UFC/mL; (10) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^{-1} UFC/mL; (11) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^{-2} UFC/mL; (12) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^{-3} UFC/mL; (13) *V. parahaemolyticus*: 1.5×10^{-4} UFC/mL.

Figura8: Diluciones seriadas para *V. parahaemolyticus* (CAIM 320) en matriz de buffer.

5.2.2 *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus* en Camarón

Los resultados obtenidos al determinar el límite de detección para ambas bacterias en musculo de camarón, se pueden observar en la Tabla 6, para *L. monocytogenes* y en la Tabla 7 para *V. parahaemolyticus*. En ambos casos, se logró detectar hasta una concentración de 0.015 UFC/mL.

Tabla 6: Límite detectado de *L. monocytogenes* en matriz de músculo de camarón.

Dilución	Concentración UFC/mL	Resultado (detección)		
-5	15	(+)	(+)	(+)
-6	1.5	(+)	(+)	(+)
-7	0.15	(+)	(+)	(+)
-8	0.015	(+)	(+)	(+)
-9	0.0015	(-)	(-)	(-)
-10	0.00015	(-)	(-)	(-)

UFC: Unidades formadoras de colonias

Tabla 7: Límite detectado de *V. parahaemolyticus* en matriz de músculo de camarón.

Dilución	Concentración UFC/ml	Resultado (detección)		
-5	15	(+)	(+)	(+)
-6	1.5	(+)	(+)	(+)
-7	0.15	(+)	(+)	(+)
-8	0.015	(+)	(+)	(+)
-9	0.0015	(-)	(-)	(-)
-10	0.00015	(-)	(-)	(-)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

5.3 Análisis de Muestras: Detección, Identificación y Cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes*

5.3.1 *V. parahaemolyticus*

La Figura 9 muestra los valores obtenidos de *V. parahaemolyticus*, en el músculo de camarón muestreado en las etapas de recepción (Recepción), producto en lavado (Lavado), producto en selección manual (Sel. manual) y producto terminado (marqueta) del proceso de congelado de camarón. Los resultados del producto terminado incluyen el producto de la talla principal y el producto de rezaga (con largos tiempos de espera durante el proceso), ya que no se detectó diferencia significativa en los valores del NMP/g encontrados en ambos productos.

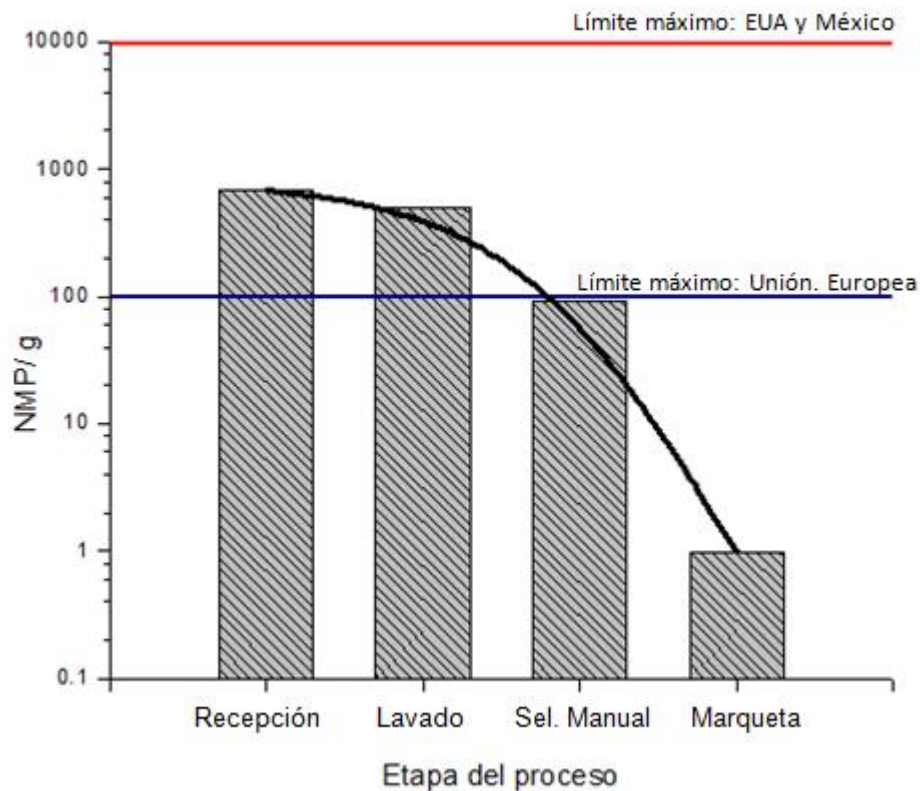


Figura 9: Niveles de concentración promedio de *V. parahaemolyticus*, en músculo de camarón en las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado.

Como puede observarse (Figura 9), los mayores niveles de *V. parahaemolyticus* se detectaron en el producto de recepción, los cuales disminuyeron conforme el producto avanzaba en la línea de proceso. El 80% de las muestras colectadas al momento de la recepción fueron positivas para esta bacteria, fluctuando entre 2.3 NMP/g y 4300 NMP/g. El producto obtenido en el área de lavado presentó valores promedio para *V. parahaemolyticus* de 489 NMP/g, con variaciones de 0.36 a 4600 NMP/g. Las muestras de producto en selección manual, disminuyeron hasta un valor promedio de 90.27 NMP/g, siendo positivas el 90% de las muestras tomadas con un valor máximo de 460 NMP/g. Para el producto terminado, los niveles encontrados de *V. parahaemolyticus* fueron mínimos (0.98 NMP/g).

En la Figura 10 pueden observarse los valores promedios obtenidos de *V. parahaemolyticus* por planta procesadora para las muestras de agua de lavado, superficie de selección mecánica y superficie de selección manual tomadas durante el proceso de camarón crudo congelado. Estos resultados presentan una disminución en la concentración de esta bacteria conforme avanzan las etapas del proceso, ya que las concentraciones mayores de *V. parahaemolyticus* se detectaron al inicio del proceso en el agua de lavado (119.8 NMP/g). En las muestras obtenidas de las superficies de selección mecánica y de selección manual, se detectó una concentración promedio de *V. parahaemolyticus* de 16.9 NMP/g y 0.7 NMP/g respectivamente.

La Figura 11, muestra los niveles de concentración encontrados de *V. parahaemolyticus* por mes de muestreo en el músculo de camarón a lo largo del proceso, donde puede observarse que las concentraciones mayores de *V. parahaemolyticus* en el producto se obtuvieron al momento de la recepción del inicio de la temporada camaronera (Septiembre).

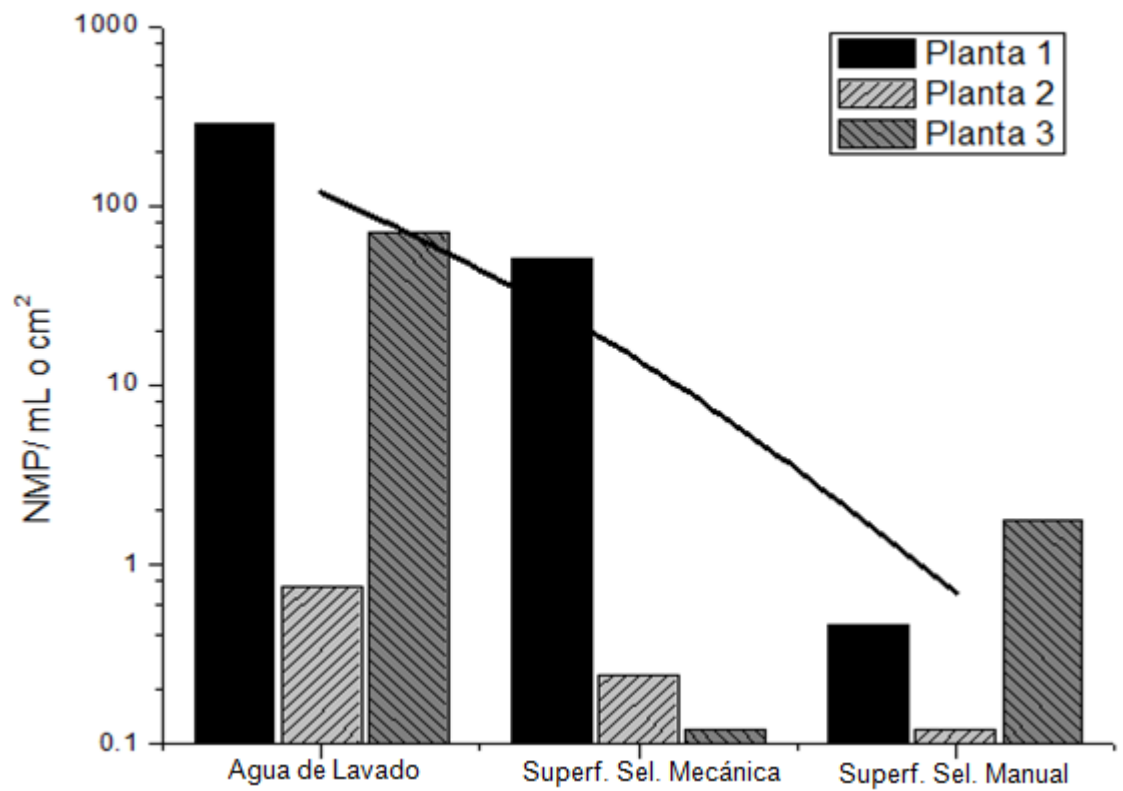


Figura 10: Nivel de concentración promedio de *V. parahaemolyticus* en agua y superficies de contacto por planta procesadora en las diferentes etapas del proceso del camarón crudo congelado.

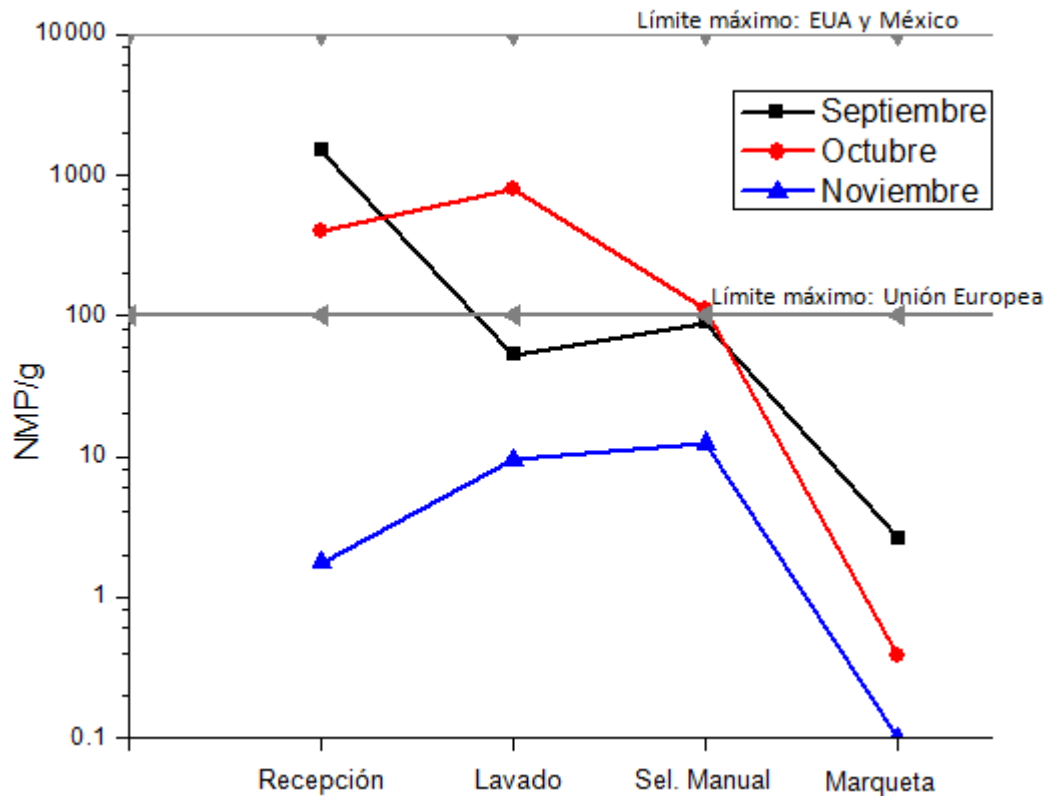


Figura 11: Niveles de *V. parahaemolyticus* en músculo de camarón obtenido durante el proceso de camarón crudo congelado a diferentes meses de muestreo.

Los resultados por mes de muestreo obtenidos para las muestras de agua de lavado y superficies de contacto directo, se observan en la Figura 12. En esta figura se puede observar que durante el mes de septiembre se obtuvo un comportamiento favorable, ya que la concentración de *V. parahaemolyticus* en las muestras fue disminuyendo a lo largo de las etapas del proceso. En los meses de Octubre y Noviembre, se presentaron pequeños incrementos en la concentración de este mismo patógeno entre las etapas de lavado y selección mecánica, los cuales disminuyeron durante la etapa de selección manual.

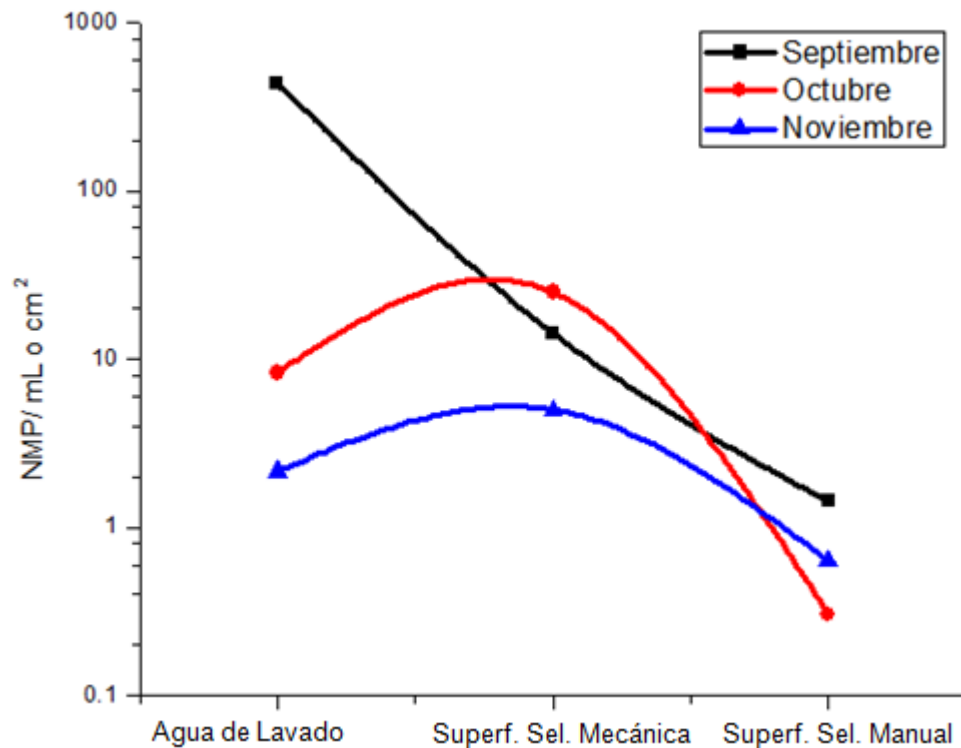


Figura 12: Niveles de *V. parahaemolyticus*, por mes de muestreo en agua y superficies de contacto directo a lo largo de las diferentes etapas el proceso del camarón crudo congelado.

Los niveles de *V. parahaemolyticus* en el músculo de camarón a lo largo de la línea de proceso, considerando el origen de la muestra (Acuicultura, Bahía, Barco), son presentados en la Figura 13. Estos resultados indican diferencias asociadas al origen de la muestra en el producto de recepción, en el cual se detectaron las concentraciones más altas de esta bacteria en el producto proveniente de bahía, con niveles muy superiores a los límites establecidos por la Unión Europea. En lo que se refiere a producto terminado (marquetas), todas las muestras de camarón, independientemente de su origen, presentaron bajas concentraciones de *V. parahaemolyticus*, muy por debajo de las especificaciones máximas establecidas para esta bacteria en EUA, México y la Unión Europea. Es importante resaltar, que los niveles encontrados de la bacteria en el músculo de camarón proveniente de acuicultura no pueden ser generalizados para este proceso, ya que fueron obtenidos de un solo muestreo y se desconoce su posible variación.

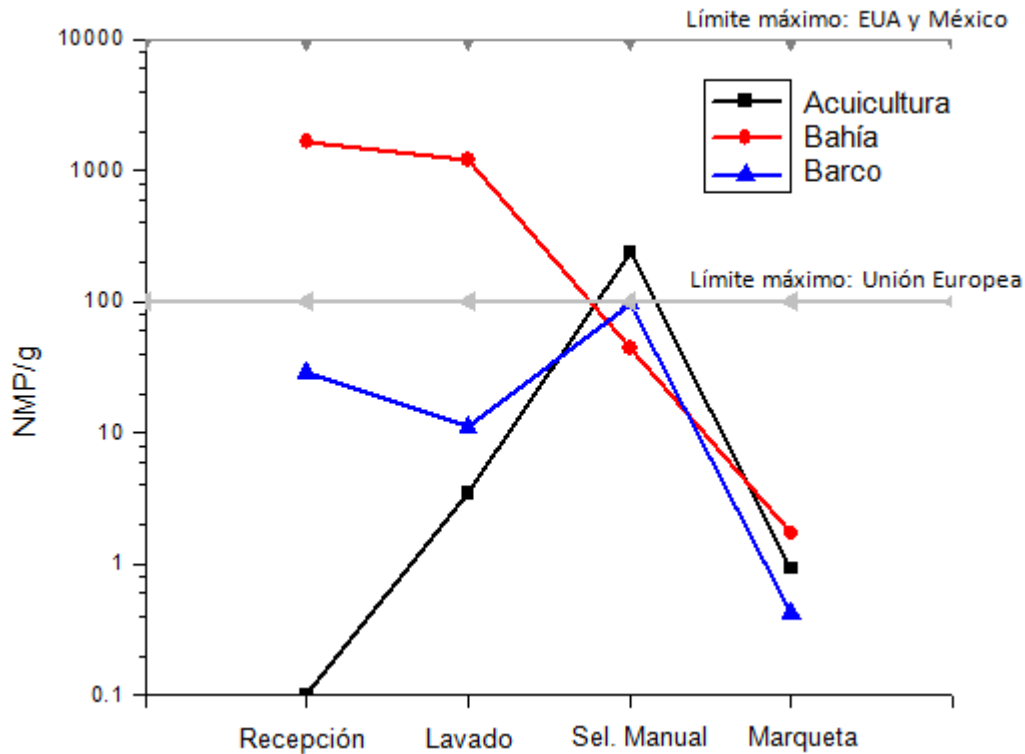


Figura 13: Niveles promedio de *V. parahaemolyticus* en músculo de camarón, por origen de muestra en las diferentes etapas del proceso del camarón crudo congelado.

Los niveles de *V. parahaemolyticus* en agua de proceso y superficies de contacto directo por origen del camarón se muestran en la Figura 14, en la cual puede observarse una disminución general de la concentración de este patógeno a través de cada etapa del proceso, donde los mayores niveles de concentración de la bacteria, se obtuvieron en el agua de lavado del producto de acuicultura.

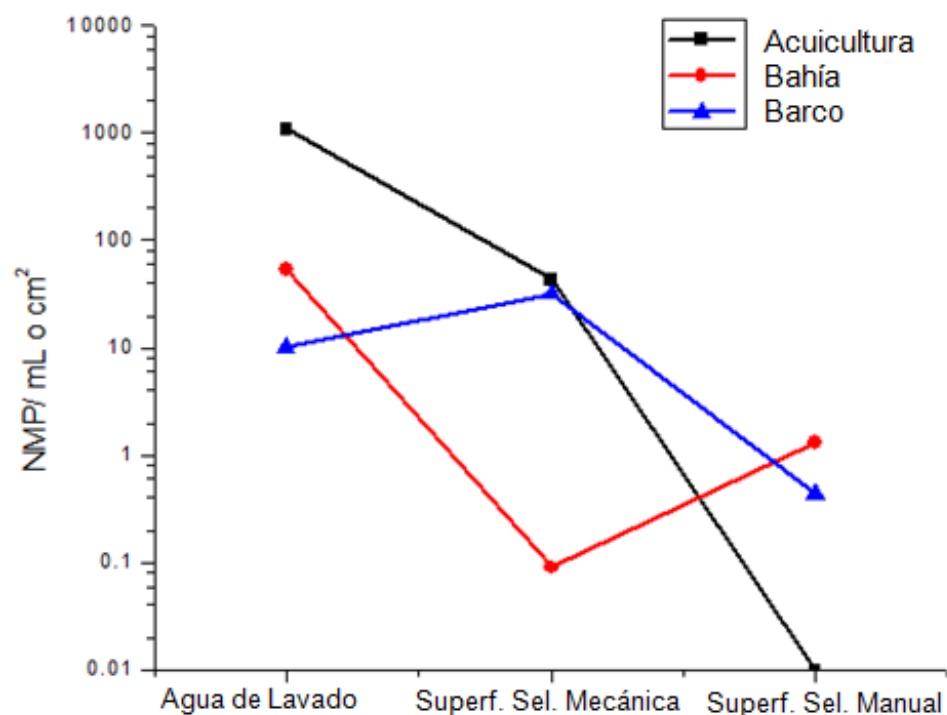


Figura 14: Niveles promedio de *V. parahaemolyticus* en aguas y superficies de contacto directo por origen de la muestra a lo largo de las diferentes etapas del proceso del camarón crudo congelado.

5.3.2 *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

Los niveles encontrados para *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* en el proceso de camarón crudo congelado por planta procesadora, se observan en las Tablas 8 y 9 respectivamente. Del total de 90 muestras, el 27.7 % fue positivo para *Listeria* spp. (Tabla 8) y solo el 12.2% fueron positivas para *L. monocytogenes* (Tabla 9). Los resultados indican que la planta 3 presentó el mayor porcentaje de muestras positivas, encontrándose mayor prevalencia de este patógeno en las superficie del área de selección manual, aun cuando la prevalencia de *Listeria* spp. y de *L. monocytogenes* (Tablas 10 y 11 respectivamente) a lo largo del proceso fue mínima. Además, debido a que la detección e identificación de *L. monocytogenes* fue muy variable en cada punto del proceso, no se encontró algún patrón de distribución en ninguna de las tres plantas muestreadas (Tablas 9 y 12).

Tabla 8: Resultados de *Listeria* spp. para las tres plantas procesadoras muestreadas.

Descripción de la muestra	<i>Listeria</i> spp.NMP/g, mL o cm ²									
	Planta 1				Planta 2			Planta 3		
	Mues 1	Mues 2	Mues 3	Mues 4	Mues1	Mues 2	Mues 3	Mues 1	Mues 2	Mues 3
Producto en recepción	---	0.36	---	---	---	0.9	---	---	---	---
Superficie de selección mecánica	---	---	---	---	---	0.3	---	---	0.3	---
Superficie de selección manual	0.62	---	---	---	0.61	0.3	---	0.3	0.94	0.3
Producto de selección manual	6.1	---	---	0.3	1.53	---	---	0.72	---	---
Superficie de ductos	---	---	---	---	---	0.94	---	---	---	0.62
Agua de 2do.glaze	---	---	---	---	---	---	---	---	---	0.3
Superficie de 2do.glaze	---	---	---	---	---	---	0.3	---	0.3	---
Producto terminado principal	---	---	---	---	0.3	0.3	---	0.62	---	0.62
Producto terminado rezaga	---	---	0.3	---	21	---	---	---	---	93

Mues: Muestreo --- No detectable

Tabla 9: Resultados de *Listeria monocytogenes* para las tres plantas procesadoras muestreadas.

Descripción de la muestra	<i>Listeria monocytogenes</i> NMP/g, mL o cm									
	Planta 1				Planta 2			Planta 3		
	Mues 1	Mues 2	Mues 3	Mues 4	Mues1	Mues 2	Mues 3	Mues 1	Mues 2	Mues 3
Producto en recepción	---	---	---	---	---	0.9	---	---	---	---
Superficie en selección mecánica	---	---	---	---	---	0.3	---	---	0.3	---
Superficie de selección manual	0.3	---	---	---	0.3	---	---	---	0.94	---
Producto en selección manual	---	---	---	0.3	---	---	---	---	---	---
Superficie de ductos	---	---	---	---	---	0.94	---	---	---	0.62
Agua de 2do.glaze	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Superficie de 2do.glaze	---	---	---	---	---	---	---	---	0.3	---
Producto Terminado Principal	---	---	---	---	---	---	---	0.3	---	---
Producto Terminado Rezaga	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Mues: Muestreo --- No detectable

Tabla 10: Prevalencia de *Listeria* spp. para las tres plantas procesadoras muestreadas.

	Total	Planta 1	Planta 2	Planta 3
Número de Muestras	90	36	27	27
Muestras positivas para <i>Listeria</i> spp.	26	5	10	11
Porcentaje de muestras positivas	28.9	13.9	37	40.7
Porcentaje de muestra positivas en producto de recepción	2.2	2.8	3.7	---
Porcentaje de muestra positivas en superficie de selección mecánica	2.2	---	3.7	3.7
Porcentaje de muestra positivas en superficie de selección manual	6.7	2.8	7.4	11.1
Porcentaje de muestra positivas en producto de selección manual	4.4	5.6	3.7	3.7
Porcentaje de muestra positivas en ductos	2.2	---	3.7	3.7
Porcentaje de muestra positivas en agua de 2do glaze	1.1	---	---	3.7
Porcentaje de muestra positivas en superficie de 2do glaze	2.2	---	3.7	3.7
Porcentaje de producto terminado "marqueta"	7.8	2.8	11.1	11.1

--- No detectado

Tabla 11: Prevalencia de *Listeria monocytogenes* para las tres plantas procesadoras muestreadas.

	Total	Planta 1	Planta 2	Planta 3
Número de Muestras	90	36	27	27
Muestras positivas para <i>L. monocytogenes</i>	11	2	4	5
Porcentaje de muestras positivas	12.2	5.6	14.8	18.5
Porcentaje de muestra positivas en producto de recepción	1.1	---	3.7	---
Porcentaje de muestra positivas en superficie de selección mecánica	2.2	---	3.7	3.7
Porcentaje de muestra positivas en superficie de selección manual	3.3	2.8	3.7	3.7
Porcentaje de muestra positivas en producto de selección manual	1.1	2.8	---	---
Porcentaje de muestra positivas en ductos	2.2	---	3.7	3.7
Porcentaje de muestra positivas en agua de 2do glaze	0.0	---	---	---
Porcentaje de muestra positivas en superficie de 2do glaze	1.1	---	---	3.7
Porcentaje de producto terminado “marqueta”	1.1	---	---	3.7

--- No detectado

Tabla 12: Muestras positivas para *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* agrupadas por tipo de muestra

Tipo de muestra	Total muestras	<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>	
		Positivas	Porcentaje	Positivas	Porcentaje
Camarón	40	13	32.5	3	7.5
Superficies	40	12	30	8	20
Agua	10	1	10	0	0

5.4 Análisis de las Diferentes Etapas del Proceso y Determinación de los Posibles Puntos o Medidas de Control

El diagrama de flujo elaborado para la determinación de los posibles puntos o medidas de control, se observa en la Figura 15. Considerando este diagrama de flujo y los resultados obtenidos por muestra (sección 5.3.1), se elaboró el Anexo 1, en el cual se detalla la descripción del proceso de camarón crudo congelado considerando para las tres plantas procesadoras incluidas en este estudio.

5.4.1 *V. parahaemolyticus*

En el Anexo 1, se observa que en la etapa de recepción (principalmente para el camarón de bahía) es donde se pueden sobrepasar los límites permitidos de *V. parahaemolyticus* por la normatividad internacional, más no los criterios establecidos por la Secretaría de Salud. Es en esta etapa, donde se puede distinguir el origen del producto y donde se pueden tomar las medidas necesarias para controlar la entrada de producto con altos niveles de esta bacteria.

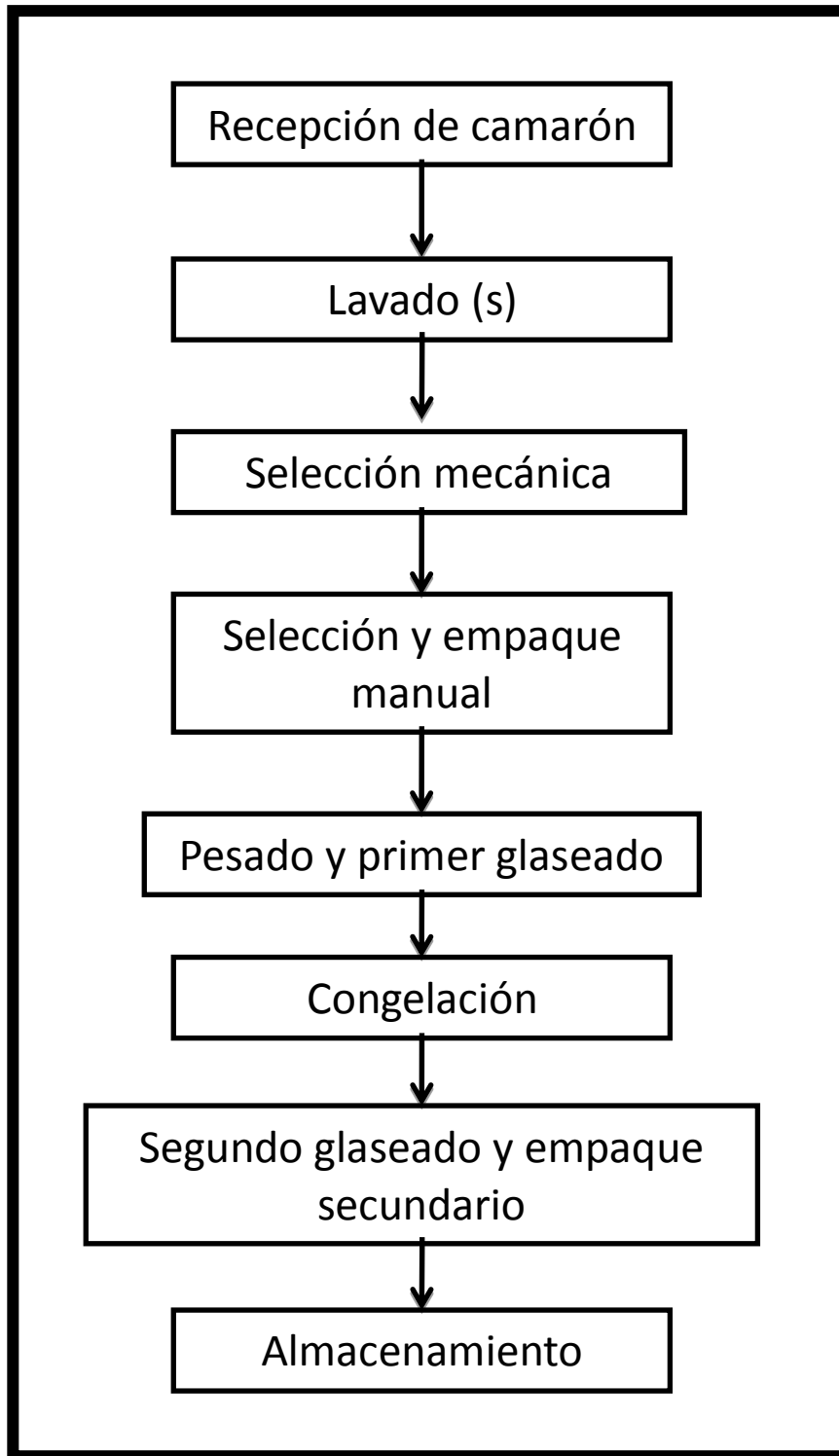


Figura 15: Diagrama de flujo del proceso de producción del camarón crudo congelado

5.4.2 *L. monocytogenes*

En base a los niveles de concentración de *L. monocytogenes* encontrados a lo largo del proceso de camarón crudo congelado, el diagrama de flujo (Figura 15), la descripción del proceso (Parte 2.3 y Anexo 1) y los resultados obtenidos por muestra (Parte 5.3.2), se determinó que esta bacteria tuvo una prevalencia muy baja durante el procesamiento del camarón crudo congelado, presentando un riesgo muy bajo en este tipo de producto. Debido a lo anterior, no se determinó ningún punto de control para este patógeno.

5.5 Análisis Estadístico

5.5.1 *V. parahaemolyticus*

Los resultados obtenidos para *V. parahaemolyticus* considerando el mes de muestreo, la planta procesadora muestreada, el origen de la muestra, la etapa del proceso muestreada, la concentración del patógeno (NMP/g, mL o cm²) y el logaritmo de la concentración del patógeno (Log NMP/g, mL o cm²), se muestran en las Tablas 13 y 14. La Tabla 13 muestra los coeficientes de correlación (alfa = 0.05), mientras que la Tabla 14, nos indica las correlaciones significativas (p=0.05). Como se puede observar, correlacionan significativamente el origen de la muestra y el mes de muestreo; el origen de la muestra con la planta procesadora; la etapa de proceso y *V. parahaemolyticus* (NMP/g, mL o cm²); así como el mes de muestreo con el logaritmo de *V. parahaemolyticus* (Log NMP/g, mL o cm²).

5.5.2 *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

Los resultados obtenidos para *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* de la prueba de multivariante considerando como variables de respuesta a mes de muestreo, planta procesadora muestreada, origen de la muestra, etapa del proceso donde fueron tomadas las muestras, concentración del *Listeria* spp. (NMP/g o mL) y la concentración del *L. monocytogenes* (Log NMP/g o mL) se muestran en las Tablas 15 y 16. Como puede observarse no se detectó ninguna correlación entre las variables consideradas.

Tabla 13: Coeficientes de correlación ($\alpha = 0.05$) para cada par de variables de respuesta consideradas.

Variables	Mes de Muestreo	Planta Procesadora	Origen de la Muestra	Etapas de Proceso	V. <i>parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Log V. <i>parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)
Mes de Muestreo	1.0000	-0.1892	0.7322	-0.0000	-0.1165	-0.2552
Planta Procesadora	-0.1892	1.0000	-0.2904	-0.0000	0.1385	0.0431
Origen de la Muestra	0.7322	-0.2904	1.0000	-0.0000	-0.1581	-0.1912
Etapas de Proceso	-0.0000	-0.0000	-0.0000	1.0000	-0.2205	-0.4040
V. <i>parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	-0.1165	0.1385	-0.1581	-0.2205	1.0000	0.5152
Log V. <i>parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	-0.2552	0.0431	-0.1912	-0.4040	0.5152	1.0000

Tabla 14: Nivel de significancia estadística para las correlaciones entre variables (*V. parahaemolyticus*).

Variable	Variable	Coefficiente de Correlación	Significancia estadística
Planta Procesadora	Mes de Muestreo	-0.1892	0.0928
Origen de la Muestra	Mes de Muestreo	0.7322	<0.001*
Origen de la Muestra	Planta Procesadora	-0.2904	0.0090*
Etapa de Proceso	Mes de Muestreo	-0.0000	1.0000
Etapa de Proceso	Planta Procesadora	0.0000	1.0000
Etapa de Proceso	Origen de la Muestra	0.0000	1.0000
<i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Mes de Muestreo	-0.1165	0.3035
<i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Planta Procesadora	0.1385	0.2205
<i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Origen de la Muestra	-0.1581	0.1614
<i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Etapa de Proceso	-0.2205	0.0494*
Log <i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Mes de Muestreo	-0.2552	0.0223*
Log <i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Planta Procesadora	0.0431	0.7040
Log <i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Origen de la Muestra	-0.1912	0.0893
Log <i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Etapa de Proceso	-0.4040	0.0002*
Log <i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	<i>V. parahaemolyticus</i> (NMP/g, mL o cm ²)	0.5152	<.0001*

* Par de variables de respuesta que correlacionan significativamente (alfa = 0.05).

Tabla 15: Coeficientes de correlación ($\alpha = 0.05$) para cada par de variables de respuesta consideradas (*Listeria* spp. y *L. monocytogenes*).

Variables	Mes de Muestreo	Planta Procesadora	Origen de la Muestra	Etapa del Proceso	<i>Listeria</i> spp. (NMP/g, mL o cm ²)	<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)
Mes de Muestreo	1.0000	-0.1892	0.7322	-0.0000	-0.0278	-0.0041
Planta Procesadora	-0.1892	1.0000	-0.2904	-0.0000	0.1397	0.1694
Origen de la Muestra	0.7322	-0.2904	1.0000	-0.0000	-0.0923	-0.0051
Etapa de Proceso	-0.0000	-0.0000	-0.0000	1.0000	0.1767	-0.1547
<i>Listeria</i> spp. (NMP/g, mL o cm ²)	-0.0278	0.1397	-0.0923	0.1767	1.0000	-0.0259
<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)	-0.0041	0.1694	-0.0051	-0.1547	-0.0259	1.0000

Tabla 16: Nivel de significancia estadística para las correlaciones entre variables (*Listeria* spp. y *L. monocytogenes*)

Variable	Variable	Correlación	Significancia
Planta Procesadora	Mes de Muestreo	-0.1892	0.0741
Origen de la Muestra	Mes de Muestreo	0.7322	<0.001*
Origen de la Muestra	Planta Procesadora	-0.2904	0.0055*
Etapa de Proceso	Mes de Muestreo	-0.0000	1.0000
Etapa de Proceso	Planta Procesadora	0.0000	1.0000
Etapa de Proceso	Origen de la Muestra	0.0000	1.0000
<i>Listeria</i> spp. (NMP/g, mL o cm ² L)	Mes de Muestreo	-0.0278	0.7949
<i>Listeria</i> spp.(NMP/g, mL o cm ²)	Planta Procesadora	0.1397	0.1892
<i>Listeria</i> spp. (NMP/g, mL o cm ²)	Origen de la Muestra	-0.0923	0.3872
<i>Listeria</i> spp. (NMP/g, mL o cm ²)	Etapa de Proceso	0.1767	0.0957
<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Etapa de Proceso	-0.0041	0.9691
<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Planta Procesadora	0.1694	0.1106
<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Origen de la Muestra	-0.0051	0.9622
<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)	Etapa de Proceso	-0.1547	0.1454
<i>L. monocytogenes</i> (NMP/g, mL o cm ²)	<i>Listeria</i> spp. (NMP/g, mL o cm ²)	-0.0259	0.8087

*Par de variables de respuesta que correlacionan significativamente (alfa = 0.05).

VI. DISCUSION

6.1 Límite de Detección

El límite de detección (LD) de una reacción de PCR se puede ver influenciado por diferentes factores como lo son la naturaleza de la muestra (matriz), método de extracción de material genético, composición de la mezcla de reacción, condiciones de la amplificación, etc. En este trabajo, se utilizaron músculo de camarón y buffer como matrices, la primera asemejando las muestras de producto y la segunda asemejando las muestras de agua y superficie. En ambas matrices se encontró un mismo límite de detección para *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes*, lo cual es un indicativo de que la matriz de camarón no interfiere o afecta la detección, identificación y cuantificación de estas dos bacterias.

Estudios realizados (Espíñeira *et al.*, 2010; Vongxay *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2012) reportan que los valores mínimos detectados para *V. parahaemolyticus* por técnicas moleculares (PCR punto final) en diferentes matrices varían entre 1 y 2.5 UFC/mL, mientras que para *L. monocytogenes* varía entre 1 y 3 UFC/mL (Zhou y Jiao, 2005; Barocci *et al.*, 2008; Kaclicková *et al.*, 2003). El límite de detección que se encontró para la técnica propuesta de NMP-PCR utilizado en este estudio, tanto para *V. parahaemolyticus* como *L. monocytogenes* en los dos tipos de matrices fue de 0.015 UFC/mL, por lo que la combinación de técnicas moleculares con técnicas dependientes de cultivo permite determinar cantidades mucho más bajas de bacterias viables en las diferentes muestras tomadas. Esto es importante desde el punto de vista de la

inocuidad alimentaria, donde la detección de bacterias no viables por métodos moleculares no necesariamente pone en riesgo la salud del consumidor.

Por otro lado, una de las grandes ventajas de la técnica propuesta, es que al combinar técnicas dependientes de cultivo y moleculares, se pueden optimizar recursos y tiempo para la determinación y cuantificación de dichos patógeno. En la tabla 17 se muestra el comparativo entre costos (considerando solo reactivos y consumibles) y tiempos estimados para la determinación y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes* por técnicas tradicionales y por la técnica NMP-PCR propuesta. Lo anterior fue determinado en base a las técnicas establecidas en las normas de la Secretaria de Salud y en el Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (Kaysner y DePaola, 2004; SSA, 1995).

Tabla 17: Comparativo de costos entre técnicas.

	<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>L. monocytogenes</i>		
	Presencia/ Ausencia	Técnica NMP	NMP- PCR	Presencia/ Ausencia	Técnica NMP	NMP- PCR
Costo (Dlts.)	35.24	121.81	43.46	67.95	N.D	45.65
Tiempo estimado*	6	6	1.12	12	N.D	2.12

* Tiempo estimado en días N.D: No determinado

6.2 Análisis de Muestras: Detección, Identificación y Cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes*

6.2.1 *V. parahaemolyticus*

Las concentraciones promedio de *V. parahaemolyticus*, tanto en músculo de camarón como en las superficies de contacto directo, disminuyeron a lo largo de las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado (Figura 9 y Figura 10 respectivamente). Las áreas sucias (observación visual) asociadas a la recepción del producto fueron las que presentaron los niveles más altos (recepción y agua de lavado) de esta bacteria, lográndose una disminución promedio de 2.84 Log en el producto final. Situación que no es extraña, ya que *V. parahaemolyticus* se encuentra de manera natural en el medio ambiente marino (Yi-Cheng y Chengchu, 2007). Por otro lado, se ha reportado que esta bacteria tiene afinidad por la quitina de la cáscara de camarón (Zamora *et al.*, 2005), la cual le ofrece un efecto crio-protector al igual que algunos aminoácidos y péptidos, lo que explica la supervivencia de especies del género *Vibrio* por tiempos prolongados en el ambiente y en los productos refrigerados y congelados (Amako *et al.*, 1987).

Específicamente en las superficies de contacto directo, se observó una diferencia en los niveles de *V. parahaemolyticus* detectados en las diferentes etapas del proceso de cada planta procesadora (Figura 10), observándose en la planta 2 los niveles más bajos de esta bacteria en todas las etapas de proceso, mientras que en la planta 1 se detectaron las concentraciones más altas. Lo anterior puede atribuirse a la implementación de las buenas prácticas de manufactura, higiene y desinfección de cada planta, así como al grado de cumplimiento de los procedimientos estándar de operación sanitaria (POES); especialmente lo relacionado con el recambio de agua y uso de cloro en las tinajas de recepción del producto y en la limpieza y desinfección de las superficies de contacto de las áreas de selección mecánica y manual. El recambio del agua de lavado, así como los niveles de cloro utilizados son

importantes para disminuir la carga bacteriana inicial, mientras que una deficiente limpieza de las superficies de contacto propicia la re-contaminación del producto en cada una de las etapas, ya que la formación de bio-películas es una de las características de *V. parahaemolyticus* (Broberg *et al.*, 2011; Srey *et al.*, 2013).

La disminución de los niveles promedio de *V. parahaemolyticus* en el músculo de camarón a lo largo del proceso se presenta principalmente después de la congelación, disminuyendo en promedio 2 log entre la etapa de selección/empaque manual y el producto congelado. Resultados similares han sido reportados por Vanderzant y Nickelson (1972), quienes encontraron que los niveles de *V. parahaemolyticus* en el músculo de camarón disminuyeron de 1 a 2 ciclos log durante su almacenamiento en refrigeración o congelación, con una rápida reducción durante los dos primeros días de almacenamiento en congelación.

El producto final cumple con las especificaciones nacionales e internacionales establecidas para *V. parahaemolyticus*, ya que los niveles encontrados de esta bacteria en el producto congelado variaron desde no detectado hasta 9.3 NMP/g. A pesar de los niveles tan bajos de *V. parahaemolyticus* encontrados en el producto final, esta bacteria fue detectada en el 50% de las muestras analizadas, situación que coincide con estudios anteriores, donde el 60% de las muestras de camarón congelado en bloque proveniente de México contenían esta bacteria (Berry, 1992). Esta alta proporción de muestras positivas puede deberse a la protección que ejerce la quitina sobre las especies del género *Vibrio* (Berry, 1992). Se ha demostrado que *V. parahaemolyticus* puede sobrevivir en homogenizados de camarón congelado y camarón entero por 8 días (Vanderzant y Nickelson, 1972). Además, Ray y colaboradores (1978) demostraron que más del 90 % de las células de *V. parahaemolyticus* presentes en homogenizados de músculo de camarón, son dañadas si se almacenan en congelación por 14 días, pero

pueden recuperarse en corto tiempo (2-10 horas) cuando las condiciones le son favorables.

El mes en que se realizaron los muestreos influyó en la concentración encontrada de *V. parahaemolyticus* durante el proceso del camarón congelado en bloque, ya que se observaron diferencias entre las concentraciones de *V. parahaemolyticus* detectadas en el músculo de camarón con las encontradas en agua y superficies de contacto directo (Figuras 11 y 12) durante los diferentes meses de muestreo. Los valores más altos se observaron durante el mes de septiembre, principalmente al inicio del proceso (producto en recepción y agua de lavado), los cuales disminuyeron para los meses de octubre y noviembre (Figuras 11 y 12). Se ha reportado, que a altas temperaturas se favorece el desarrollo y crecimiento de *V. parahaemolyticus* (Parveen, *et al.*, 2008), lo cual puede estar relacionado con estos resultados, ya que las temperaturas del agua de mar alcanzaron los 30.4 °C durante el mes de septiembre, mientras que para octubre y noviembre las temperaturas promedio disminuyeron a 27 y 22.2 °C respectivamente (CICESE, 2011). Esta diferencia en los niveles de *V. parahaemolyticus* al inicio del proceso, afectó los niveles encontrados en las primeras etapas, los cuales fueron disminuyendo a lo largo del proceso de producción.

Los niveles de *V. parahaemolyticus* en camarón variaron significativamente dependiendo del origen de la muestra. Los valores más altos fueron detectados en el producto proveniente de bahía, seguidos del producto de embarcaciones y acuicultura respectivamente (Figura 13). Estos resultados pueden deberse a las diferentes condiciones de extracción del producto y al tiempo que transcurre antes de su adecuado enfriamiento. El producto de bahía se captura en pangas, donde el uso de hielo es muy variable y deficiente; las embarcaciones mayores capturan el crustáceo y lo mantienen en cubierta a temperatura ambiente durante el tiempo que tardan en separarlo, descabezarlo y lavarlo antes de ser congelado en salmuera; mientras que el producto de acuicultura recibe un choque térmico al ser introducido vivo en estanques con

agua y hielo, a temperaturas cercanas a los 0°C. Estudios previos realizados en camarón congelado en bloque proveniente de diferentes países, han asociado la incidencia de *Vibrio* spp. incluyendo *V. parahaemolyticus*, con el tiempo que pasa desde que el producto es cosechado, hasta que es enfriado adecuadamente (Berry, 1992).

El producto de acuicultura y embarcaciones mayores incrementa los niveles de *V. parahaemolyticus* conforme se avanza en el proceso y son disminuidos por efecto de la congelación (Figura 13), tendencia que se observa también en las etapas del proceso (Figura 14). Las concentraciones más altas de *V. parahaemolyticus* se obtienen en el producto de selección manual; mientras que en el agua de lavado se obtienen los valores máximos para el producto de acuicultura (Figura 14), lo cual puede deberse a la recuperación de las células dañadas una vez que las condiciones no le son tan adversas (Ray *et al.*, 1978). Esta situación fue más notoria en el producto de acuicultura, ya que no se detectó *V. parahaemolyticus* en el músculo de camarón obtenido en la etapa de recepción, lo que hace suponer que esta bacteria se encontraba en el exosqueleto o cáscara del camarón y fue así como entró a las plantas procesadoras. Aunque es importante señalar, que no se tienen suficientes repeticiones analíticas del camarón de acuicultura para soportar estadísticamente lo anterior, por lo que sería importante corroborar en futuros estudios, el efecto de la cosecha sobre los niveles de *V. parahaemolyticus*.

Como se mencionó anteriormente, es el punto de recepción donde el músculo de camarón presenta los niveles más altos de *V. parahaemolyticus*, niveles que se ven influenciados por el origen de la muestra y por el mes de muestreo. Durante el mes de septiembre se puede encontrar producto de bahía, barco y acuicultura, y es en este mes cuando se observan los valores más altos de esta bacteria en el producto de bahía (Figuras 11 y 13), por lo que es conveniente que las plantas procesadoras tengan mayor control sobre las BPM en las primeras etapas del proceso, principalmente con el producto proveniente de bahía.

6.2.2 *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*

La presencia de *L. monocytogenes* en el proceso de camarón crudo congelado no fue constante (Tabla 9). A pesar de encontrarse un 28.9% de muestras positivas de *Listeria* spp. (Tabla 10) y 12.2% de *L. monocytogenes* positivas (Tabla 11) a lo largo del proceso, no se encontró ningún patrón o nicho específico que indicara la posible contaminación. Además, no se pudo detectar ninguna frecuencia o correlación con respecto a la planta procesadora, la época del año, la etapa de proceso, el origen del producto o los niveles de concentración de estas dos bacterias (Tabla 15). La Tabla 12 indica que las muestras provenientes de las superficies de contacto, fueron las que presentaron un mayor porcentaje de muestras positivas de *L. monocytogenes* (20%), seguidas de las muestras de camarón (7.5%), ya que en las muestras de agua no fue detectada. Esta bacteria es ubicua del medio ambiente (Churchill *et al.*, 2006) y se ha asociado a ambientes de proceso, especialmente en lugares húmedos y fríos (Carpentier y Cerf, 2011). Otra característica de esta bacteria es que puede formar bio-películas (Belessi *et al.*, 2011), aunque se ha reportado que se encuentra en bajas cantidades cuando está en presencia de otras bacterias, posiblemente por la competencia de nutrientes (Carpentier y Cerf, 2011). Lo anterior, podría explicar que el mayor porcentaje de muestras positivas se diera en superficies de contacto, ya que pueden ser limpiadas y sanitizadas regularmente, eliminando así la competencia por efecto de otras bacterias.

Los niveles de *L. monocytogenes* fueron bajos a lo largo del proceso (< 1 NMP/g o mL) (Tabla 9), con una de las muestras positivas del producto terminado, lo que representa el 5% de las muestras de camarón congelado. La presencia de esta bacteria en camarón congelado es muy variable, reportándose valores similares a los de este estudio (6.7%) en camarón congelado (Berry, 1992), y valores de 10 y 16.6% para camarón fresco y camarón congelado respectivamente (Fatma, 2011). La mayor parte de las muestras de camarón crudo congelado cumplen con los criterios sanitarios de la

Secretaría de Salud para *L. monocytogenes*, ya que como se mencionó anteriormente, solo en una de las muestras de producto final se pudo detectar esta bacteria, aunque a niveles muy bajos (0.3 NMP/g). A pesar de lo anterior, la presencia de esta bacteria en diferentes etapas del proceso y en una muestra de producto terminado, es indicativo de que parte del camarón congelado en bloque no cumple con las especificaciones sanitarias mexicanas. A nivel internacional, las especificaciones para *L. monocytogenes* están enfocadas a los productos listos para el consumo (LPC), estableciendo “cero tolerancia” en este tipo de productos (Ababouch, 2005; Kataoka, 1993), por lo que si se toma como referencia esta especificación, el camarón que salió positivo para esta bacteria, tampoco cumpliría con los requerimientos internacionales. Considerando que esta bacteria es fácilmente eliminada mediante el cocimiento (60°C/ 1.95 – 4.48 min para pescado) (Huss y Gram, 2004) y que se encuentra en muy bajas cantidades que posiblemente no pueden ser detectados por los métodos tradicionales, sería conveniente evaluar la pertinencia de la normatividad mexicana en la que se establecen las especificaciones microbiológicas para crustáceos frescos refrigerados y congelados.

6.3 Análisis de las Diferentes Etapas del Proceso y Determinación de los Posibles Puntos o Medidas de Control

6.3.1 *V. parahaemolyticus*

Los niveles de *V. parahaemolyticus* variaron significativamente en dependencia del origen de la muestra, siendo el camarón de bahía el que presentó las mayores concentraciones. A pesar de ello, estos niveles no sobrepasan los criterios sanitarios establecidos por la normatividad mexicana, pero sí los establecidos por el mercado internacional. Estos niveles pueden ser disminuidos con la adecuada aplicación e implementación de las buenas prácticas de manufactura, pero es importante que para el adecuado control de *V. parahaemolyticus* en el proceso de camarón crudo congelado, se considere

el origen del producto desde la etapa de recepción y se realicen adecuadamente los controles asociados a las buenas prácticas de higiene.

Posiblemente, los altos niveles de *V. parahaemolyticus* detectados en el camarón de bahía, son resultado del mal manejo a que se somete el camarón una vez capturado; ya que aun cuando este producto llega a la planta procesadora adecuadamente enhielado y a temperatura de refrigeración, existen deficiencias en la cadena de frío, ya que es común que el producto sea expuesto a temperatura ambiente por tiempos muy variables antes de arribar a puerto, punto hasta el cual es adecuadamente enhielado. Este tiempo de espera entre la captura y su adecuado enfriamiento, pueden propiciar el incremento de los niveles de *V. parahaemolyticus*, hasta valores similares o mayores a los encontrados en este estudio (4,300 NMP/g – Anexo 1). Se ha reportado que esta bacteria tiene tiempos de generación cortos de hasta 10-12 minutos (Zamora *et al.*, 2005), con lo cual, a condiciones idóneas (menos de dos horas) puede llegar a incumplir la normatividad nacional e internacional, pudiendo llegar a la dosis infectiva de 1×10^5 – 1×10^7 en poco más de cuatro horas si se inicia con una carga bacteriana de menos de 50 UFC/g (Daniels *et al.*, 2000; Zamora *et al.*, 2005).

Debido a que la planta procesadora no tiene control sobre el manejo a que se somete el producto antes de que llegue a sus instalaciones, es importante remarcar que solo se consideró a la etapa de recepción como punto de control, ya que es en esta etapa inicial donde la planta procesadora puede establecer sus controles. Por lo que a partir de este punto, se pueden implementar medidas de limpieza, sanitización, recambios de agua u otros controles contemplados dentro de las buenas prácticas de manufactura y en el sistema de calidad implementado en la planta procesadora. Además, por los resultados obtenidos en este estudio, se observó que el proceso de producción del camarón crudo congelado, disminuye la carga de *V. parahaemolyticus* a lo largo del proceso; ya sea en la(s) etapa(s) de lavado(s), pero principalmente en la etapa de congelación. La adición de soluciones cloradas, como el hipoclorito

de sodio durante el lavado, ayuda a disminuir los niveles de *V. parahaemolyticus* por su función bactericida (Henoa *et al.*, 2003); mientras que durante la congelación, la formación de cristales provocan el rompimiento y daño celular de las bacterias, ocasionando así una disminución en la carga bacteriana (Zhao y Zhang, 2005).

6.3.2 *L. monocytogenes*

Para *L. monocytogenes* no se pudo asociar ninguna etapa del proceso de camarón crudo congelado con el control de esta bacteria, ya que la presencia de este patógeno en las áreas muestreadas no fue constante (Tabla 9), tampoco se detectó un patrón o posible nicho de contaminación en ninguna de las etapas del proceso, ni se pudo asociar al producto.

Bajo las condiciones actuales de proceso, no se logró establecer a *L. monocytogenes* como un riesgo de proceso, ya que solo se detectó en el 12.2% de las muestras analizadas y a niveles apenas detectables (< 0.94 NMP/g o mL). Debido a lo anterior, la aplicación de buenas prácticas de higiene a lo largo del proceso, puede ser suficiente para mantener niveles mínimos de esta bacteria. Por otro lado, el tipo de producto no propicia el desarrollo de esta bacteria (Luber *et al.*, 2011; Kramarenko *et al.*, 2013; Wan *et al.*, 2010).

VII. CONCLUSIÓN

La combinación de NMP-PCR para la detección y cuantificación de *V. parahaemolyticus* y *L. monocytogenes* en muestras de músculo de camarón, de agua y superficies de contacto en el proceso de congelado de camarón, permite optimizar tiempo y costos, en comparación con la técnica tradicional.

El límite de detección determinado para la técnica propuesta de NMP-PCR utilizado en este estudio, tanto para *V. parahaemolyticus* como *L. monocytogenes* en los dos tipos de matrices (buffer y musculo de camarón), fue de 0.015 UFC/mL.

Los niveles promedio de *V. parahaemolyticus* en el músculo de camarón disminuyeron a lo largo de las diferentes etapas del proceso de camarón crudo congelado. Observándose una diferencia entre plantas procesadoras en los niveles de *V. parahaemolyticus* en cada una de las etapas del proceso, principalmente influenciada por el origen y las buenas prácticas de manufactura aplicadas por cada planta procesadora.

El punto de recepción, es la etapa donde el músculo de camarón presenta los niveles más altos de *V. parahaemolyticus*. Pero estos niveles se ven influenciados por el origen de la muestra y por el mes de muestreo; donde los valores más altos, se asocian al producto proveniente de bahía durante el mes de septiembre.

El producto final cumple con las especificaciones sanitarias tanto nacionales como internacionales ya que los niveles encontrados de *V. parahaemolyticus* en el producto congelado variaron de no detectado hasta 9.3 NMP/g.

La presencia de *L. monocytogenes* en el proceso de camarón crudo congelado no es constante. Este patógeno no presentó ningún patrón o nicho específico de posible contaminación. Aunado a esto, los niveles de concentración de esta bacteria, fueron mínimos a lo largo del proceso de camarón congelado en bloque (< 1 NMP/g, mL o cm^2). El 95 % de las muestras de camarón crudo congelado cumple con los criterios sanitarios de la Secretaría de Salud para *L. monocytogenes*. Sin embargo, sería conveniente evaluar la pertinencia de la normatividad mexicana que establece los criterios microbiológicos para crustáceos frescos refrigerados y congelados que recibirán tratamiento térmico posterior.

La etapa de recepción, fue el único punto de control establecido en base a *V. parahaemolyticus*, específicamente para el camarón proveniente de bahía. En relación a *L. monocytogenes*, no fue determinado ningún punto de control, ya que las concentraciones de esta bacteria fueron muy bajas y variables a lo largo del proceso de camarón crudo congelado.

Con los resultados obtenidos y las diferentes situaciones observadas en el desarrollo de esta investigación, sería conveniente ampliar este estudio con el fin de tener una mayor trazabilidad de *V. parahaemolyticus*, que incluya desde la captura hasta la obtención del producto final, principalmente para el camarón de acuicultura, ya que los resultados obtenidos en este estudio para este tipo de producto fueron pocos.

Si se tiene el conocimiento de hasta cuanto puede disminuir la concentración de este patógeno por efecto de la congelación, se podrá visualizar mejor hasta donde pueden ser controlables las altas cargas bacterianas de los productos provenientes de diferente origen y garantizar el cumplimiento de las regulaciones relacionadas a la inocuidad alimentaria.

Con el fin de disminuir las cargas bacterianas asociadas al camarón de bahía, es importante mejorar las condiciones del manejo de este producto, lo cual ayudaría a disminuir el posible riesgo de este producto, especialmente en la población local, donde el consumo en crudo de este producto puede ser frecuente.

VIII BIBLIOGRAFÍA

- Ababouch L. 2005. Causes of detentions and rejections in international fish trade. [cited 19/04/2013. Available from <http://www.fao.org/docrep/008/y5924e/y5924e0d.htm>].
- Abdullah S. N., Ariyawansa S., Babji A. S., y Hashim J. K. 2013. The risk assessment of *Vibrio parahaemolyticus* in cooked black tiger shrimps (*Penaeus monodon*) in Malaysia. *Food Control* 31 (2):546-552.
- Adams M., y Moss M. 2004. Bacterial Agents of Foodborne illness. In *Food Microbiology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Amako K., Shimodori S., Imoto T., Miake S., y Umeda A. 1987. Effects of chitin and its soluble derivatives on survival of *Vibrio cholerae* O1 at low temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (3):603-605.
- Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140 (3-4):310-317.
- Aznar R., y Alarcon B. 2002. On the specificity of PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in Food: A Comparison of Published Primers. *Systematic Applied Microbiology* 25:109-119.
- Balzo S. A. 2013. Clasificadora de camarón. Balzo [cited 19/06/2013. Available from <http://www.maquinasbalzo.com/productos.php?id=2>].
- Barocci S., Calza L., Blasi G., Briscolini S., De Curtis M., Palombo B., Cucco L., Postacchini M., Sabbatini M., Graziosi T., Nardi S., y Pezzotti G. 2008. Evaluation of a rapid molecular method for detection of *Listeria monocytogenes* directly from enrichment broth media. *Food Control* 19 (8):750-756.
- Bej A. K., Patterson D. P., Brasher C. W., Vickery M. C. L., Jones D. D., y 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.

- Belessi C.-E. A., Gounadaki A. S., Psomas A. N., y Skandamis P. N. 2011. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 145, Supplement 1 (0):S46-S52.
- Beltrán E. D. 2006. Aprovechamiento de los productos pesqueros, ed U. A. d. B. California. Baja California. <http://books.google.com.mx/books?id=Mel25-Pk6kwC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.
- Berry T. M. 1992. Frequency of *Listeria monocytogenes* and antibiotic resistant *Vibrio* spp. in raw, frozen shrimp, The University of Arizona.
- Beulens A. J. M., Broens D.-F., Folstar P., y Hofstede G. J. 2005. Food safety and transparency in food chains and networks Relationships and challenges. *Food Control* 16 (6):481-486.
- Boonyawantang A., Mahakarnchanakul W., Rachtanapun C., y Boonsupthip W. 2012. Behavior of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in prawn in response to temperature in laboratory and factory. *Food Control* 26 (2):479-485.
- Briggs M., Funge-Smith S., Subasinghe R. P., y Michael. P. 2005. Shrimp trade, marketing and economics. In *Introductions and movement of two penaeid shrimp species in Asia and the Pacific*, edited by F. F. T. Paper. Roma: FAO.
- Broberg C. A., Calder T. J., y Orth K. 2011. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and Infection* 13 (12–13):992-1001.
- Cabanillas-Beltrán H., Llausás-Magaña E., Romero R., Espinoza A., García-Gasca A., Nishibuchi M., Ishibashi M., y Gomez-Gil B. 2006. Outbreak of gastroenteritis caused by the pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3 : K6 in Mexico. *FEMS Microbiology Letters* 265 (1):76-80.
- Cabanillas H., Garcia A., y Gomez B. 2005. Estudio de un Brote Epidemiológico de Gastroenteritis en el Sur del Estado de Sinaloa, Mexico. *Boletín CIAD*.
- Cárdenas-Bonilla A., y Noriega-Orozco L. 2003. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura en el Procesamiento Primario de Productos Acuícolas. Edited by SENASICA.
- Carpentier B., y Cerf O. 2011. Review — Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* 145 (1):1-8.
- Carr J. 2012. Public Domain Picture [cited 16/07/2012. Available from http://www.publicdomainfiles.com/show_file.php?id=13527355811773.

- CICESE. 2011. Base de Datos Climáticos Del Noroeste de México [cited 20/07/13. Available from <http://peacbc.cicese.mx/datosclim/graficabc.php?seccion=nacional&idestacion=26293&tablaestado=SON>.
- Cifuentes L. J., Luis., Torres G., Pilar., y Frías M. 2002. El Océano y sus recursos X. Pesquerías [cited 20/03/13. Available from http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/087/htm/sec_7.htm.
- Conapesca. 2010. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2010. Edited by Conapesca. Mexico D.F: SAGARPA.
- Conapesca. 2011. Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2011. Mazatlán, Sinaloa México: SAGARPA.
- Cruz C. D., Win J.K., Chantrachoti. J., Mutukumira. A.N., y Fletcher. G.C. 2012. Comparing rapid methods for detecting *Listeria* in seafood and environmental samples using the most probably number (NMP) technique *International Journal of Food Microbiology* 153:483-487.
- Chasseignaux E., Gérault P., Toquin M.-T., Salvat G., Colin P., y Ermel G. 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters* 210 (2):271-275.
- Chávez S., María Cristina, y Montoya R., Leobardo. 2007. Producción de camarón In *Buenas Prácticas en la Producción de Alimentos*, edited by A. Gardea Béjar, *et al.* Mexico, D.F: CIAD-Trillas.
- Chen M., Guo D., Wong H.-c., Zhang X., Liu F., Chen H., Chen M., Liu B., Wang L., Wu F., y Feng L. 2012. Development of O-serogroup specific PCR assay for detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology* 159 (2):122-129.
- Churchill R. L. T., Lee H., y Hall J. C. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods* 64 (2):141-170.
- Daniels N. A., MacKinnon L., Bishop R., Altekruise S., Ray B., Hammond R. M., Thompson S., Wilson S., Bean N. H., Griffin P. M., y Slutsker L. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* Infections in the United States, 1973–1998. *Journal of Infectious Diseases* 181 (5):1661-1666.
- DaSilva D. A. 2010. Impact of US HACCP regulation on export of fish and fishery products from Guyana. Georgetown, Guyana.: University of Guyana, Institute of Development Studies.

- De Andrade S. M. B., Ladchumananandasivam R., Rocha B. G. d., Belarmino D. D., y Galvão A. O. 2012. The Use of Exoskeletons of Shrimp (*Litopenaeus vanammei*) and Crab (*Ucides cordatus*) for the Extraction of Chitosan and Production of Nanomembrane. *Materials Sciences & Applications* 3 (7):495-508.
- Downes F. P., y Ito K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods., ed A. P. H. Association. Washington. <http://books.google.com.mx/books?id=nz851GcZf0C&pg=PA10&dq=Compendium+Microbiological+experimentation+of+foods&hl=es&sa=X&ei=YnJDUfP4G7Do2gXryIGACQ&ved=0CCsQ6AEwAA#v=onepage&q=Compendium%20Microbiological%20experimentation%20of%20foods&f=false>.
- Economía S. d. 2013. Flujo del proceso productivo y escalas de producción [cited 22/03/13. Available from <http://www.contactopyme.gob.mx/guiasempresariales/guias.asp?s=14&guia=7&giro=1&ins=682>.
- Eguiarte L. E., Souza V., y Aguirre X. 2007. Ecología Molecular [cited 12/11/2011. Available from http://www.ecologia.unam.mx/laboratorios/evolucionmolecular/images/file/biblioteca/ArtsLab/Eguiarte-et-al_2007.pdf.
- Elliot R., y Elmer M. 2007. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Edited by C. Press.
- Espiñeira M., Atanassova M., Vieites J. M., y Santaclara F. J. 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 (1):122-131.
- FAO. 1988. Manual para la cria de camarones peneidos [cited 20/03/12. Available from <http://www.fao.org/documents/es/detail/69159>.
- FAO y OMS. 2002 Foro mundial de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos. In *Mejora de la eficiencia y transparencia en los sistemas de inocuidad de los alimentos: compartir experiencias*, edited by FAO/OMS. Marrakech, Marruecos.
- FAO y OMS. 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: Resumen interpretativo. *Serie de evaluación de riesgos microbiológicos*, ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf.
- Fatma H. M. A. 2011. Quality Evaluation of Some Fresh and Imported Frozen Seafood. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3:83-88.

- Ferri E. F. R., Navarro A. B., Sáez A. C., Rodríguez L. D., Carballeira A. O., Cosano G. Z., Jiménez E. C., Rodríguez F. P., y Díaz A. V. 2010. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) on the applicable microbiological criteria for pathogenic species of the genus *Vibrio* in imported fishery products, as additional control measures at border inspection posts. Edited by R. d. c. científico.
- Gardea B. A., González G. A., Inocencio H.-C., y Cuamea N. F. 2007. *Buenas Prácticas en la Producción de Alimentos*. Edited by T. S. A. d. C.V, CIAD. México, D.F.
- Gillett R. 2010. Estudio mundial sobre las pesqueías del camarón 20132013]. Available from <http://www.fao.org/docrep/013/i0300s/i0300s.pdf>.
- Greenemeier L. 2008. Recruiting a Dangerous Foe to Fight Cancer and HIV 15/06/201215/06/2012]. Available from <http://www.scientificamerican.com/article.cfm?id=recruiting-a-dangerous-foe>.
- Groisman E. 2001. *Principles of Bacterial Pathogenesis*. Edited by H. H. M. Instute. St. Louis, Missouri.
- Gutiérrez Ruelas U. 2012. Intoxicación mariscos de 'Rugus' a 37 2012 [cited 20/06/2013 2012]. Available from <http://www.eldiariodesonora.com.mx/nota.php?nota=905>.
- Health Canada. 2011. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready to Eat Foods. In *Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate and Health Products and Food Branch*. Santé Canada.
- Henoa R. S. C., Sierra P. C. R., y Gaitán A. J. A. 2003. Actividad bactericida del ácido hipocloroso. *Revista Facultad de Medicina* 51(3):136-142.
- Higuera-Ciapara I., y Noriega-Orozco L. O. 2000. Mandatory aspects of the seafood HACCP system for the USA, Mexico and Europe. *Food Control* 11 (3):225-229.
- Hitchins A. D., y Jinneman K. 2011. BAM: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* [cited 15/06/12. Available from <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm>.
- Huss H. H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish, ed FAO: Food And Agriculture Organization Of The United Nations <http://www.fao.org/DOCREP/V7180E/V7180E00.HTM>.

- Huss H. H., y Gram L. 2004. Pathogenic bacteria. In *Assessment and Management of Seafood Safety and Quality*, edited by F. F. TECHNICAL. Roma: FAO.
- Kaclíková E., Pangallo D., Drahovská H., Oravcová K., y Kuchta T. 2003. Detection of *Listeria monocytogenes* in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control* 14 (3):175-179.
- Kataoka A. 1993. Growth of *Listeria monocytogenes* in thawed frozen foods, B. S., Tokyo University of Marine Science and Technology, Kansas State University, Manhattan, Kansas.
- Kaysner C. A., y DePaola J. A. 2004. BAM Chapter 9: Vibrio [cited 11/06/12. Available from <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm070830.htm>.
- Kramarenko T., Roasto M., Meremäe K., Kuningas M., Pölttsama P., y Elias T. 2013. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control* 30 (1):24-29.
- Lake R., Hudson A., y Cressey P. 2003. Risk profile: *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. New Zealand: Institute of Environmental Science and Research Limited.
- León R. A. 2012. Factores ambientales asociados a la presencia *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio mimicus* y *Vibrio vulnificus* en la zona costera de Guaymas, Sonora. Maestría en Ciencias, Coordinación de Aseguramiento de Calidad y Aprovechamiento de Recursos Naturales, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Guaymas, Sonora.
- Lin C.-F. 2011. Global Food Safety: Exploring Key Elements for an International Regulatory Strategy. *Virginia Journal of International Law* 51 (3):637-695.
- López V., Suárez M., Chico-Calero I., Navas J., y Martínez-Suárez J. V. 2006. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista argentina de microbiología* 38:224-234.
- Luber P., Crerar S., Dufour C., Farber J., Datta A., y Todd E. C. D. 2011. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization – Recommendations for improved prevention and control. *Food Control* 22 (9):1535-1549.

- Manjarrez G. G. 2006. Efecto del Tiempo de Cocción Sobre las Proteínas del Músculo de Camarón Blanco (*Litopenaeus vannamei*), Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Universidad de Sonora.
- OMS. 2013. Food safety. World Health Organization [cited 08/07/13. Available from <http://www.who.int/foodsafety/en/index.html>.
- OMS W. H. O. 2009. 10 facts on food safety. Available from http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/en/index.html.
- Pasquier G. A. d. 2000. Los camarones y su importancia en la alimentación. FONAIAP DIVULGA, http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd65/texto/camarones.htm.
- Rábago M. 2012. Exhortan a no consumir camarón crudo por bacteria. UniradioNoticias.com [cited 20/06/2013. Available from <http://www.uniradionoticias.com/noticias/hermosillo/articulo146945.html>.
- Ray B., Hawkins S. M., y Hackney C. R. 1978. Method for the Detection of Injured *Vibrio parahaemolyticus* in Seafoods. *Applied and Environmental Microbiology* 35 (6):1121-1127.
- Rosec J.-P., Simon M., Causse V., y Boudjemaa M. 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 (2):136-145.
- SAGARPA. 2010. México: Sexto productor mundial de camarón. SIAP [cited 21/03/13. Available from http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=378:mexico-sexto-productor-mundial-de-camaron&catid=6:boletines&Itemid=569.
- Sanchez A. R. 2012. Se intoxican 10 personas por consumir mariscos crudos [cited 20/06/2013. Available from <http://www.elimparcial.com/EdicionEnLinea/Notas/Noticias/13092012/622163.aspx>.
- Schillhorn v. V., y Tjaart W. 2005. International trade and food safety in developing countries. *Food Control* 16 (6):491-496.
- Silva S. C. W., Olea A., Cachicas C. V., Fernández Ó. J., Ibáñez C. D., Hormazábal J. C., García M. J., y Maldonado B. A. 2008. Manual de Procedimientos: Aislamiento, Identificación y Caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*.

- Simpson B., C., Byelashov O. A., Geornaras I., Kendall P. A., Scanga J. A., Belk K. E., Smith G. C., y Sofos J. N. 2010. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing, thawing and home storage of frankfurters. *Food Microbiology* 27 (1):144-149.
- Srey S., Jahid I. K., y Ha S.-D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control* 31 (2):572-585.
- SSA S. d. S. 1994. NORMA Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994 Procedimiento para la Toma, Manejo y Transporte de Muestras de Alimentos para su Análisis Microbiológico. (proyecto de Norma). In *NOM-109-SSA1-1994*, edited by SSA. Cd. de México: Diario Oficial de la Federación.
- SSA S. d. S. 1994. NORMA Oficial Mexicana NOM-110-SSA1-1994, Bienes y Servicios. Preparación y Dilución de Muestras de Alimentos para sus Análisis Microbiológicos. Diario Oficial [cited 31/07/13. Available from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/110ssa14.html>].
- SSA S. d. S. 1994. Norma oficial mexicana nom-112-ssa1-1994, bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Diario Oficial.
- SSA S. d. S. 1995. NORMA Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. In *NOM-143-SSA1-1995*, edited by SSA. Cd. de México: Diario Oficial de la Federación.
- SSA S. d. S. 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-230-SSA1-2002, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano, requisitos sanitarios que se deben cumplir en los sistemas de abastecimiento públicos y privados durante el manejo del agua. Procedimientos sanitarios para el muestreo. Diario Oficial [cited 31/07/13. Available from <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/230ssa102.html>].
- SSA S. d. S. 2011. NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca fresco, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Diario Oficial [cited 18/03/12. Available from <http://200.77.231.100/work/normas/noms/2010/242ssa12011a.pdf>].
- Stauffer J. E. 1994. *QUALITY ASSURANCE OF FOODS Ingredients, Processing and Distribution*. Edited by Copyrihht. Westport Connecticut, USA: Food & Nutrition Press, Inc.
- Thompson A. a. S., ed. 2006. *The Biology of Vibrios*. Edited by A. S. f. Microbiology, *American Society for Microbiology*. Washington.

- Vanderzant C., y Nickelson R. 1972. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp Tissue Under Various Environmental Conditions. *Applied Microbiology* 23 (1):34-37.
- Venkateswaran K., Dohmoto N., y Harayama S. 1998. Cloning and Nucleotide Sequence of thegyrB Gene of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Application in Detection of This Pathogen in Shrimp. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (2):681-687.
- Vongxay K., He X., Cheng S., Zhou X., Shen B., Zhang G., Zhang J., y . F. 2006. Prevalence of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood and their processing environments as detected by duplex PCR. *Journal of the Science of food and Agriculture* 81 (1871-1877).
- Vora G. J., Meador C. E., Bird M. M., Bopp C. A., Andreadis J. D., y Stenger D. A. 2005. Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio spp.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (52):19109-19114.
- Wan N., M. N., Poole S. E., Deeth H. C., y Dykes G. A. 2010. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control* 21 (4):343-361.
- Yi-Cheng S., y Chengchu L. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology* 24 (6):549-558.
- Zamora D., Quiróz C., y Quiñónez E. 2005. Un enemigo marino silencioso: *Vibrio parahaemolyticus*. *Revista Digital Universitaria* 6 (1067-6079).
- Zeland F. S. A. N. 2003. *Listeria Risk Assessment and Risk Management Strategy*. Edited by FSANZ. Australia: FSANZ.
- Zhao G., y Zhang G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. *Journal of Applied Microbiology* 99 (2):333-338.
- Zhou X., y Jiao X. 2005. Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting actA gene. *Food Control* 16 (2):125-130.

ANEXOS

Anexo 1: Análisis del proceso de producción para camarón crudo congelado.

Etapa	Origen	Niveles de bacteria (NMP/g)		Posibilidad de variación			Comentarios por Origen
		Máximo	Mínimo	=	↑	↓	
Recepción: El producto puede tener tres orígenes	Bahía	4300	110	√			Se recibe fresco enhielado - cuentas iniciales altas
	Barco	110	<0.3	√			Se recibe congelado - cuentas iniciales bajas
	Acuicultura	<0.3	<0.3	√			Se recibe fresco enhielado con cabeza - no detección de <i>V. parahaemolyticus</i>
Lavado: Se adiciona solución clorada (generalmente hipoclorito de sodio)	Bahía	4600	46			√	Hasta tres lavados, concentración de cloro de 25 a 200 ppm. Concentración más alta en primer lavado
	Barco	39	0.3			√	Generalmente dos lavados, concentración de cloro en 1er lavado de 50 a 100 ppm ; 2do lavado de 25 a 50 ppm
	Acuicultura	3.5	3.5		√		Dos lavados, concentración de cloro en 1er lavado 300 ppm y 250 ppm para el segundo.

= Sin cambio en la concentración

↑ Aumento en la concentración

↓ Disminución en la concentración

Nd: No detectado

Anexo 1 (Continuación): Análisis del proceso de producción para camarón crudo congelado.

Etapa	Origen	Niveles de bacteria (NMP/g)		Posibilidad de variación			Comentarios por Origen
		Máximo	Mínimo	=	↑	↓	
<u>Selección mecánica:</u> Equipos difíciles de limpiar y sanitizar. Se observó variación en cuanto a limpieza y sanitización en dependencia de la planta.	Bahía	Nd	Nd				Tiempos de espera cortos
	Barco	Nd	Nd				El proceso de grandes volúmenes ocasiona mayores tiempos de espera en esta etapa.
	Acuicultura	Nd	Nd				El proceso de grandes volúmenes ocasiona mayores tiempos de espera en esta etapa.
<u>Selección y empaque manual:</u> Poco tiempo de espera en mesa.	Bahía	150	0.9			√	
	Barco	460	<0.3		√		
	Acuicultura	240	240		√		
<u>Pesado y Primer glaze:</u> Uso de agua potable fría en ocasiones clorada.	Bahía	Nd	Nd				Tiempos cortos de espera
	Barco	Nd	Nd				En lotes grandes, largos tiempos de espera
	Acuicultura	Nd	Nd				En lotes grandes, largos tiempos de espera.

= Sin cambio en la concentración

↑ Aumento en la concentración

↓ Disminución en la concentración

Nd: No detectado

Anexo 1 (Continuación): Análisis del proceso de producción para camarón crudo congelado.

Etapa	Origen	Niveles de bacteria (NMP/g)		Posibilidad de variación			Comentarios por Origen
		Máximo	Mínimo	=	↑	↓	
<u>Congelación:</u> La temperatura es congelación de -30°C a los -35°C	Bahía	Nd	Nd				
	Barco	Nd	Nd				
	Acuicultura	Nd	Nd				
<u>Segundo glaze y empaque:</u> Producto congelado. Agua potable fría. Tiempos cortos	Bahía	Nd	Nd				
	Barco	Nd	Nd				
	Acuicultura	Nd	Nd				
<u>Almacenamiento:</u> Temperaturas de congelación, al menos -20°C	Bahía	9.3	0			√	
	Barco	2.1	0			√	
	Acuicultura	0.9	0.9			√	

= Sin cambio en la concentración

↑ Aumento en la concentración

↓ Disminución en la concentración

Nd: No detectado