

Virus entéricos, bacterias enteropatógenas y organismos indicadores de contaminación en camarones y en el agua y el sedimento de sus bancos naturales de producción

Mariángela Bracho G.¹, Marynés Montiel² y Ligia Botero^{1*}

¹Laboratorio de Virología, Centro de Investigaciones del Agua, Facultad de Ingeniería.

²Unidad de Investigación en Microbiología Ambiental, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 01-02-08 Aceptado 29-01-09

Resumen

Se determinó la presencia de virus entéricos, bacterias enteropatógenas y organismos indicadores de contaminación (OIC), en muestras de camarones y del agua y el sedimento de dos bancos naturales de producción ubicados en el Lago de Maracaibo. Los virus fueron detectados por RT-PCR y cultivo celular. La presencia de bacterias enteropatógenas y la concentración de OIC se evaluaron por técnicas estándares. Se detectó un 27% de positividad para la presencia del genoma de Enterovirus y un 12,5% para Calicivirus, así mismo, se confirmó la presencia de Enterovirus Infecciosos en el 29,3% de las muestras. Se confirmó la presencia de *E. coli*, *Salmonella* y *Vibrio* en el 20,8%, 25% y 16,6% respectivamente, del total de las muestras analizadas. En este trabajo se detectó la presencia de virus entéricos y bacterias enteropatógenas en camarones capturados con fines de comercialización en el Lago de Maracaibo que presentaban concentraciones muy bajas de organismos coliformes totales y coliformes termotolerantes y en algunos casos ausencia de *E. coli*, confirmando así la necesidad de la inclusión de un parámetro viral en el control de la calidad microbiológica de los camarones y la necesidad de la vigilancia y el control microbiológico de los ecosistemas que funcionan como bancos naturales para la producción de estos organismos.

Palabras clave: camarones, agua, sedimentos, virus, bacterias.

Enteric viruses, enteropathogenic and fecal indicator bacteria in shrimp, water and sediment of their growing areas

Abstract

In this study, the presence of enteric viruses, pathogenic and fecal indicator bacteria (FIB) was determined in shrimp, water and sediment of two natural growing areas located in Maracaibo Lake. Viruses were detected by RT-PCR and cell culture. Enteropathogenic and fecal indicator bacteria were evaluated by standard techniques. Enterovirus and Calicivirus genomes

* Autor para la correspondencia: ligia.botero@gmail.com

and Infectious Enterovirus were detected in 27%, 12.5% and 29.3%, respectively. The presence of *E. coli*, *Salmonella* and *Vibrio* was confirmed in 20.8%, 25% and 16.6% respectively of all the analyzed samples. Enteric viruses and enteropathogenic bacteria were detected in shrimp that required the bacteriological normatives. The results obtained in this study show the necessity to include a viral parameter in the microbiological control of shrimp and their growing areas.

Key words: shrimp, water, sediment, viruses, bacteria.

Introducción

Los camarones poseen un alto valor nutritivo y un excelente sabor, por lo que son ampliamente apetecidos. En años recientes, el consumo de alimentos marinos se ha incrementado en una tasa fija anual de 2%, mientras que el aumento anual del consumo de camarones ha sido casi de 10% (1). En el año 2000, se reportó que a través del Puerto de Maracaibo y del Aeropuerto Internacional La Chinita, Venezuela exportó 2.822 Tm de camarones hacia los Estados Unidos, lo que representó una importante entrada de divisas para el país de alrededor de 18 millones de dólares (1).

En los tejidos de los camarones tienden a acumularse microorganismos y partículas presentes en el medio en que se desarrollan, por lo que la contaminación biológica de los cuerpos de agua donde estos habitan, ha despertado preocupación acerca de la acumulación de patógenos entéricos humanos en estos organismos acuáticos (2).

La transmisión al hombre de microorganismos patógenos causantes de enfermedades por el consumo de camarones contaminados, ha sido documentada en numerosos brotes ocasionados a nivel mundial (3). Se estima que más del 80% de los brotes de enfermedades transmitidas por consumo de mariscos se deben a su contaminación con virus entéricos como Calicivirus, Enterovirus, Hepatovirus (Hepatitis A) y/o Adenovirus 40 y 41, frente a un 7% ocasionado por infecciones bacterianas y el resto debido a sustancias químicas y alérgenos (4).

En América Latina, son escasos los trabajos que se han publicado acerca del aisla-

miento de virus entéricos humanos en aguas estuarinas y marinas y en los organismos que allí habitan (5, 6). Estudios previos realizados en el Lago de Maracaibo, ubicado en el estado Zulia, Venezuela, han demostrado la contaminación microbiológica de sus aguas producto de la descarga de aguas residuales sin tratamiento previo (6). De la misma manera, tampoco se tiene mucha información acerca de la presencia de virus entéricos en los sedimentos y el papel de estos en la acumulación de microorganismos en los organismos que habitan en estos ambientes (7).

En este trabajo se determinó la presencia de virus entéricos, bacterias enteropatógenas y organismos indicadores de contaminación, en muestras de camarones, agua y sedimento de dos bancos naturales de producción ubicados en el Lago de Maracaibo, estado Zulia.

Materiales y métodos

Área de estudio

Las muestras de camarón, agua y sedimento fueron colectadas en La Ciénaga de los Olivitos (10° 40' N y 71° 36' O) y en la playa de Ancón de Iturre (10° 47' N y 71° 22' O), localidades ubicadas en el municipio Miranda de la costa nor-oriental del estado Zulia (Figura 1).

Toma de muestra

Durante ocho meses (octubre 2006-mayo 2007), se colectaron un total de 48 muestras de: camarón (16 muestras), agua (16 muestras) y sedimento (16 muestras).

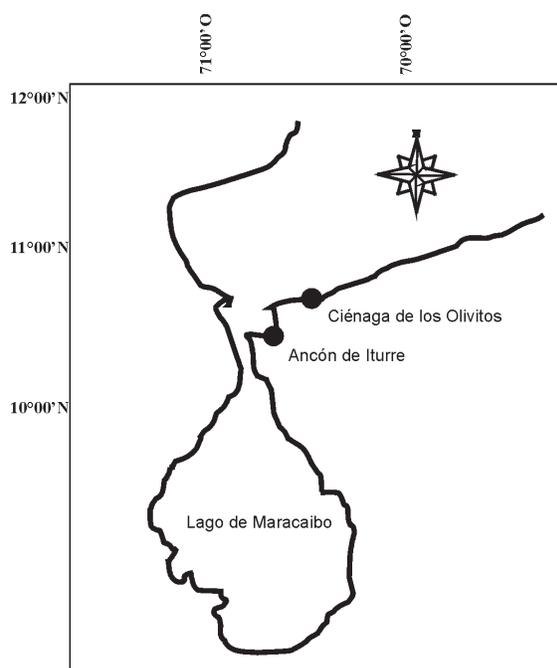


Figura 1. Ubicación del área de estudio.

Los camarones del género *Litopenaeus* sp, fueron colectados por pescadores de la zona con la ayuda de redes y colocados dentro de bolsas previamente rotuladas.

Las muestras de agua para el análisis bacteriológico fueron colectadas en botellas de vidrio de 500 mL de capacidad (8) y las de virus, en bidones de 60 L previamente desinfectados (9).

Las muestras de sedimento, tanto para el análisis bacteriológico como virológico, consistieron de aproximadamente 500 g cada una y se colocaron en bolsas con cierre hermético; estas fueron colectadas del mismo lugar de donde se tomaron las de camarón y de agua.

Todas las muestras fueron transportadas al laboratorio a 4°C para su inmediato procesamiento.

Procesamiento de las muestras

Camarones. Previo a su procesamiento los camarones fueron lavados y se les removió la cabeza, cola, y pleópodos (10).

Para el análisis de virus entéricos, se homogeneizaron 100 g de la carne de camarón en una licuadora a máxima velocidad por 2 minutos, luego se agregó 200 mL de glicina estéril 0,25 N a pH 10. La mezcla resultante se centrifugó a 2500 X g por 15 minutos, se colectó el sobrenadante y se le ajustó el pH a 7. Alícuotas de 9 mL se ultracentrifugaron a 229.600 X g por una hora a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de PBS 1X. Esta suspensión se dispensó en viales estériles y se conservaron a -70°C (11).

Para el análisis de las bacterias enteropatógenas, se homogeneizaron en una licuadora durante 2 min a alta velocidad, 25 g de la carne de camarón en 225 mL de los siguientes medios de enriquecimiento: Bismuto Sulfito (Himedia, India) para el aislamiento de *Salmonella*, Agua Alcalina Peptonada para *Vibrio* y medio de enriquecimiento de *Listeria* (Himedia, India) para el aislamiento de *Listeria* (12). Para el análisis de los organismos indicadores de contaminación fecal, se homogeneizó la misma cantidad de muestra en agua peptonada, en las condiciones descritas anteriormente (12).

Agua. La concentración de las partículas virales se llevó a cabo haciendo pasar 60 L de agua a través de filtros cargados positivamente 1MDS (CUNO, Inc., Meriden, Conn) (9). Los virus captados en los filtros fueron recuperados y reconcentrados por la técnica de adsorción-elusión (13), añadiéndoles 500 mL de solución eluyente (extracto de carne al 3%-glicina 0,05 M pH 9,5) el cual se colocó a temperatura ambiente durante 10 minutos, con agitación eventual, para promover la elusión de las partículas virales adsorbidas. Transcurridos los 10 minutos, se recuperó el eluyente, y se ajustó el pH a 7,2. Posteriormente, las partículas virales fueron reconcentradas ajustando el pH del eluyente a 3,5 con HCL 1 N y agitando durante 30 minutos, luego de lo cual, se centrifugó la muestra a 16000 X g por 10 minutos a 4°C; una vez descartado el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 30 mL de fosfato di-

sódico 1 M pH 9,5 y las muestras se almacenaron a -70°C hasta su posterior utilización.

Sedimento. Para la concentración de las partículas virales de las muestras de sedimento se procesaron 60 g del mismo y se mezclaron con 180 mL de extracto de carne al 3% pH 10,5; esta suspensión fue agitada durante 2 minutos y posteriormente se centrifugó a $3.250 \times g$, 4°C durante 10 min., se ajustó el pH a 3,5 con HCl 1 N y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se recuperó el pellet y se le agregó 20 mL de glicina 0,05 M pH 11; se centrifugó de nuevo ($3.250 \times g$, 4°C durante 20 minutos) y al sobrenadante se le añadió una solución de antibiótico-antimicótico al 1% (Sigma Chemical CO. USA). Las muestras fueron filtradas a través de una membrana de nitrato de celulosa de 0,22 m de diámetro de poro (MFS, Mixid cellulose ester polymer, USA) y se conservaron en alícuotas de 2 mL a -70°C , para su posterior análisis (14).

Las muestras de sedimento para los estudios bacteriológicos se procesaron preparando homogeneizados de la misma manera descrita para los camarones, pero agitando la muestra de forma manual de manera vigorosa durante 2 min (10).

Análisis de virus

Se determinó la presencia del genoma de Enterovirus y Calicivirus por la técnica de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y la de Enterovirus infecciosos por cultivo celular.

Para la realización del RT-PCR, la extracción del genoma viral presente en las muestras de camarón y de sedimento, se llevó a cabo con partículas de Sílica y Tiocianato de Guanidina (15). La extracción del genoma de los virus presentes en las muestras de agua se realizó con Trizol LS (Invitrogen, NY, USA.) partiendo de 250 μL de la muestra concentrada y siguiendo las instrucciones del fabricante (Invitrogen, NY, USA.). Los extractos de ácidos nucleicos se conservaron a

-70°C hasta el momento de su uso en la reacción de RT-PCR.

Para la detección de Enterovirus se emplearon los primers Ent 1_{dir} (5'- CGGTAC CTTTGTACGGCTGT- 3') y Ent 2_{rev} (5'- ATTG TCACCATAAGCAGCCA-3'), los cuales reconocen y amplifican una región conservada de 540 pb localizada en la región 5' no-codificante del genoma de los Coxsackievirus B4 y Poliovirus 1 (11). Para la detección Calicivirus, se empleó el par de primers p 290_{dir} (5'-GAGAAATATGACATG GATTGC-3') y p 289_{rev} (5'-CAAATTATGACAGAATCCTTC-3'), diseñados en base a la secuencia de la ARN polimerasa de los virus Norwalk, con los que se obtienen productos de 319 o 331 pb (16).

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador Gene AMP®PCR System 24000 (Perkim Elmer) de acuerdo con la metodología de Pina y cols. (11) para la determinación de Enterovirus, según el siguiente programa: 1.- retrotranscripción (RT): 45°C durante 45 minutos y luego 94°C por 2 minutos; 2.- amplificación de la secuencia blanco (PCR): 30 ciclos a 92°C durante 90 segundos, 55°C por 90 seg y 72°C por dos minutos y 3-extensión final de 72°C por 5 minutos (11). Para la determinación de Calicivirus el programa de RT-PCR fue 1.- retrotranscripción (RT): 45°C durante 45 minutos y luego 94°C por 2 minutos; 2.- amplificación de la secuencia blanco (PCR):, 30 ciclos a 94°C durante 30 seg, 49°C por 80 seg y 72°C por un minutos y 3-extensión final de 72°C por 10 minutos (16). El volumen de muestra utilizado en la reacción de RT-PCR para la detección del genoma viral fue de 6 μL , equivalente a 10 mL de agua, 0,02 gr. de camarón y 0,01 gr de la muestra de sedimento colectada.

Como controles positivos de la reacción de RT-PCR para Enterovirus se utilizó la vacuna poliomiélica oral para Enterovirus (Aventis Pasteur. USA) y un plásmido recombinante con la secuencia parcial de virus Sapporo, suministrado por el Laboratorio de Biología de Virus del Centro de Micro-

biología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC). Como control negativo para ambos virus se utilizó agua libre de nucleasas (Promega Corp., Madison, W.I. USA).

Los productos obtenidos en la RT-PCR fueron analizados en geles de agarosa al 2% en buffer Tris-Borato EDTA (TBE) y 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de Bromuro de Etidio. La electroforesis se realizó a 50 mA de corriente y a un voltaje de 100 V por 60 minutos. Una vez culminada la electroforesis se observó el gel en un transiluminador UV Pro (Cromatovue). Como marcador de peso molecular se empleó el marcador de 1 Kb DNA plus de Promega (Promega Corp. Madison, W.I. USA).

Detección de enterovirus infecciosos

Para la confirmación de la presencia de partículas virales infecciosas en las muestras, se realizó cultivo celular en células de Rabdomiosarcoma de Riñón Humano Embrionario (RD) línea ATCC CCL 136 (17).

Para el mantenimiento de la línea celular se empleó medio MEM (Medio Mínimo Esencial, Sigma Chemical Co, USA), con 10% de suero fetal bovino (Hyclone@USA) y una solución de antibiótico-antimicótico al 1% (Sigma Chemical Co, USA). Una vez formada la monocapa se cambió el medio de crecimiento por medio de mantenimiento (MEM al 2% de SFB).

Para la determinación del efecto citopático (ECP), se inoculó 100 μL de los concentrados de las muestras de agua y 100 μL de una dilución 3:7 del concentrado de las muestras de camarón y sedimento en botellas de cultivo con MEM sin suplementar y se incubó a 37°C en atmósfera de CO_2 . La dilución de las muestras de camarón y de sedimento utilizada fue seleccionada en base a los resultados arrojados por una serie de ensayos previos llevados a cabo con el fin de evitar citotoxicidad.

Las monocapas inoculadas se observaron diariamente durante 7 días y a medida que aparecía el ECP fueron congeladas a -20°C. Al cabo de 7 días, todos los cultivos que no habían presentado ECP se congelaron a -20°C. Posteriormente, se realizó criolisis a todas las placas que consistió en descongelar y congelar tres veces. Se recolectó el contenido de cada una de las placas en tubos de 50 mL, los cuales se centrifugaron a 3.500 X g, a 4°C durante 15 min. El sobrenadante de cada muestra se recolectó en viales de 2 mL estériles que fueron guardados a -70°C para la realización del segundo pase, para lo cual se inoculó 500 μL del sobrenadante recolectado del primer pase, en platos de cultivo de 6 pozos. De nuevo las monocapas fueron observadas durante 7 días y a medida que aparecía efecto citopático se congelaron a -20°C y se repitió el mismo procedimiento para el tercer pase.

Análisis de bacterias

Para el aislamiento e identificación de los géneros de bacterias enteropatógenas: *E. coli*, *Salmonella*, *Vibrio* y *Listeria*, se siguieron las técnicas estándares propuestas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) (18). En relación a los organismos indicadores de contaminación, los aerobios mesófilos (AM), se cuantificaron utilizando la técnica de vaciado en placa (19) y los coliformes totales (CT), coliformes fecales o termotolerantes (CTT), *Streptococcus* fecales (SF) y *Enterococcus* (EF) se cuantificaron siguiendo la técnica de número más probable (NMP) (12).

Resultados y discusión

Los porcentajes de positividad para la presencia de virus entéricos y bacterias enteropatógenas se muestran en la tabla 1.

Se determinó presencia del genoma de Enterovirus en los tres tipos de muestras estudiadas siendo mayor en camarón (31,2%) que en agua y sedimento (25%). De igual manera, se determinaron Enterovirus infec-

Tabla 1
Porcentaje de positividad para la presencia de virus entéricos y bacterias enteropatógenas en las muestras de camarón, agua y sedimento.

Microorganismo	Tipo de muestra		
	Camarón	Agua	Sedimento
Virus entéricos			
Enterovirus genoma	31,2%	25%	25%
Calicivirus genoma	12,5%	0	0
Enterovirus infecciosos	31,2%	43,7%	12,5%
Bacterias enteropatógenas			
<i>E. coli</i>	31,2%	25%	12,5%
<i>Salmonella</i> sp.	25%	25%	25%
<i>Vibrio</i> sp.	12,5%	18,7%	18,7%
<i>Listeria</i> sp.	0	0	0

ciosos en los tres tipos de muestras, presentándose el porcentaje mayor en agua, seguido de camarón (31,2%) y de sedimento (12,5%). El genoma de Calicivirus solo fue detectado en las muestras de camarón (12,5%).

Los resultados anteriores concuerdan con los reportados en otras investigaciones llevadas a cabo a nivel mundial, en las cuales se ha obtenido un mayor porcentaje de positividad para la presencia de Enterovirus que de Calicivirus en muestras ambientales (11, 20). La presencia de Enterovirus y Calicivirus en las muestras analizadas, indica la existencia de contaminación fecal y constituye un riesgo para la salud pública, ya que estos virus al ser ingeridos incluso a muy bajas dosis (hasta una partícula viral infecciosa), pueden causar infección y con ello una gran variedad de enfermedades desde gastroenteritis, diarrea, parálisis, hepatitis infecciosa hasta miocarditis y meningitis séptica, entre otras (2, 3).

La obtención de muestras con ECP en la línea celular RD confirmó la presencia, tanto en camarones como en el agua y en los sedimentos de sus bancos naturales de producción, de partículas virales viables capa-

ces de producir infección, las cuales pudieran estar relacionadas con los Enterovirus humanos del tipo *Echovirus* (2, 6, 7, 9, 11, 14, 18, 21, 25, 27 y 30), *Cocksackievirus* tipo A (A18 y A20) y/o *Poliovirus* (1, 2 y 3 o la cepa vacunal) los cuales son capaces de reproducirse en esta línea celular (17).

Los porcentajes de positividad para la presencia de virus infecciosos obtenidos en esta investigación pueden considerarse elevados (12,5%-43,7%), si se comparan con los obtenidos en investigaciones similares llevadas a cabo en España por Pina y col. (11) y por Formiga-Cruz y col. (3), quienes reportaron porcentajes de Enterovirus de 27%, para muestras ambientales.

Se encontró el mayor porcentaje de *E. coli* en las muestras de camarones (31,2%) seguida de las de agua (25%) y de las de sedimento (12,5%) (tabla 1). En el caso de *Salmonella*, en los tres tipos de muestras se determinó 25% de positividad. *Vibrio*, se encontró en el 18,7% de las muestras de agua y de sedimento y en 12,5% de las de camarón. No se detectó la presencia de bacterias pertenecientes al género *Listeria* en ninguna de las muestras analizadas en este estudio. La presencia en los camarones de los géneros

bacterianos mencionados anteriormente, pudiese ocasionar enfermedades a los humanos si no se cocinan los camarones adecuadamente antes de ser ingeridos.

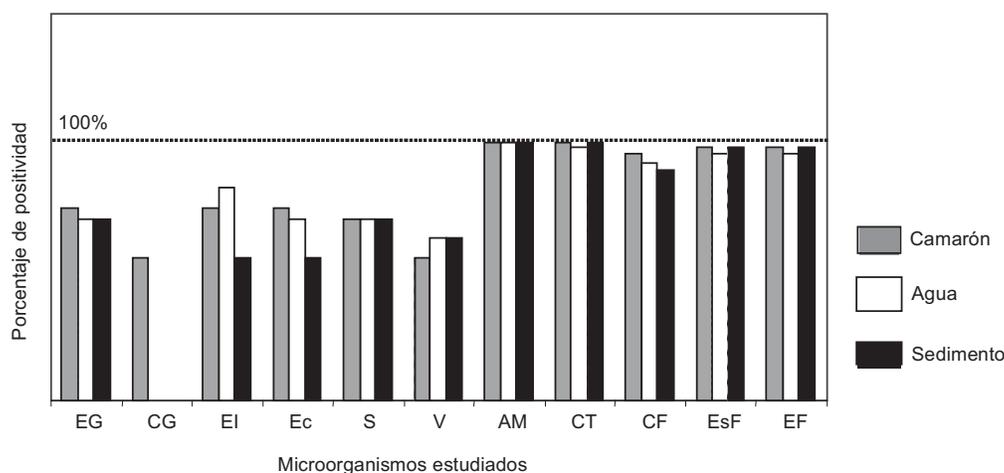
Aunque el análisis estadístico indica que no existen diferencias significativas en los porcentajes de positividad de los organismos estudiados en los diferentes tipos de muestras, las muestras de camarón fueron las que presentaron mayor porcentaje de positividad para la presencia de virus entéricos y de bacterias enteropatógenas (figura 2). Resultados similares han sido reportados en otras investigaciones en las que se ha demostrado que los niveles de contaminación viral y bacteriana son generalmente mayores en los camarones y en moluscos bivalvos que en la columna de agua (4, 11). En diversos estudios se ha demostrado la presencia de virus patógenos y de bacterias en animales acuáticos que habitaban en aguas que cumplían los estándares de calidad microbiológica (3, 11, 21).

El alto porcentaje de positividad para la presencia de Enterovirus, Calicivirus y bacterias enteropatógenas encontrado en las muestras de camarones, pudiese estar relacionado con sus hábitos alimenticios, ya

que ingieren otros organismos que pudiesen estar contaminados y de esta manera acumulan los patógenos (4).

Por su parte, la mayor frecuencia de positividad para la presencia de virus y bacterias en las muestras de sedimento en comparación con las de agua (figura 2), sugiere que estos actúan como reservorios para la liberación de microorganismos patógenos en los ambientes acuáticos contaminados, ya que los microorganismos tienden a adsorberse a las partículas que suelen estar suspendidas en el agua (22) y que luego precipitan formando el sedimento (21). En investigaciones llevadas a cabo por Davies y col. (23), Griffing y col. (20) y Karim y col. (24), se ha reportado que los sedimentos pueden contener de 100 a 1000 veces más bacterias y virus que el agua circundante.

Los rangos y promedios de los organismos indicadores de contaminación se muestran en la tabla 2. Se encontraron todos los organismos indicadores de contaminación en los tres tipos de muestras estudiadas. A excepción de los CT y los EF se presentaron valores promedio más elevados en camarón, seguido de sedimento y de agua.



EG= enterovirus genoma, CG= calicivirus genoma, EI= enterovirus infecciosos, Ec= *E. coli*, S= *Salmonella* sp., V= *Vibrio* sp., AM= aerobios mesófilos, CT= coliformes totales, CF= coliformes fecales, EsF= estreptococos fecales, EF= enterococos fecales.

Figura 2. Comparación de los porcentajes de positividad de los microorganismos estudiados por tipo de muestra.

Tabla 2
Porcentaje de positividad, rango y promedio de organismos indicadores de contaminación detectados en las muestras de camarón, agua y sedimentos

Microorganismo	Tipo de muestra		
	Camaron	Agua	Sedimento
Aerobios Mesófilos			
Porcentaje de positividad	100%	100%	100%
Rango (UFC/100 g)	$1,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^7$	$1,2 \times 10^5 - 4,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^4 - 2,4 \times 10^7$
Promedio (EFC/100 g)	$8,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$5,8 \times 10^6$
Coliformes Totales			
Porcentaje de positividad	100%	93,7%	100%
Rango (NMP/100 g)	$1,3 \times 10^3 - 1,6 \times 10^5$	$1,3 \times 10^2 - 1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^7$
Promedio (NMP/100 g)	$4,1 \times 10^4$	$8,5 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$
Coliformes fecales			
Porcentaje de positividad	81,2%	68,7%	62,5%
Rango (NMP/100 g)	$<2 \times 10^0 - 1,6 \times 10^5$	$<2 \times 10^0 - 1,6 \times 10^5$	$<2 \times 10^0 - 1,6 \times 10^5$
Promedio (NMP/100 g)	$3,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4$
Streptococos fecales			
Porcentaje de positividad	93,7%	81,2%	93,7%
Rango (NMP/100 g)	$<2 \times 10^0 - 1,6 \times 10^5$	$<2 \times 10^0 - 1,1 \times 10^5$	$<2 \times 10^0 - 9,0 \times 10^4$
Promedio (NMP/100 g)	$1,3 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
Enterococos fecales			
Porcentaje de positividad	93,7%	81,2%	93,7%
Rango (NMP/100 g)	$<2 \times 10^0 - 1,6 \times 10^5$	$<2 \times 10^0 - 1,6 \times 10^5$	$4,0 \times 10^1 - 4,0 \times 10^4$
Promedio (NMP/100 g)	$2,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$6,1 \times 10^3$

En Venezuela, la única norma relacionada con la calidad de camarones es la COVENIN 453-93 (25) la cual contempla los requisitos microbiológicos para camarones crudos y cocidos congelados, estableciendo valores máximos de 1×10^3 UFC AM g^{-1} y $4,6 \times 10^0$ NMP CF g^{-1} para camarones crudos congelados. Al comparar estos estándares con los resultados obtenidos en este estudio, se observó que el 62,5% de las muestras sobrepasan estos valores, por lo que no son aptas para su consumo y comercialización. En el 33% de las muestras que cumplían la normativa se detectó la presencia de virus entéricos (Figura 3).

Se determinó la presencia de Enterovirus y Calicivirus en camarones que presentaban concentraciones muy bajas de organismos CT y CTT y ausencia de *E. coli*. Estos

resultados concuerdan con los reportados a nivel mundial y respaldan la idea de la necesidad de la inclusión de un parámetro viral, ya sea virus humanos o bacteriófagos, en el control de la calidad microbiológica de los camarones (11).

Al evaluar la calidad del agua utilizando la normativa propuesta por la FDA (26) para las aguas de cultivo de moluscos bivalvos, en ausencia de una normativa para camarones, se observa que el 68,7% de las muestras de agua analizadas en este estudio no eran aptas para tal fin, detectándose en el 40% de las muestras que si resultaron aptas la presencia de virus entéricos.

Si se evalúa la normativa venezolana de calidad de aguas (agua tipo 4) desde el punto de vista de su uso con propósitos de:

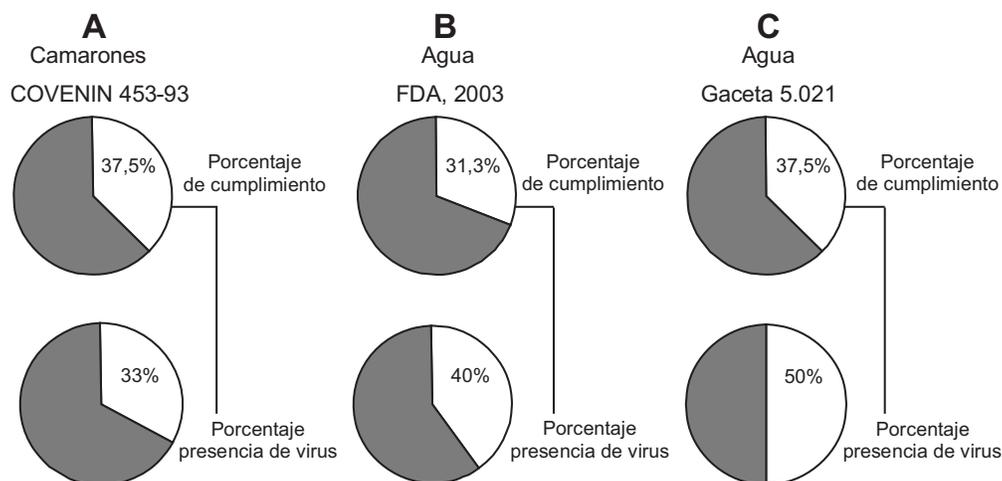


Figura 3. Comparación de los porcentajes de positividad de las muestras que cumplían los límites microbiológicos establecidos para camarones congelados, agua de cultivo y recreacional, en la normativa de la FDA y de Venezuela y que presentaban presencia de virus entéricos.

recreación, deportes acuáticos y pesca comercial y deportiva, la cual estipula que estas no deben contener más de 200 NMP/100mL de CTT (27), se observa que el 62,5% de las muestras no eran aptas para tal fin y en el 50% de las que si resultaban aptas, se detectó la presencia de virus entéricos.

Entre los factores que pueden influenciar la presencia de bacterias y de virus entéricos en las aguas del sistema del Lago de Maracaibo, se puede mencionar que el incremento del número de residentes y el desarrollo costero asociado, ha llevado a la liberación de nutrientes y de patógenos entéricos humanos hacia las aguas superficiales del mismo, a través de la descarga de desechos líquidos y sólidos provenientes de los asentamientos humanos, puertos e industrias, así como de actividades agrícolas de las áreas contiguas a la cuenca del Lago (28). De acuerdo con Lipp y cols., 2001 (29) el incremento poblacional en las zonas costeras introduce un alto porcentaje de aguas residuales no tratadas al mar y esta es la forma de contaminación que es probablemente responsable de gran parte de la morbilidad y mortalidad humana en el mundo.

Miles de personas utilizan las playas con fines de sustento y/o recreativos cada año en Venezuela, y la salud de los usuarios y quienes participan en estas actividades debe protegerse a través del mantenimiento de la calidad sanitaria del agua, hasta ahora en nuestro país, esto solo se lleva a cabo mediante el monitoreo de la presencia de organismos indicadores de contaminación fecal. Sin embargo, en este estudio se demostró que los niveles de los organismos CT y CF no se relacionan con la presencia de bacterias enteropatógenas ni de virus entéricos; por lo que puede afirmarse que los estándares bacteriológicos establecidos en la Normativa Venezolana no son adecuados para indicar la contaminación viral de las aguas, lo que trae como consecuencia el que se este pasando por alto la presencia de organismos altamente patógenos que pueden poner en peligro la salud de la comunidad. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran la necesidad de llevar a cabo una evaluación de las normativas venezolanas que conduzca a la inclusión de un parámetro viral en el control microbiológico de la calidad de las aguas en nuestro país.

Conclusiones

En este trabajo se detectó la presencia de virus entéricos y de bacterias enteropatógenas en camarones capturados en el Lago de Maracaibo, y la poca relación de estos con los indicadores tradicionales de contaminación, demostrando la necesidad de la vigilancia y el control microbiológico de los ecosistemas que funcionan como bancos naturales para la producción de estos organismos y la necesidad de incluir un parámetro de contaminación viral en la normativa de calidad de aguas y de camarones.

Agradecimientos

Este trabajo de Investigación fue posible gracias al apoyo financiero otorgado por el Fondo Nacional para la Ciencia Tecnología e Innovación de Venezuela (FONACIT) a través del proyecto SI-2002000375, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES-LUZ) y al apoyo logístico del Centro de Investigaciones del Agua de la Facultad de Ingeniería de la Universidad del Zulia. Los autores agradecen el apoyo técnico en el procesamiento de las muestras de Br. Rosa Romero y Br. Fela Mar Gómez.

Referencias bibliográficas

- SERVICIO AUTÓNOMO DE LOS RECURSOS PESQUEROS Y ACUÍCOLAS (SARPA). **Estadísticas del Subsector Pesquero y Acuícola de Venezuela. 1995-1999.** 1999.
- CROCI L., LOSIO N., SUFFREDINI A., PAVONI E., DI PASQUALE S., FALLACARA A., ARCANGELI G. *Int J Food Microbiol* 114: 252-257. 2007.
- FORMIGA-CRUZ M., HUNDESA A., CLEMENTE-CASARESA P., ALBINANA-GIMENEZA A., GIRONES R. *J Virol Methods* 125: 111-118. 2005.
- BODIL H., ANNIKA A. *Int J Food Microbiol* 113: 296-302. 2007.
- BOTERO L., MONTIEL M., PORTO L. *J Environ Sci Health* 27: 2213-2226. 1992.
- OLIVEROS C., LEON D., MARTINEZ M., BRACHO M., LUDERT J., GARCIA M., BOTERO L. *Ciencia* 14(2): 74-81. 2006.
- MONTIEL M., BOTERO L. *I Congreso Internacional de la Cuenca del Lago de Maracaibo.* Maracaibo (Venezuela). CCL-10. 2006.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.** 19th Edition. APHA, AWWA, WPCF, Inc. Washington (USA). 1998.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). *Fed Regist* 67(9): 1812-1844. 2002.
- NORMA VENEZOLANA COVENIN 1126-89. **Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico** (1^{era} revisión). Fondonama. Caracas (Venezuela). 1989.
- PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J., GIRONES R. *Appl Environ Microbiol* 64(9): 3376-3382. 1998.
- WALLACE H., GERALDINE A. **Food and Drug Administration-Bacteriological Analytical Manual.** AOAC. Chapter 1. 8^{ed} Bethesda: AOAC International, 101-109. 1995.
- GERBA C., DE LEÓN R., ROSE J.B. **Manual de vigilancia de virus entéricos en el agua.** Curso "Avances en la detección de Bacterias Enteropatógenas, Virus y Parásitos en aguas y en aguas residuales". Maracaibo (Venezuela). 65-77. 1992.
- BITTON G., YING-JEN C., FARRAH S.R. *J Virol Methods* 4: 1-8. 1982.
- BOOM R., SOL C., SALIMANS M., JANSEN C., WERTHEIMVAN DILLEN P., VAN DER NOORDAA J. *J Clin Microbiol* 28:495-503. 1990.
- JIANG S., NOBLE R., CHU W. *Appl Environ Microbiol* 67(1): 179-184. 2001.
- THOMAS M., LE BOUVIER G. *J Gen Virol* 1(1):125-130. 1967.

18. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. AOAC International. Bethesda (USA). 204-210. 1995.
19. NORMA VENEZOLANA COVENIN 902-87. **Alimentos. Método para recuento de colonias de bacterias aeróbicas en placa de Petri** (2^{da} revisión). Fondonama. Caracas (Venezuela). 1987.
20. GRIFFIN D., DONALDSON K., PAUL J., ROSE J. **Clin Microbiol Rev** 16:129-143. 2003.
21. MUNIAIN-MUJICA I., CALVO M., LUCENA F., GIRONES R. **Inter J Food Microbiol** 83:75-85. 2003.
22. HEWSON I., FUHRMAN J. **Deep-Sea Res PII** 54: 811-830. 2007.
23. DAVIES C., LONG J., DONALD M., ASHBOLT N. **Appl Environ Microbiol** 61(5): 1888-1896. 1995.
24. KARIM M., MANSHADI F., KARPISCAK M., GERBA C. **Water Res** 38: 1831-1837. 2004.
25. NORMA VENEZOLANA COVENIN 453-93. **Camarones congelados**. Fondonama. Caracas (Venezuela). 1993.
26. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guide for the control of molluscan shellfish**. www.fda.gov/. 10/12/2007.
27. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. **Gaceta Oficial de la República de Venezuela** No. 5.021. Imprenta Nacional. Caracas (Venezuela). 1995.
28. BING-MU H., HSUAN-HSIEN Y. **Water Res** 37:1111-1117. 2003.
29. LIPP E., FARRAH S., ROSE J. **Mar Pollut Bull** 42(4): 286-293. 2001.