

Laura Camuña Pardo

**ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ATÚN Y
SALMÓN DESTINADOS A SER CONSUMIDOS EN CRUDO, EXPENDIDOS EN
SUPERMERCADOS DE LA CIUDAD DE REUS**

TRABAJO DE FINAL DE GRADO

Dirigido por el Dr. Alberto Miguel Stchigel Glikman

Codirigido por la Dra. Marta Sanchís Talón

Grado de Nutrición Humana y Dietética



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Reus

2020/2021



L'avaluació del treball pràctic tindrà en compte la nota referida pel tutor respecte a la memòria impresa i el seguiment del treball. El resultat de l'avaluació del tutor ha de ser favorable per tal que l'alumne pugui presentar i defensar el treball i representa el 25 % de la nota total del treball escrit (salvo excepcionalitat per la pandèmia).

ENSENYAMENT: Nutrició Humana i Dietètica

NOM DE L'ALUMNE: Laura Camuña Pardo

TÍTOL DEL TREBALL: ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ATÚN Y SALMÓN DESTINADOS A SER CONSUMIDOS EN CRUDO

SEGUIMENT I AVALUACIÓ DEL TREBALL PER PART DEL TUTOR DEL TREBALL PRÀCTIC (0-10)	
Ha mostrat capacitats d'anàlisi, síntesi i raonament al llarg del treball	10
El seu grau d'implicació durant el desenvolupament del treball ha estat elevat	10
El procés d'elaboració del treball ha estat continuat	10
Ha mostrat habilitat de cerca i gestió de la informació	10
Ha mostrat capacitat d'organització i planificació	10
Ha seguit la normativa pròpia del Centre en quan a la presentació escrita del treball	10
El treball és ordenat i redactat amb cura, expressant-se correctament amb la llengua escollida	10
Els resultats del treball són originals	10
El treball presentat supera les expectatives del tutor	10
<u>Comentaris del tutor</u> El tutor de la Laura Camuña Pardo expressa que l'alumna ha superat amb escreix les expectatives que s'havia depositat en ella, tant a nivell personal com a professional.	
MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)	10

AVALUACIÓ: FAVORABLE ☒

NO FAVORABLE ☐

NOM I SIGNATURA DEL TUTOR*: Alberto Miguel Stchigel Glikman

REUS, a 19 de MAIG de 2021

*Lliurar una còpia al tutor i adjuntar una còpia amb la signatura original al Treball escrit.
La suplantació de la signatura original està tipificada com a falta greu i serà objecte d'expedient.



L'avaluació del treball pràctic tindrà en compte la nota referida pel tutor respecte a la memòria impresa i el seguiment del treball. El resultat de l'avaluació del tutor ha de ser favorable per tal que l'alumne pugui presentar i defensar el treball i representa el 25 % de la nota total del treball escrit (salvo excepcionalitat per la pandèmia).

ENSENYAMENT: Nutrició Humana i Dietètica

NOM DE L'ALUMNE: Laura Camuña Pardo

TÍTOL DEL TREBALL: ESTUDIO PRELIMINAR SOBRE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL ATÚN Y SALMÓN DESTINADOS A SER CONSUMIDOS EN CRUDO

SEGUIMENT I AVALUACIÓ DEL TREBALL PER PART DEL TUTOR DEL TREBALL PRÀCTIC (0-10)	
Ha mostrat capacitats d'anàlisi, síntesi i raonament al llarg del treball	10
El seu grau d'implicació durant el desenvolupament del treball ha estat elevat	10
El procés d'elaboració del treball ha estat continuat	10
Ha mostrat habilitat de cerca i gestió de la informació	10
Ha mostrat capacitat d'organització i planificació	10
Ha seguit la normativa pròpia del Centre en quan a la presentació escrita del treball	10
El treball és ordenat i redactat amb cura, expressant-se correctament amb la llengua escollida	10
Els resultats del treball són originals	10
El treball presentat supera les expectatives del tutor	10
<u>Comentaris del tutor</u> La tutora de Laura Camuña pardo expressa que l'alumna ha superat amb escreix les expectatives que s'havien depositat en ella, tant a nivell personal com professional.	
MITJANA DE LA NOTA DEL TUTOR (0-10)	10

AVALUACIÓ: FAVORABLE ☒

NO FAVORABLE ☐

NOM I SIGNATURA DEL TUTOR*: Marta Sanchis Talón

Reus, a 21 de Maig de 2021

*Lliurar una còpia al tutor i adjuntar una còpia amb la signatura original al Treball escrit.
La suplantació de la signatura original està tipificada com a falta greu i serà objecte d'expedient.

Índice

RESUMEN	5
RESUM	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. <i>Aeromonas</i> spp.	10
1.2. <i>Vibrio</i> spp.	11
1.2.1. <i>Vibrio cholerae</i>	12
1.2.2. <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13
1.2.3. <i>Vibrio vulnificus</i>	14
2. JUSTIFICACIÓN	16
3. HIPÓTESI Y OBJETIVOS.....	16
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
4.1. Origen de las muestras	17
4.2. Análisis de las muestras	17
4.2.1. Homogeneización de las muestras	17
4.2.2. Banco de diluciones	17
4.2.3. Análisis microbiológico	18
4.2.4. Caracterización molecular.....	19
5. RESULTADOS.....	21
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	25
7. BIBLIOGRAFÍA	27

Resumen

El pescado es considerado un alimento seguro para el consumo humano. No obstante, la falta de higiene en el procesamiento y la preparación pueden influir negativamente en la calidad e inocuidad de estos alimentos, y ser causa de enfermedades alimentarias. Este hecho adquiere especial importancia en aquellos productos destinados a ser consumidos crudos o poco cocidos, pues existen ciertas bacterias, como las pertenecientes a los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*, de naturaleza acuática, algunas de las cuales son patógenas para el ser humano. Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivo realizar un análisis microbiológico de 5 muestras de pescado destinado al consumo en crudo, comercializadas por tres cadenas de supermercados diferentes de la ciudad de Reus (provincia de Tarragona, España). Dichas muestras correspondieron a sashimi¹ de salmón (M-1) y sashimi de atún (M-2) (supermercado “A”), una muestra de supremas de salmón congelado (M-3) y una muestra de filetes de atún congelado aptas para su consumo en crudo (M-4) (supermercado “B”), y una muestra de nigiris² de salmón crudo (M-5) (supermercado “C”). Las muestras fueron homogeneizadas con una solución de agua peptonada 0,1 % tamponada (pH = 7,6) en Stomacher, y 1 mL del homogenizado se tomó para realizar diluciones seriadas 1:10 para finalmente sembrar por duplicado en los medios de cultivo selectivos y diferenciales ADA (*Aeromonas* spp.), Chromocult® Coliform Agar (coliformes totales y fecales) y TCBS (*Vibrio* spp.). También se sembró por duplicado en medio ARP para determinar la concentración de microorganismos aerobios mesófilos (incubación a 25 °C) y psicotróficos (incubación 15 °C). De las muestras analizadas únicamente la M-4 no evidenció ningún tipo de crecimiento bacteriano. Sin embargo, en el resto de muestras hubo recuento positivo para bacterias aerobias psicrótrofas, estando ausentes las aerobias mesófilas. En Chromocult® Coliform Agar solo se cuantificaron bacterias coliformes totales en las muestras M-1 y M-2. El estudio de su perfil bioquímico permitió identificar *Klebsiella oxytoca* en las muestras M-1 y M-2, y mediante MALDI-TOF se pudo identificar *Enterobacter cloacae* en la muestra M-2. De forma paralela, en ADA y TCBS se observaron colonias tanto típicas como atípicas para *Aeromonas* spp., y típicas fermentadoras de la sacarosa para *Vibrio* spp., respectivamente. La coloración de Gram realizada a las colonias atípicas (grandes, blancas y cremosas) provenientes de las muestras M-1 y M-2 en ADA, y su perfil de MALDI-TOF permitió identificarlas como la levadura *Candida krusei* (hongo unicelular). También se identificó *K. oxytoca* en la muestra M-2 sembrada en ADA, mediante la coloración de Gram, la prueba de la oxidasa y un set de pruebas bioquímicas para miembros bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, a pesar de que por MALDI-TOF la identificó como *C. Krusei* con un índice de 1,97. La única cepa atípica hallada en TCBS fue identificada como *Staphylococcus saprophyticus* por MALDI-TOF, realizando también sobre ella un estudio previo microscópico mediante tinción de Gram y la prueba de la catalasa. Finalmente, se procedió con la identificación de las colonias típicas crecidas en TCBS (M-1) mediante amplificación y secuenciación del gen *rpoD* basadas en la técnica de PCR. RESULTADO: El estudio ha demostrado que los valores de UFC/g de muestra para bacterias aerobias psicrótrofas y coliformes no superan (en general) los valores máximos recogidos en la legislación, asegurando así la calidad higiénica de las mismas. Por otro lado, no

¹ Pescado crudo fileteado

² Pequeña bola de Arroz cubierta de pescado crudo

se ha podido constatar la presencia de *Aeromonas* spp. en ADA, aunque si se aislaron colonias típicas de *Vibrio* spp. en TCBS y el gen *rpoD* se amplificó con gran calidad a partir de material genético extraído de estas colonias. Por otro lado, la presencia de *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Candida krusei* pone en duda la utilidad del medio ADA para el recuento selectivo y diferencial directo de *Aeromonas* spp. a partir de muestras de atún y salmón frescos y congelados, y alerta de la presencia de estas bacterias y levadura para los pacientes inmunocomprometidos debido a su carácter de patógenos oportunistas.

Palabras clave: ADA, atún, *Candida*, congelados, en crudo, *Enterobacter*, *Klebsiella*, pescado, psicotrófos, salmón, *Staphylococcus*, TCBS, toxiinfección.

Resum

El peix és considerat un aliment segur per al consum humà. No obstant això, la manca d'higiene en el processament i la preparació poden influir negativament en la qualitat i innocuïtat d'aquests aliments, i ser causa de malalties alimentàries. Aquest fet adquireix especial importància en aquells productes destinats a ser consumits crus o poc cuits, ja que hi ha certs bacteris, com els pertanyents als gèneres *Aeromonas* i *Vibrio*, de naturalesa aquàtica, alguns dels quals són patògens per a l'ésser humà. És per això que el present treball va tenir com a objectiu fer una anàlisi microbiològica de 5 mostres de peix destinat al consum en cru, comercialitzades per tres cadenes diferents de supermercats de la ciutat de Reus (província de Tarragona, Espanya). Aquestes mostres van correspondre a sashimi³ de salmó (M-1) i sashimi de tonyina (M-2) (supermercat "A"), una mostra de supremes de salmó congelat (M-3) i una mostra de filets de tonyina congelat aptes per a el seu consum en cru (M-4) (supermercat "B"), i una mostra de nigiris⁴ de salmó cru (M-5) (supermercat "C"). Les mostres van ser homogeneïtzades amb una solució d'aigua peptonada 0,1% tamponada (pH = 7,6) en Stomacher, i 1 ml de l'homogeneïtzat es va prendre per realitzar dilucions seriades 1:10 per finalment sembrar per duplicat en els medis de cultiu selectius i diferencials ADA (*Aeromonas* spp.), Chromocult® Coliform Agar (coliformes totals i fecals) i TCBS (*Vibrio* spp.). També es va sembrar per duplicat en medi ARP per determinar la concentració de microorganismes aerobis mesòfils (incubació a 25 °C) i psicòtrofs (incubació 15 °C). De les mostres analitzades, únicament la M-4 no va evidenciar cap tipus de creixement bacterià. No obstant, en la resta de mostres va haver recompte positiu per bacteris aerobis psicòtrofs, estant absents els aerobis mesòfils. En Chromocult® Coliform Agar només es van quantificar bacteris coliformes totals en les mostres M-1 i M-2. L'estudi del seu perfil bioquímic va permetre identificar *Klebsiella oxytoca* en les mostres M-1 i M-2, i mitjançant MALDI-TOF es va poder identificar *Enterobacter cloacae* en la mostra M-2. De forma paral·lela, en ADA i TCBS es van observar colònies tant típiques com atípiques per *Aeromonas* spp., i típiques fermentatives de la sacarosa per *Vibrio* spp., respectivament. La coloració de Gram realitzada a les colònies atípiques (grans, blanques i cremoses) provinents de les mostres M-1 i M-2 en ADA, i el seu perfil de MALDI-TOF, va permetre identificar-les com el llevat *Candida krusei*, (fong unicel·lular). També es va identificar *K. oxytoca* en la mostra M-2 sembrada en ADA, mitjançant la coloració de Gram, la prova de l'oxidasa i un

³ Peix cru filetejat

⁴ Petita bola d'arròs coberta de peix cru

set de proves bioquímiques per bacteries pertanyents a la família *Enterobacteriaceae*, tot i que per MALDI-TOF la va identificar com *C. Krusei* amb un índex de 1,97. La única soca atípica trobada en TCBS va ser identificada com *Staphylococcus saprophyticus* per MALDI-TOF, realitzant també sobre ella un estudi previ microscòpic mitjançant tinció de Gram i la prova de la catalasa. Finalment, es va procedir amb la identificació de les colònies típiques crescudes en TCBS (M-1) mitjançant amplificació i seqüenciació del gen *rpoD* basades en la tècnica de PCR. RESULTAT: L'estudi ha demostrat que els valors de UFC/g de mostra per bacteris aerobis psicòtrops i coliformes no superen (en general) els valors màxims recollits en la legislació, assegurant així la qualitat higiènica de les mateixes. D'altra banda, no s'ha pogut constatar la presència d'*Aeromonas* spp. en ADA, tot i que si es van aïllar colònies típiques de *Vibrio* spp. en TCBS, i el gen *rpoD* es va amplificar amb gran qualitat a partir de material genètic extret d'aquestes colònies. Per una altra banda, la presència de *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus saprophyticus* i *Candida krusei* posa en dubte la utilitat del medi ADA per al recompte selectiu i diferencial directe d'*Aeromonas* spp. a partir de mostres de tonyina i salmó frescs i congelats, i alerta de la presència d'aquests bacteris i llevat per als pacients immunocompromesos com a causa del seu caràcter de patògens oportunistes.

Paraules clau: ADA, tonyina, *Candida*, congelats, en cru, *Enterobacter*, *Klebsiella*, peix, psicòtrops, salmó, *Staphylococcus*, TCBS, toxiinfecció.

Abstract

Fish is considered a safe food for human consumption. However, poor hygiene in processing and preparation can negatively influence the safety and quality of these foods consequently cause foodborne diseases. This fact acquires special importance in those products destined to be consumed raw or undercooked due to exist different bacteria species those belonging to *Aeromonas* and *Vibrio* genera, of aquatic nature, which are pathogenic in humans. For this reason, the objective of this work was aimed to carry out a microbiological analysis of five fish samples destined for raw consumption obtained from three different supermarket chains located in Reus city (Tarragona province, Spain). Food samples were salmon sashimi⁵ (M-1) and tuna sashimi (M-2) (supermarket A), frozen salmon «suprêmes» (M-3) and frozen tuna fillets (M-4) (supermarket B), and salmon nigiri⁶ (supermarket C). All samples were introduced in a sterile bag and homogenized with 0,1% buffered peptone water (pH = 7,6) in a Stomacher, serially 10-fold diluted and placed in duplicate on ADA (*Aeromonas* spp.) and TCBS (*Vibrio* spp.) differential and selective culture media. Also, the samples were placed in duplicate on ARP media to determine the presence of aerobic mesophilic (incubated at 25 °C) and psychotropic (at 15°C) microorganisms. We not observed bacterial growth in sample M-4, however, the other samples showed positive counts for aerobic psychotropic bacteria. Mesophilic bacteria are not found in none of the samples. We only obtained counts of total coliform bacteria in Chromocult® Coliform Agar media in M-1 and M-2 samples. The biochemical study allowed identify from the M-1 and M-2 samples *Klebsiella oxytoca* and using MALDI-TOF technic *Enterobacter cloacae* could be identified in M-2 sample. Simultaneously, in the ADA and TCBS

⁵ Sliced raw fish

⁶ Little ball rice covered with raw fish

media were observed typical and atypical colonies of *Aeromonas* spp. and *Vibrio* spp., respectively. To identify atypical colonies (large, white and pasty) obtained in the ADA media in the M-1 and M-2 samples we applied gram staining and MALDI-TOF technique, allowed identify these colonies as *Candida krusei* (unicellular fungus). *K. oxytoca* was also identified in the M-2 sample isolated from ADA media also using the Gram stain and different biochemical tests including oxidase for *Enterobacteriaceae* family members, however this colony was identified as *C. krusei* by MALDI-TIF with 1,97 index. One atypical colony found in TCBS media was identified as *Staphylococcus saprophyticus* using MALDI-TOF, after we did Gram study and catalase test. Finally, for the identification of typical colonies grown in TCBS (M-1), we amplified *rpoD* gene of *Aeromonas* spp. using PCR technique and we sent to sequence the PCR product. RESULTS: We obtained counts of CFU/g from each sample for psychotropic and coliform aerobic bacteria and concluded that in general these counts do not exceeded the maximum levels established in European legislation, ensuring the hygienic quality of these food products. In addition, we didn't observed presence of *Aeromonas* spp. Although, two typical *Vibrio* spp. colonies were isolated from TCBS media and *rpoD* gene was amplified obtaining high quality genetic material extracted from these typical colonies. However, presence of *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus saprophyticus* and *Candida krusei* questioned the usefulness of ADA medium as direct selective and differential media for the enumeration of *Aeromonas* spp. in fresh and frozen tuna and salmon samples, and alerts the presence of these opportunistic pathogens that may be affect to immunocompromised patients.

Key words: ADA, tuna, *Candida*, frozen, raw, *Enterobacter*, *Klebsiella*, fish, psychotropic, salmon, *Staphylococcus*, TCBS, toxin-mediated infections.

1. Introducción

El pescado es considerado un alimento importante en la dieta europea, pudiéndose constatar un crecimiento sostenido superior al 20% desde el año 2011.^[1] Según detalla la FAO en su último informe sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura, en el año 2018 tanto la producción como el comercio y el consumo de pescado alcanzaron un récord histórico. Dicho informe destaca que el incremento del consumo global ha sido del 122% entre los años 1990 y el 2018, y prevé que para el año 2030 el consumo mundial será un 18% superior al del año 2018.^[2]

A nivel mundial, el pescado destinado al consumo humano directo, es decir, el pescado vivo, fresco o conservado mediante procesos de refrigeración, representó en el año 2018 un 44% del total del pescado consumido.^[2] Pese a que el pescado se considera un alimento “seguro” debido a la teórica esterilidad de los músculos del animal sano, es sabido que hay microorganismos presentes en las superficies de los mismos, como por ejemplo en la piel y las branquias, o también en órganos como el tracto digestivo, el riñón, el hígado y el bazo.^[1,3] No obstante, el pescado y otros productos de la pesca, en especial aquellos productos que van a ser consumidos crudos o con el mínimo tratamiento térmico, se ven asociados a brotes de enfermedades asociadas a bacterias patógenas, biotoxinas, histamina, virus y/o parásitos.^[1,3] Sin embargo, las bacterias son los agentes etiológicos más importantes involucrados en la mayoría de brotes de enteritis (inflamación intestinal) de origen alimentario.^[4] Consecuentemente, la contaminación bacteriana del pescado es el mayor problema al cual se enfrenta la industria alimentaria, debido a las graves consecuencias para la salud y a las fuertes pérdidas económicas que esto puede conllevar.^[6] Cualquier persona está expuesta a adquirir y desarrollar una enfermedad de origen alimentario, pero ciertos colectivos de la población como los neonatos, infantes, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas son especialmente vulnerables, pudiendo padecer la enfermedad en su forma más grave, llegando eventualmente en los casos más severos a producir su muerte.^[7]

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) como enfermedades, generalmente de naturaleza tóxica o infecciosa, originadas por agentes etiológicos que ingresan en el organismo gracias a la ingestión de alimentos contaminados por ellos.^[8] Las enfermedades alimentarias se clasifican en: infecciones, intoxicaciones y toxiinfecciones. La infección alimentaria bacteriana implica el ingreso de microorganismos viables (o de sus endosporas) con la ingesta del alimento contaminado, y su posterior multiplicación y acción lesiva local debida a la producción de enzimas o por la inyección de efectores intracelulares, con la ocasional diseminación del patógeno a otros órganos donde también ejercerá su acción deletérea. Cabe añadir, que para que se desarrolle una infección en el consumidor es necesario que el alimento contaminado contenga un número necesario de bacterias patógenas vivas; es decir, que se alcance la dosis infectiva.^[9] Sin embargo, para la mayoría de patógenos, la cuestión de la dosis infectiva mínima es un asunto complejo pues existen otros factores que pueden influir en ello como pertenecer a uno de los grupos especiales de riesgo nombrados anteriormente (pueden desarrollar una patología cuando se exponen a un número menor de microorganismos patógenos) o también ciertos factores fisiológicos como el grado de acidez gástrica, la flora intestinal y el estado inmunológico de la persona. Por otro lado, una intoxicación se produce por la presencia de una toxina en el alimento. Habitualmente, la

bacteria productora de la toxina no se encuentra viva al ingerirse el alimento, de modo que la enfermedad será debida, únicamente, a la ingesta de la toxina y su acción en el organismo.^[10] En cambio, una persona padece una toxiinfección alimentaria cuando la causa de la ETA es debida tanto a la bacteria como a la toxina bacteriana.^[11] Las principales bacterias implicadas en enfermedades de transmisión alimentaria son *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, y *Vibrio* spp.^[12,13]

Los patógenos más frecuentemente presentes en los productos de pesca que se comercializan en el estado español son bacterias formadoras de endosporas (*Clostridium botulinum*) y bacterias no esporuladas (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* spp. y *Yersinia enterocolitica*).^[14 15,16] Algunos de estos patógenos contaminan el alimento durante su procesado, ya sea por contacto directo con las manos de los manipuladores de alimentos previamente contaminadas, o bien por contacto con superficies contaminadas debido al procesamiento de otros alimentos de diferente naturaleza. Sin embargo, entre las bacterias autóctonas del pescado también encontramos algunas que son potencialmente patógenas para el ser humano, tales como las especies pertenecientes a los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*^[16,17,18], las cuales producen gastroenteritis. Dichas gastroenteritis pueden dar lugar a un espectro de afecciones muy diversas que pueden presentar desde cuadros clínicos leves o asintomáticos hasta cuadros severos.

1.1. *Aeromonas* spp.

El género *Aeromonas* pertenece a la familia *Aeromonadaceae* (Clase γ -Proteobacteria, división Proteobacteria), y las especies que componen el género se caracterizan por ser bacilos Gram negativos,^[19,20] suelen ser oxidasa y catalasa positivas, y tener la capacidad de transformar el nitrato en nitrito. Fermentan la glucosa por vía heterofermentativa y mayoritariamente son resistentes al factor vibriostático O/129. A pesar de ser considerados microorganismos autóctonos del medio acuático, han sido aislados con frecuencia en alimentos destinados al consumo humano, como los peces, dando lugar a toxiinfecciones.^[21,22,23] Algunas de las especies son consideradas patógenos emergentes, capaces de afectar tanto a individuos inmunodeprimidos como sanos.^[19,20,24]

La mayoría de las especies del género *Aeromonas* pueden clasificarse dentro de uno de los siguientes grupos en base a su temperatura de crecimiento: las psicrótrofas y las mesófilas. Las cepas psicrótrofas (crecimiento óptimo entre 25 °C-XXX) son alterantes de productos alimenticios frescos ricos en proteínas, como el pescado, y las cepas mesófilas (crecimiento óptimo entre 35-37 °C) son las responsables de diversas infecciones en humanos. Estas últimas en general son identificadas como *Aeromonas hydrophila*. Cabe mencionar que *A. hydrophila* sobrevive incluso a temperaturas de entre 2 y 10 °C^[19], y es capaz de multiplicarse en alimentos almacenados a 5 °C^[19,20,24], motivo por el cual puede ser aislada de alimentos refrigerados. Sin embargo, también se ha observado que algunas especies de *Aeromonas* pueden sobrevivir a temperaturas aún más bajas, entre 0 y -3°C. Otras de las especies patógenas para el ser humano son *Aeromonas caviae*, *Aeromonas sobria* y *Aeromonas veronii*, aunque estas no se aíslan tan frecuentemente como *A. hydrophila*.^[21] Este género bacteriano contiene especies capaces de sobrevivir en alimentos sometidos a vacío y en atmósferas modificadas. También son

relativamente tolerantes a la sal, pudiendo crecer a concentraciones de NaCl del 4% y en algunos casos de hasta del 6%. ^[21,24] Además, esta tolerancia a la sal se ve favorecida a las bajas temperaturas a las que se somete el alimento para su conservación, motivo por el cual la refrigeración no es un método efectivo para el control de las poblaciones de *Aeromonas* spp. en alimentos almacenados en frío. ^[24]

Las enteritis producidas por *Aeromonas* spp. son frecuentes y su distribución mundial es amplia, aunque su incidencia presenta una gran variabilidad geográfica, mostrando una correlación mayor en poblaciones con hábitos higiénicos deficientes. ^[21,24] Sin embargo, estas toxiinfecciones están infravaloradas ya que la presencia de estas bacterias no es rutinariamente investigada en los laboratorios y la mayoría de las veces ocurre que su aislamiento se realiza en medios de cultivos no específicos para patógenos no entéricos. En 2010, se vio que la presentación clínica relacionada principalmente con toxiinfecciones por *Aeromonas* spp. es la enteritis secretora acuosa, representando el 75-89% de los casos. ^[22] La causa de la toxiinfección es debida a la producción de múltiples factores de virulencia (hemolisinas, enterotoxinas, sistemas de secreción, etc.) que permiten la colonización, la invasión y la proliferación de la bacteria, dañando los tejidos del huésped y esquivando su respuesta inmune. ^[19,21,24] Los individuos con mayor riesgo de padecer toxiinfecciones por *Aeromonas* spp. son los niños, los ancianos y las personas inmunocomprometidas. ^[20,21,24] *Aeromonas* spp. también pueden llegar a producir septicemia, especialmente en pacientes inmunocomprometidos. La infección puede adquirirse por la ingesta de alimentos contaminados, a través heridas o también a través del agua contaminada, pudiendo producir infecciones extraintestinales: del sistema hepato-biliar, respiratorio, articular y/o óseo. ^[19,20,21,24] Especies de *Aeromonas* también se han visto involucradas en la producción de peritonitis bacteriana espontánea (PBE), complicación que ocurre en el 15% de los pacientes que padecen enfermedad cirrótica. ^[20,24]

En 2010-2011, el 4% de los casos de diarreas en España se debieron a *Aeromonas* spp., ^[20] mientras la proporción fue del 2% en el año 2003. ^[25] Este porcentaje asciende hasta el 68.8% de los casos en población pediátrica. Los niños padecen principalmente síntomas en forma aguda de diarrea acuosa con un leve aumento de la temperatura corporal, y los vómitos aparecen en menor frecuencia que en infecciones causadas por otras bacterias. ^[20] En los pacientes con enfermedades de base y/o inmunodepresión se ha visto que más del 80% de los infectados puede desarrollar una septicemia. ^[21,24] Además, el 20 % de las PBE fueron debidas a *Aeromonas* spp., un porcentaje mayor que el ocasionado por *E. coli* (7 %) y *Pseudomonas aeruginosa* (1.9 %). ^[21,24]

1.2. *Vibrio* spp.

El género *Vibrio* pertenece a la familia *Vibrionaceae* (Clase γ -Proteobacteria, división Proteobacteria). Las especies de este género se caracterizan por ser bacilos Gram negativos, cortos, rectos o curvados, tendiendo al pleomorfismo (pueden observarse formas cocobacilares e incluso cocoides). ^[26,27,28] Son facultativos y heterofermentadores, producen ácido, pero no gas, a partir de la glucosa. Se desarrollan mejor en condiciones alcalinas, en pH óptimo de 8-8.8. ^[26,27] La mayoría son oxidasa y catalasa positivos, sensibles al compuesto vibriostático O/129 y reducen los nitratos a nitritos. ^[27]

Es un género bacteriano nativo de hábitats marinos y fluviales, salobres, y estuarios, y sus poblaciones tienden a incrementarse de forma significativa cuando las aguas aumentan de temperatura,^[26,28] siendo su temperatura óptima de crecimiento entre 18 y 22 °C,^[26,27] y por lo tanto su presencia más frecuente en zonas con climas templados o tropicales.^[26,27] Sin embargo, algunas especies son capaces de crecer entre 0 y 4 °C, mientras que otras pueden crecer a temperaturas superiores a los 45 °C.^[27] Consecuentemente, la concentración de *Vibrio* spp. en las aguas superficiales, en pescado y marisco se correlaciona de forma directa con la estacionalidad, y es mayor entre abril y octubre.^[29] Las especies halófilas requieren para su crecimiento óptimo una concentración de NaCl superior al 1 %. Esta dependencia al ion sodio se debe a que dicho ion estimula el crecimiento de este género bacteriano.^[26]

El género *Vibrio* presenta una gran diversidad de especies, habiendo descritas un total de 87, de las cuales 12 son patógenas para los humanos.^[26,27,30] Nueve de sus especies están directamente relacionadas con causar toxiinfecciones alimentarias: *V. alginolyticus*, *V. carchariae*, *V. cholerae*, *V. cincinnatiensis*, *V. fluvialis*, *V. furnisii*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*^[31], siendo *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* las que causan el mayor. Los alimentos de los que se aíslan más frecuentemente sus especies, y asociados en mayor medida con los cuadros de toxiinfección, son los productos de origen marino poco ácidos (pescado, ostras, mejillones, camarones, almejas, etc.).^[28,29] Se estima que entre el 40 y el 60 % de los peces y mariscos comercializados en los supermercados contienen *Vibrio* spp., siendo *V. parahaemolyticus* la especie más común.^[29]

1.2.1. *Vibrio cholerae*

Esta especie es el principal agente etiológico de toxiinfecciones humanas, y la única especie capaz de ser transmitida horizontalmente (de persona a persona), siendo el ser humano su principal reservorio. Posee una elevada persistencia en el ambiente, la que puede verse favorecida gracias a un mecanismo que le permite permanecer viable pero no cultivable (VNC), un estado de latencia que le permite la supervivencia en condiciones adversas (tanto en concentración de nutrientes, como de temperatura, pH y salinidad), permitiendo que estas bacterias permanezcan activas a nivel metabólico, pero no en cuanto a su multiplicación. Cuando las condiciones medioambientales se vuelven favorables para su proliferación, las formas VCN revierten y vuelven a poseer capacidad patogénica y transmisibilidad. *Vibrio cholerae* presenta una gran diversidad antigénica, fundamentalmente en cuanto a su antígeno somático O (el polisacárido O que forma parte integral del lipopolisacárido, macromolécula constituyente de su pared celular). Así, los serotipos O1 y O139 de *V. cholerae* están implicados en la producción de epidemias de cólera. La elevada patogenicidad de las cepas pertenecientes a dichos serotipos es debida principalmente a la capacidad de producir la toxina colérica (TC), también conocida como colerágeno.^[26,29] La infección por parte de los serotipos O1/O139 comienza por la ingestión del alimento (o agua) contaminado, prosigue con la supervivencia de cierto número de células bacterianas en el tracto gastrointestinal a pesar de la extrema acidez del estómago y la acción de sus enzimas proteolíticas, y una vez arriba en el intestino delgado la bacteria se adhiere y lo coloniza gracias a los factores de adherencia de que dispone. Posteriormente, se lleva a cabo la producción de TC, la cual altera el transporte de iones de las células epiteliales intestinales, siendo este el fenómeno el desencadenante de la diarrea acuosa severa, tan característica del cólera, y la pérdida consecuente de electrolitos.^[29] Esto puede

conducir a una rápida y severa deshidratación, la que si no es tratada mediante la adecuada administración de agua y electrolitos puede conducir a la rápida muerte al paciente. Las heces líquidas presentan mucosidad y carecen de sangre, adquiriendo un aspecto de “agua de arroz”. Estas manifestaciones extremas ocurren en tan solo el 20 % de los enfermos infectados por *V. cholerae* O1/O139 productores de TC. Las toxiinfecciones causadas por el serotipo O1 acostumbran a ser más leves (pérdida del apetito, dolor abdominal, diarrea y vómitos) que las del serotipo O:139. Si el individuo no ha sido tratado con antibióticos, esta bacteria permanece en las heces durante 7-14 días después de que los síntomas hayan desaparecido ^[26,29]. La dosis infectiva varía entre 10^4 y 10^8 UFC, siendo mayor cuando la bacteria se ingiere con alimentos que cuando es ingerida mediante el consumo de agua. ^[30] Los alimentos de origen marino han sido identificados como vehículos de transmisión del cólera y, aunque *V. cholerae* es sensible al calor, hay estudios que demuestran cierta termorresistencia por parte de *V. cholerae* O1 en ciertos alimentos. ^[32]

1.2.2. *Vibrio parahaemolyticus*

El año 1950 en Osaka, Japón, se produjo la primera infección debida a *V. parahaemolyticus* que se vehiculizó a los individuos afectados a través del consumo de sardinas crudas contaminadas con la mencionada bacteria. A raíz de este hecho, su implicación en ETA ha sido realmente evaluada y *V. parahaemolyticus* aconteció como una de las especies más estudiadas del género *Vibrio*. ^[26,29]

Existe una gran variedad de estudios que demuestran que dicha bacteria se ha aislado del microbioma de los organismos que habitan en aguas saladas, los cuales son alimentos habituales incluidos en la dieta de los humanos, encontrándose en pescados, mariscos y moluscos. ^[26,27,29] Además hay que destacar que muchos de estos alimentos son consumidos crudos o poco cocinados por lo que a través de ellos *V. parahaemolyticus* se transmite a los consumidores y puede causar diversas infecciones. ^[26,27,29,30,32,33] Su presencia en el medio marino es mayor en los meses en que el agua del mar aumenta su temperatura por encima de los 15 °C, pudiendo llegar a alcanzar los 26 °C. ^[26,27] Estas temperaturas favorecen el crecimiento del patógeno hasta llegar a niveles alrededor de 10^6 UFC los cuales son capaces de causar la enfermedad en el huésped. ^[26,29,30] Contrariamente, si analizásemos muestras de alimentos durante los meses de enero y febrero estas carecerían, en general, de *V. parahaemolyticus*. ^[26,27] La proliferación de este patógeno en los alimentos marinos también se ve favorecida por sus condiciones inadecuadas de transporte y/o almacenaje en refrigeración. ^[29]

Cuando *V. parahaemolyticus* se desarrolla en condiciones óptimas produce dos hemolisinas a las que se asocia la virulencia de esta especie bacteriana: la hemolisina termoestable directa (TDH) y la hemolisina relacionada con la TDH (TRH). ^[32,34] La hemolisina TDH, también conocida como Kanagawa, es la hemolisina principalmente causante de la diarrea. No obstante, para que un individuo padezca infección por *V. parahaemolyticus* se requieren otros factores de virulencia: factores de colonización y capacidad de invasión celular. Así mismo, la infección produce mayormente un cuadro intestinal consistente en la presencia de diarrea y cólicos abdominales que pueden, o no, acompañarse de náuseas, vómitos, fiebre y cefaleas. ^[30] Si esta infección es severa se puede dar un síndrome disentérico con la aparición de sangre en las heces y fiebre elevada. Sin embargo, la forma más severa de esta infección es la septicemia que tiene

una mayor probabilidad de ocurrir en los individuos que sufren una o varias enfermedades que son consideradas factores de riesgo para desarrollar con mayor probabilidad este proceso de septicemia. Estos factores son las enfermedades crónicas tanto a nivel hepático o renal, la diabetes, una neoplasia o el fenómeno de reducción de la acidez gástrica denominado aclorhidria. Pese a la baja tasa de septicemia, los síntomas que se dan cuando esta se desarrolla son varios, pasando por fiebre, hipotensión, compromiso del estado general y escalofríos, pudiendo llegar a desarrollar sintomatología gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal), que ocurre de forma ocasional. Además, hay que mencionar que *V. parahaemolyticus* es capaz de ocasionar otro tipo de infección extraintestinal y la cual es aquella infección desarrollada a partir de las infecciones de heridas. ^[30,36]

En España, los casos y brotes de infección más importantes han ocurrido mayormente por *V. parahaemolyticus* como agente etiológico responsable de estas infecciones. El que probablemente fue el primer caso de infección por este microorganismo en España ocurrió en 1987 después de ingerir ostras crudas contaminadas por *V. parahaemolyticus*, provocando a los comensales una gastroenteritis aguda y febril. Dos años después, en 1989, se dio en Barcelona un brote infeccioso por el consumo de marisco fresco en distintos restaurantes de la ciudad. Ese mismo año, fueron descritos 4 casos más de infección tras la ingesta de marisco y pescado también crudos. Previo al inicio del segundo milenio, en 1999 se produjo en Galicia el que fue el brote de infección con mayor importancia en Europa, afectando a 64 personas que hubieron consumido ostras vivas en un mercado de Vigo. ^[34] Ya en 2000 se detectaron 40 casos de infección por *V. parahaemolyticus* en Galicia. El último brote registrado aconteció en Julio de 2004 cuando en una boda en A Coruña 80 personas sufrieron una infección por esta especie de *Vibrio* a posteriori de la ingesta de productos del mar crudos. ^[37]

1.2.3. *Vibrio vulnificus*

Este microorganismo es natural de aguas de estuarios y costas. ^[37,38,39,40,41] Puede causar gastroenteritis que inicia con vómitos repentinos, diarrea, fiebre y dolor abdominal cuando la infección es causada por *V. vulnificus* biotipo 1; grupo al que pertenecen las cepas patógenas que son vehiculizadas al individuo mediante alimentos marinos. ^[40] Esta infección puede causar septicemia, especialmente en pacientes inmunocomprometidos, ^[37,38,40] con una mortalidad superior al 50%. *Vibrio vulnificus* es la principal causa de muerte por consumo de marisco en EEUU, con aproximadamente 40 casos mortales cada año. Se han reportado brotes de infección por *V. vulnificus* también en Europa y Asia. Parece ser que las altas temperaturas del medio marino mejoran su resistencia a la presencia de una alta salinidad del medio, ^[41] hecho que justifica la presencia de *V. vulnificus* en aguas del mar Mediterráneo, poseedor de una salinidad considerada demasiado elevada para el desarrollo de este patógeno. ^[38]

El aumento de las infecciones ha sido común para todas las especies del género *Vibrio* y se está dando en todo el mundo. ^[41] En estudio previo estadounidense realizado en 2015 se mostró que ya entonces las concentraciones de *Vibrio* spp. eran superiores a las habituales para aquella época, factor que aumenta el riesgo de infección tanto por exposición al agua como a pescados y mariscos contaminados. ^[42,43,44] La prevalencia en agua de mar y productos de la pesca se ve incrementadas después catástrofes ambientales: huracanes, inundaciones, ciclones, fuertes vientos y precipitaciones, así como el efecto de El Niño; consecuencia del aumento de la

temperatura marina y el cambio en la distribución de la salinidad de mares y océanos.^[42] Además, en países industrializados, el uso de aguas residuales tratadas en hogar, industria y agricultura supone un riesgo mayor de infección por patógenos emergentes de *Vibrio* spp. Este hecho se constata mediante el hallazgo de *V. vulnificus* en muestras de agua residual, posiblemente contaminada por materia fecal.^[39]

Vibrio vulnificus es un patógeno humano grave, responsable de más del 95% de las muertes relacionadas con el consumo de marisco en Estados Unidos siendo ésta la tasa de mortalidad la más alta relacionada por el consumo de alimentos contaminados por un patógeno. Una revisión de 459 casos de EE.UU. reportados a la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) entre 1992 y 2007 reveló que el 51,6% de los pacientes infectados con *V. vulnificus* murieron. La mayoría de las infecciones se producen en hombres inmunocomprometidos, o pacientes con condiciones subyacentes que resulten en niveles elevados de hierro suero, principalmente cirrosis hepática asociada al alcohol. Los datos reportados por la Covi (*Cholera and Other Vibrio Information Service*) muestran 1 registro de 1872 casos de Infección por *V. vulnificus* los cuales 600 resultaron en fallecimiento en Estados Unidos durante 1988-2010. Además, el 85,6% de los casos de *V. vulnificus* reportados a la FDA entre 1992-2007 eran en hombres. Este porcentaje muestra que los hombres son 6 veces más propensos a sufrir estas infecciones en comparación con las mujeres. El estrógeno es el factor que puede explicar la diferencia en el número de casos por género, ya que esta hormona se ve implicada en la protección de las mujeres en verso la actividad endotóxica de *V. vulnificus*. Otra explicación contundente, puede derivarse de los datos epidemiológicos en la incidencia de cirrosis hepática que muestran una tasa desproporcionada de cirrosis en hombres infectados mayores de 40 años. Durante el desarrollo de la enfermedad crónica, los individuos afectados que presentaban unos niveles de hierro en sangre superiores al rango recomendado (hemocromatosis) mostraron una mayor proporción de infección por *V. parahaemolyticus*, pudiéndose establecer el elevado nivel de hierro en sangre como un factor de riesgo de padecer una infección por este patógeno.^[38,39] Son un grupo vulnerable los pacientes con niveles elevados de hierro en sangre (anemia falciforme, hepatitis crónica y hemocromatosis), debido a que la absorción de hierro por parte del huésped durante la invasión mediada por *V. vulnificus* mejora la citotoxicidad y virulencia de dicho patógeno. Esto explica que en los pacientes en los que su metabolismo mantiene una elevada cantidad de hierro libre en sangre sean más vulnerables a la infección por *V. vulnificus* y a padecer las formas más severas: sepsis y muerte.^[39] Así pues, la enfermedad hepática y una inmunosupresión aumentan en 80 veces la propensión a desarrollar septicemia en pacientes infectados por *V. vulnificus*.^[38,39] Se establecen de este modo como factores de riesgo las siguientes características: género masculino, edad superior a 25 años, anemia falciforme, patología hepática crónica, hemocromatosis y la Diabetes Mellitus.^[38]

La virulencia y citotoxicidad de *V. vulnificus* es debida a varios factores: polisacáridos de la cápsula del microorganismo, presencia de apéndices superficiales (pilis y flagelos), y la capacidad para el desarrollo de biofilms. Los polisacáridos le confieren a la célula patógena la resistencia frente al ataque ácido gástrico del huésped y conllevan a una mayor liberación de citoquinas: factor de necrosis tumoral (TNF correspondiendo a sus siglas en inglés), Interleuquina-6 (IL-6) e Interleuquina-8 (IL-8). Esta liberación de citoquinas, además de pirógenos, desencadenan un shock tóxico en el huésped. Este proceso se acompaña de la disfunción de neutrófilos y macrófagos, producida por los mismos polisacáridos capsulares, y los procesos de adhesión

celular y el desarrollo de biofilms facilitados por la acción de los apéndices superficiales; son también factores esenciales para la supervivencia ambiental de la bacteria.^[39]

2. Justificación

Resulta evidente que el número de gerontes en nuestra población (y la de otros muchos países) ha ido en constante incremento durante las últimas décadas. Esto se debe a la mejora de las condiciones socio-económicas, nutricionales e higiénico-sanitarias, las que han incrementado la esperanza de vida de la población hasta los actuales 83 años para el estado español (datos del 2018). No obstante, cabe mencionar que, asociado al incremento de la esperanza de vida, también ha aumentado la prevalencia de ciertas enfermedades e inmunodeficiencias, las que suponen un mayor riesgo para el individuo de padecer manifestaciones clínicas más graves debido a una infección o intoxicación alimentaria. Por lo tanto, resulta indispensable asegurar la inocuidad microbiológica y toxicológica de los productos alimenticios con el fin de minimizar el riesgo de la población a padecer infecciones y/o intoxicaciones alimentarias graves, sobre todo por parte de aquellos grupos de la población que presentan un mayor riesgo para su salud, como son los adultos mayores de 70 años, los infantes y los inmunodeprimidos. Por dicho motivo, y debido a la creciente demanda social por consumir pescado crudo, este alimento debe ser sometido a estrictos controles microbiológicos y toxicológicos, debido a que muchos de los microorganismos patógenos habitan o sobreviven con éxito en medios acuáticos y en los animales.

3. Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La calidad y seguridad microbiológica de los productos de la pesca destinados a su consumo en crudo es inferior a las normas descritas por la ley, superando el lindar de microorganismos presentes en estos que establecen los reglamentos del Ministerio de Sanidad y Consumo del Gobierno de España pudiendo así poner en riesgo la salud de los individuos inmunológicamente más susceptibles.

Objetivos

Objetivo principal

Evaluar la seguridad y la calidad microbiológica del salmón y del atún destinados a su consumo en crudo expendidos por las principales cadenas de supermercados de la ciudad de Reus (provincia de Tarragona).

Objetivos específicos

1. Conocer el grado de contaminación microbiana del atún y de salmón comercializados para su consumo en crudo mediante el recuento de la microbiota aerobia mesófila y psicrótrofa.

2. Estudiar la posibilidad de contaminación de estos alimentos durante el proceso de manipulación mediante el estudio de la presencia de coliformes totales y fecales
3. Determinar la presencia y grado de contaminación por microorganismos patógenos de origen marino como son *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. en muestras de atún y salmón comercializados para su consumo en crudo, mediante el aislamiento selectivo e identificación bioquímica y molecular de éstos en cada una de las muestras analizadas.

4. Material i métodos

4.1. Origen de las muestras

Se analizaron un total de 5 muestras (Tabla 1) de salmón y atún destinados a ser consumidos crudos. Las muestras fueron adquiridas el día 19 de abril de 2021 en diferentes supermercados de la ciudad de Reus, entre las 10:30 y 13:00 h AM, manteniéndose refrigeradas a 4 °C hasta su procesamiento a las 16:00 h del mismo día.

Tabla 1. Naturaleza de las muestras estudiadas en el presente trabajo

Muestra	Tipo de producto	Elaboración (fecha)	Establecimiento de compra
M-1	Sashimi de salmón	19/04/2021*	Puesto de comida A
M-2	Sashimi de atún	19/04/2021*	Puesto de comida A
M-3	Suprema de salmón congelado	26/01/2021	Supermercado A
M-4	Filete de atún congelado	02/12/2020	Supermercado A
M-5	Sashimi de salmón	19/04/2021*	Supermercado B

*Las muestras 1, 2 y 5 fueron descritas en el puesto de comida A y en el supermercado B como elaboradas frescas el mismo día de la venta.

4.2. Análisis de las muestras

4.2.1. Homogeneización de las muestras

Con la finalidad de detectar la presencia de microorganismos aerobios psicótrofos coliformes totales y fecales, *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp. se pesaron 25 g de cada muestra de alimento, se introdujeron en una bolsa de plástico estéril, se adicionaron 225 ml de agua peptonada tamponada al 0.1 % estéril, se cerró la bolsa con una “goma de pollo” excluyendo el aire, y se colocó dentro de un Stomacher® 400 Circulator, el que se hizo funcionar a 260 rpm durante 2 minutos. El último paso fue repetido (normalmente una o dos veces) hasta obtener una suspensión homogénea, libre de sólidos en suspensión.

4.2.2. Banco de diluciones

Para el análisis de la microbiota aerobia psicrótrofa se pipeteó 1 ml del homogenizado (dilución 10^{-1} o 1:10) y se añadió a un tubo con 9 ml de agua con peptona al 0.1% tamponada (dilución 10^{-2} o 1:100), y de este tubo se traspasó de nuevo 1 ml de la dilución 10^{-2} y se añadió a un tubo nuevo tubo con 9 ml de la misma solución tamponada (dilución 10^{-3}), repitiéndose el mismo proceso hasta obtener una dilución 10^{-6} y homogenizando cada tubo en cada toma de muestra con el vórtex durante unos segundos Para el análisis de bacterias coliformes totales y fecales,

Aeromonas spp. y *Vibrio* spp. se siguió el mismo proceso descrito anteriormente, pero en este caso sólo hasta alcanzar una dilución de 10^{-4} . Los tubos de ensayo se rotularon de acuerdo a la muestra de alimento (de M-1 a M-5) y el factor de dilución.

4.2.3. Análisis microbiológico

Recuento de microorganismos

Mediante una pipeta automática con puntas desechables azules se introdujo 1 ml de cada una de las diluciones dentro de placas de Petri estériles desechables de 90 mm de diámetro. Posteriormente se introdujeron aproximadamente 15 ml del medio de cultivo fundido a una temperatura de 50-55 °C (manteniendo el medio de cultivo fundido al horno microondas en un baño maría para evitar su gelificación). Dichas siembras se realizaron por duplicado. Para el estudio de microbiota aerobia mesófila y psicrótrofa se empleó agar de recuento en placa (ARP; Plate Count Agar; PCA); Chromocult® Coliform Agar (CCA) para cuantificar las bacterias coliformes totales (colonias color fucsia) y fecales (colonias azules); el agar con dextrina y ampicilina (ADA; Ampicilin Dextrin Agar) para cuantificar *Aeromonas* spp.; y para cuantificar las especies del género *Vibrio* el agar con tiosulfato, citrato, bilis y sacarosa (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar; TCBS). Una vez el medio de cultivo se solidificó a temperatura ambiente, las placas con medio ARP se incubaron a 25 °C durante 24 h para cuantificar la microbiota aerobia mesófila y a 15 °C durante 48 h para la microbiota aerobia psicrófila. Las placas con CCA, ADA y TCBS fueron incubadas a 36 ± 1 °C. El tiempo de incubación para las placas con CCA y ADA fue de 24 horas, y de 48 h para las placas con TCBS. Se cogieron las dos placas (réplicas 1 y 2 de cada muestra y cada medio de cultivo) de la misma dilución, y si el número de colonias estaba comprendido entre un mínimo de 30 y un máximo de 300, se realizó el recuento de colonias y se obtuvo su media aritmética, para finalmente multiplicar el resultado por el factor de dilución (la inversa de la dilución) y así obtener el número de UFC/g de alimento. Las placas con recuentos superiores a 300 colonias fueron clasificadas como incontables, y no fueron incluidas en el recuento.

Aislamiento en cultivo puro e Identificación presuntiva de las bacterias coliformes

A partir de las placas con CCA que tuvieron recuentos positivos para coliformes totales (colonias color fucsia) y/o fecales (colonias azules) se cogió mediante el asa de siembra masa bacteriana a partir de una de las colonias aisladas y se realizó una siembra por estría escocesa (o de triple estría) en placas con agar Müller Hinton (MH) para la obtención de cultivos puros, y fueron incubadas a 36 ± 1 °C durante 24 h. Las cepas de coliformes totales/fecales fueron preservadas en nuestra colección de cultivos microbianos resuspendiendo masa bacteriana de una cepa con 2 ml de glicerol 10 % p/v en solución Ringer, dentro de tubos de Eppendorf estériles. Posteriormente, los viales fueron almacenados en congelador a -80 °C. Todas las cepas fueron sometidas a la tinción de Gram, y a las pruebas de la (citocromo) oxidasa y de la catalasa. El resto de las pruebas bioquímicas a las que fueron sometidas las cepas se muestran en la Tabla 2. La incubación de las mismas se realizó a 36 ± 1 °C durante 24 h.

Tabla 2. Pruebas bioquímicas para la identificación presuntiva de las cepas de coliformes totales/fecales.

Prueba bioquímica	Técnica de inoculación	Incubación
SIM I	Picadura	36±1 °C / 24 h
KIA II	Picadura y estría en superficie	
LIA III	Estría en superficie	
Citrato de Simmons IV	Estría en superficie	
Ureasa de Christensen V	Estría en superficie	
Fenilalanina desaminasa VI	Estría en superficie	
BEA VII	Siembra en la placa por agotamiento de asa	

SIM = medio para evaluar la producción de ácido sulfhídrico (SH₂), indol y movilidad; KIA = Kliger Iron Agar; LIA = Lisina descarboxilasa; BEA = Bile Esculin Agar; ^I la presencia de indol se observa agregando tres gotas de reactivo de Kovacs y viendo la aparición de un anillo de coloración rojizo-fucsia; ^{II} fondo amarillo y pico de flauta rojo indica fermentación de glucosa / fondo y pico de flauta amarillo indica fermentación de glucosa y lactosa / fondo o todo el medio negruzco indica producción de SH₂ / puede haber producción de gas; ^{III} si el medio queda de color violeta la prueba se considera positiva, caso contrario vira el fondo al amarillo; ^{IV} el viraje del color verde al azul indica respiración aerobia del citrato; ^V el viraje del naranja muy pálido al color fucsia indica la hidrólisis de la urea; ^V la formación de ácido fenol pirúvico a partir de la fenilalanina se observa por la aparición una coloración verdosa luego de agregar unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 10%; ^{VI}. la aparición de una coloración negruzca indica la hidrólisis de la esculina ^{VII}.

Las cepas de coliformes totales/fecales se identificaron presuntivamente siguiendo los criterios establecidos por Farmer et al. (1985).

Aislamiento e identificación presuntiva de Aeromonas spp. y de Vibrio spp.

Las colonias típicas crecidas en ADA (presuntamente *Aeromonas* spp.) y en TCBS (*Vibrio* spp.) fueron procesadas en iguales condiciones que las coliformes totales/fecales con la finalidad de obtener cultivos puros, pero fueron incubadas a 30°C. Todas las cepas fueron sometidas a la tinción de Gram, y a las pruebas de la (citocromo) oxidasa y de la catalasa.

4.2.4. Caracterización molecular

Identificación molecular de las cepas bacterianas mediante Desorción/Ionización Laser Asistida por Matriz / Tiempo de Vuelo (MALDI-TOF)

Las cepas bacterianas aisladas del CCA, ADA y TCBS fueron analizadas mediante MALDI-TOF. El resultado de la ionización de las proteínas ribosomales debido a la acción de un láser de alta energía es como una “huella digital”, generando un perfil de fragmentos de las mismas con una masa y carga eléctrica variable que es (mayoritariamente) especie-específico, resultado así una herramienta muy útil en la identificación bacteriana. ^[50,51] Para obtener dicho espectro de masas se usó un MALDI Biotyper Preprocessing Standard Method 1.1., perteneciente al Área de Microbiología del Laboratorio Clínico ICS Camp de Tarragona-Terres de l'Ebre (Hospital Universitario Joan XXIII). La comparación entre el espectro de masas de la muestra problema (la cepa bacteriana) y los existentes en la base de datos del MALDI-TOF es traducida en una puntuación (score), la que se acompaña de un color. En dependencia de dicha puntuación

podemos definir la identificación como fiable a nivel de género o a nivel de especie. En la Tabla 3 se detalla la interpretación de la identificación realizada mediante el método MALDI-TOF. ^[42]

Tabla 3. Potenciales resultados de una identificación mediante MALDI-TOF.

Puntuación	Identificación	Símbolo	Color
2,300-3,000	Altamente probable a nivel de especie	+++	Verde
2,000-2,299	Seguro a nivel de género, probable a nivel de especie	++	Verde
1,700-1,999	Probable a nivel de género	+	Amarillo
0,000-1,699	No confiable	-	Rojo

*Extracción de ADN de las cepas de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*, amplificación del gen *rpoD* por PCR y secuenciación*

Las cepas de interés se sembraron mediante estría escocesa en placas de Petri con medio MH y se incubaron 24 h a 35 °C. La extracción de ADN se realizó resuspendiendo una colonia aislada en 1 ml de agua Milli-Q estéril en Eppendorf de 1'5 ml, se centrifugó por 3 minutos a 13.000 RPM, se eliminó el sobrenadante por decantación, y al pellet se le adicionó 150 µl de InstaGene™ Matrix (BioRad). Se homogenizó en vórtex y se depositó 20 minutos en el termobloque a 95 °C. Transcurrido dicho tiempo se volvieron a centrifugar las muestras nuevamente (en iguales condiciones) y el sobrenadante se transfirió mediante pipeteo a nuevos tubos Eppendorf para proceder a la cuantificación del ADN y evaluación de su grado de pureza y calidad mediante Nano drop (habría que poner la referencia del aparato). En el software Nano drop se seleccionó “medir ácidos nucleicos”, se limpió el sensor con un paño suave y se ajustó a “blanco” colocando 1 µl de agua Milli-Q estéril en el sensor. Una vez el software hubo calibrado el “blanco”, se limpió nuevamente el sensor, se cargó 1 µl de la muestra y se seleccionó la opción “prink” para hacer la medición de la concentración del ADN y su pureza (relación de densidad óptica a 260/280 nm, que debe estar entre los valores 1,80-2, siendo 2 el valor óptimo). Para amplificar el gen *rpoD* mediante PCR se preparó la Master Mix, colocando dentro de cada tubo Eppendorf con capacidad para 1,5 ml los reactivos “Emmerald”, agua estéril, el cebador *forward* y su *reverse* acorde a lo indicado en la Tabla 4.

Tabla 4. Cantidades de reactivos necesarios para preparar la Master Mix.

× 1 muestra	× 5 muestras + 1 control negativo
Emmerald: 12,5 µl	Emmerald: 75 µl
Agua: 9,5 µl	Agua: 57 µl
Cebador <i>forward</i> : 0,5 µl	Cebador <i>forward</i> : 3 µl
Cebador <i>reverse</i> : 0,5 µl	Cebador <i>reverse</i> : 3 µl

Dentro de cada tubo Eppendorf se introdujeron 23 µl de Master Mix y 2 µl de ADN. En el correspondiente al control negativo tan solo se introdujo los 23 µl de Master Mix. Los tubos se colocaron dentro del termociclador y se escogió el programa acorde con la amplificación del gen *rpoD*; las características de dicho programa se recogen en la Tabla 5. Mientras se iban desarrollando los ciclos de la PCR se preparó un gel de agarosa al 1% usando fue solución TAE 1X. Se pesó 1 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer y se añadieron 100 ml del buffer con el colorante, se llevó al horno microondas por 2 minutos a máxima potencia (900 w), y

posteriormente se siguió calentado la mezcla durante 20-30 segundos, removiéndose el contenido del matraz hasta que el agar se hubo disuelto en el TAE 1X y se dejó atemperar. A la solución se añadió 3 µl de RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution (colorante para teñir ADN) (IntRON Biotechnology) y se homogeneizó mediante movimientos rotacionales suaves. La agarosa se vertió en el molde y se dejó solidificar durante 20 minutos. Una vez se hubo solidificado el gel, se colocó en la cubeta de electroforesis, se cargaron 5 µl del marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb y en los pocillos siguientes se cargaron 5 µl de cada uno de los productos de PCR amplificados. El gel se hizo correr a 90 voltios durante 40 minutos. Finalmente, las bandas correspondientes a los amplicones fueron “visualizadas” a través del transluminador Gel Doc™ XR+ (a una longitud de onda de 254-365 nm) y procesadas mediante el software “Image Lab”.

Tabla 5. Programa de amplificación diseñado para el ensayo inicial de PCR para la detección del gen *rpoD* en muestras de pescado.

Paso	Tiempo (min.)	Temperatura (°C)	Nº Ciclo
Desnaturalización inicial	5	94	1
Desnaturalización	1	94	30
Hibridación	1	55	
Elongación	1	72	
Elongación final	10	72	
Desnaturalización inicial	5	94	1

Identificación las cepas de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*

En el caso en que las bandas de ADN obtenidas durante la electroforesis en gel de agarosa correspondieran al tamaño esperado del amplicón, se añadieron 5 µl de agua Milli-Q estéril y 15 µl del amplicón aun Eppendorf de 1'5 ml, junto con 20µl de primer *rpoD* FS, para su envío a secuenciar en Macrogen Europa (Macrogen, Amsterdam, Holanda). Las secuencias de consenso se obtuvieron mediante el SeqMan software v. 7 (DNASTar Lasergene, Madison, WI, USA). La identificación molecular preliminar de las cepas se llevó a cabo usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y solo las secuencias de cepas tipo o de referencia confiables en el GenBank fueron empleadas para la identificación, y se utilizó un nivel máximo de identidad (MLI) de $\geq 98\%$ para la identificación en el rango de especies y $< 98\%$ en el rango de género.

5. Resultados

Transcurridas las 24 h de incubación en las condiciones previamente descritas, se obtuvo crecimiento microbiano en CCA y ADA, mientras que las placas de ARP (25 °C) no mostraron crecimiento alguno. En CCA se observó la morfología colonial típica de los coliformes totales (coloración fucsia). En las placas con medio ADA se evidenció la presencia de colonias de morfología correspondiente a *Aeromonas* spp. (circulares, de color amarillo y con un halo amarillento alrededor). Sin embargo, en el medio ADA también se detectó colonias blancas con textura mucosa. Finalizadas las 48 h de incubación se observó crecimiento en las placas con medio TCBS, cuyas colonias presentaron la morfología típica de bacterias del género *Vibrio*,

mientras que en las placas con medio ARP (15 °C) se observó crecimiento en todas las muestras, a excepción de la M-4. El resultado del recuento en los diferentes medios de cultivo se detalla en las Tablas 6 y 7.

Tabla 6. Número de UFC para los distintos medios de cultivo y diluciones.

Medio de cultivo	Muestra									
	M-1		M-2		M-3		M-4		M-5	
Chromocult®	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2
10 ⁻¹	I	I	I	I	-	-	-	-	-	-
10 ⁻²	4	34	66	67	-	-	-	-	-	-
10 ⁻³	4	4	3	11	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁴	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
ADA	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2
10 ⁻¹	I	I	I	I	4	5	-	-	-	-
10 ⁻²	56	65	31	30	-	-	-	-	-	-
10 ⁻³	4	7	3	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2
10 ⁻¹	6	7	1	I	1	-	-	-	1	-
10 ⁻²	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARP 15°C	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2	R. 1	R. 2
10 ⁻¹	I	I	I	I	I	I	-	-	-	-
10 ⁻²	I	I	I	I	I	I	-	-	-	-
10 ⁻³	>200	>200	I	I	114	186	-	-	7	9
10 ⁻⁴	145	169	I	I	-	-	-	-	-	-
10 ⁻⁵	-	-	119	130	-	-	-	-	-	-

ADA = Agar con dextrina y ampicilina (*Ampicillin Dextrin Agar*); ARP = agar para recuento en placa (*Plate Count Agar*); CCA = *Chromocult® Coliform Agar*; TCBS = agar con tiosulfato citrato bilis y sacarosa (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*); R1 = réplica 1; R2 = réplica 2; I = incontables (> 300 UFC); - = ausencia; M-1 = sashimi de salmón/supermercado A; M-2 = sashimi de atún/supermercado A; M-3 = suprema de salmón congelado/supermercado B; M-4 = filete de atún congelado/supermercado B; M-5 = sashimi de salmón/supermercado C.

Tabla 7. Cálculo del recuento para las diferentes diluciones y duplicados.

Medio de cultivo	Muestra	Dilución	Nº colonias		Fórmula	UFC/g
			Rep. 1	Rep. 2		
CCA	M-1	10 ⁻³	4	4	$\frac{4+4}{2} \cdot 10^3$	4·10 ³ UFC/g
	M-2	10 ⁻²	66	67	$\frac{66+67}{2} \cdot 10^2$	6.650 UFC/g
ADA	M-1	10 ⁻²	56	65	$\frac{56+65}{2} \cdot 10^2$	6.050 UFC/g
	M-2	10 ⁻²	31	30	$\frac{31+30}{2} \cdot 10^2$	3.050 UFC/g
	M-3	10 ⁻¹	4	5	$\frac{4+5}{2} \cdot 10$	45 UFC/g
TCBS	M-1	10 ⁻¹	6	7	$\frac{6+7}{2} \cdot 10$	65 UFC/g
ARP	M-1	10 ⁻⁴	145	169	$\frac{145+169}{2} \cdot 10^4$	1,57·10 ⁶ UFC/g
	M-2	10 ⁻⁵	119	130	$\frac{119+130}{2} \cdot 10^5$	12,45·10 ⁶ UFC/g
	M-3	10 ⁻³	114	186	$\frac{114+186}{2} \cdot 10^3$	15·10 ⁴ UFC/g

	M-4	10^{-3}	7	9	$\frac{7+9}{2} \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3$ UFC/g
--	-----	-----------	---	---	----------------------------	----------------------

ADA = Agar Ampicilina Dextrina (*Ampicillin Dextrin Agar*); ARP = Agar de Recuento en Placa (*Plate Count Agar*); TCBS = agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*); R. 1 = réplica 1; R. 2 = réplica 2; UFC/ml = unidades formadoras de colonias por gramo.

Un número representativo de colonias típicas crecidas en ADA y TCBS, correspondientes teóricamente a *Aeromonas* spp. y *Vibrio* spp., respectivamente, se sembraron en medio *Tryptone Salt Agar* (TSA), mientras que las de los coliformes totales fueron sembradas en agar Müller Hinton (MH).

Las pruebas bioquímicas realizadas para identificar presuntivamente las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (aisladas a partir del medio CCA) revelaron que cuatro cepas representativas designadas como CCA-a, CCA-c y CCA-d pertenecían al taxón *Klebsiella oxytoca*. La cepa CCA-b no pudo ser identificada presuntivamente, dado que dicha cepa falló en hidrolizar la esculina en BEA, fue lisina descarboxilasa negativa y no produjo indol en el medio SIM. En la Tabla 8 se muestran los resultados de los estudios bioquímicos realizados a las diferentes cepas.

Tabla 8. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a las cepas de la familia *Enterobacteriaceae*.

Prueba bioquímica		Cepas			
		CCA-a	CCA-b	CCA-c	CCA-d
TSI	H ₂ S	-	-	-	-
	Fermentación	A/A	A/A	A/A	A/A
SIM	H ₂ S	-	-	-	-
	Indol	+	-	+	+
	Movilidad	-	-	-	-
Asimilación del citrato		+	+	+	+
Fenilalanina desaminasa		-	-	-	-
Ureasa		+	+	+	+
Lisina descarboxilasa		+	-	+	+
BEA c/h		+/+	+/-	+/+	+/+

BEA = agar bilis esculina (*Bile Esculin Agar*); SIM = medio para determinación de ácido sulfhídrico, indol y movilidad (*Sulfide Indole Motility*); TSI = agar con hierro y tres azúcares (*Triple Sugar Iron*); H₂S = ácido sulfhídrico; A/A = fondo ácido, pico de flauta ácido; c/h = crecimiento/hidrólisis de la esculina.

Figura 1. Resultados de las pruebas bioquímicas para la identificación de las cepas de coliformes totales CCA-a, CCA-c y CCA-d (izquierda) y la CCA-b (derecha).

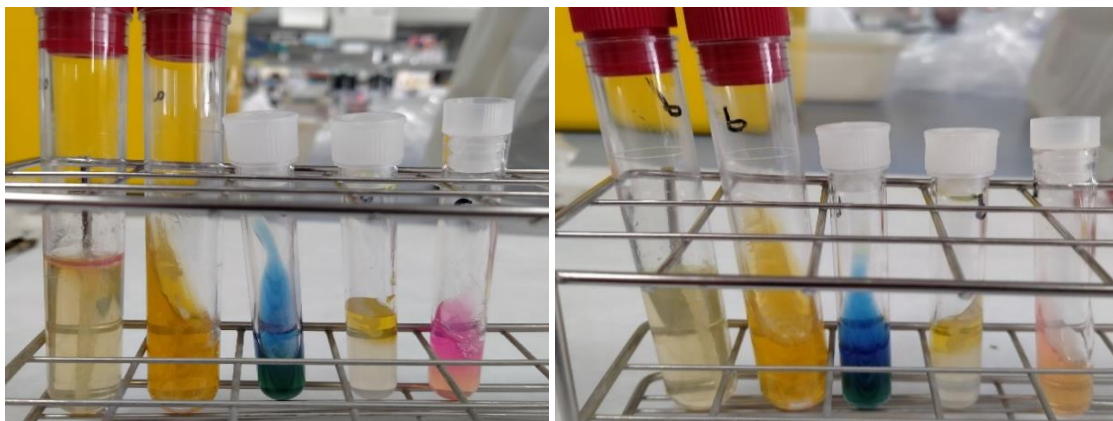
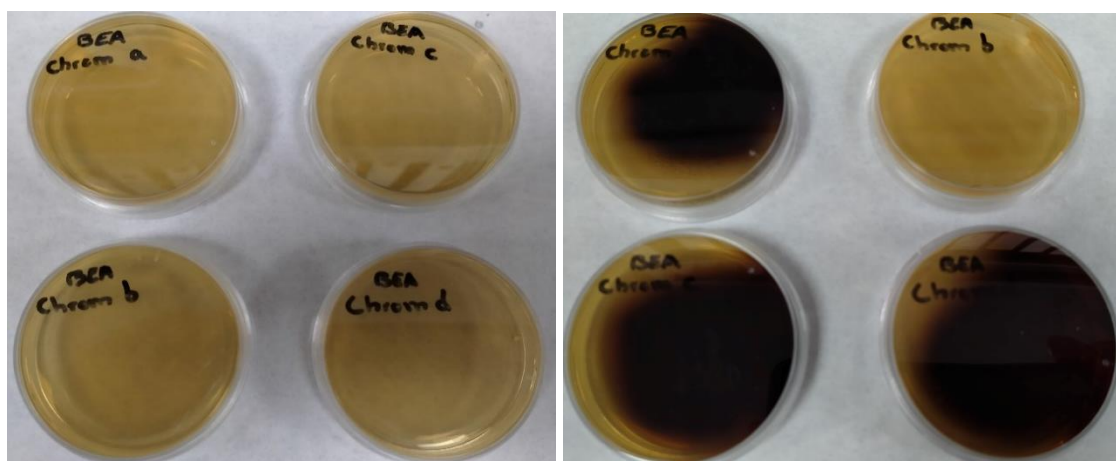
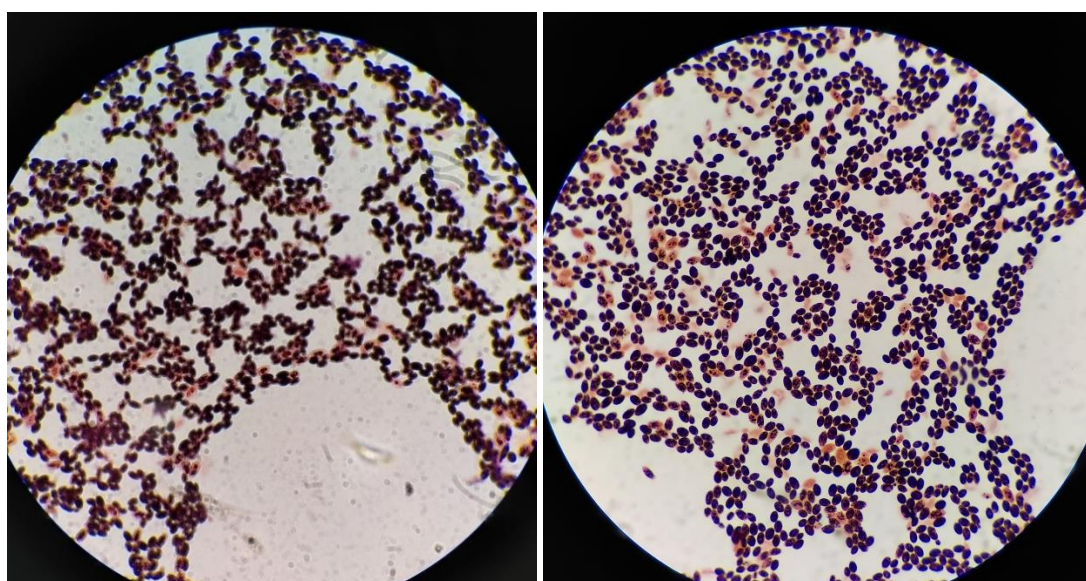


Figura 2. Resultados de la hidrólisis de la esculina en BEA por las cepas de coliformes totales antes (izquierda) y después de la incubación (derecha).



Dos de las cepas aisladas de ADA (ADA-1 y ADA-2), que correspondían a colonias blancas relativamente grandes, resultaron ser una levadura a la coloración de Gram (Figura 3).

Figuras 3. Observación de las cepas ADA-1 y ADA-2 al microscopio de campo claro coloreadas con Gram.



El resultado de la identificación mediante MALDI-TOF para dichas cepas fue *Candida krusei*. La cepa ADA-3 resultó ser un bacilo Gramnegativo, por lo que no pudo darse como válida la identificación obtenida por MALDI-TOF, que correspondía a *Staphylococcus saprophyticus*. Por dicho motivo, se decidió someterla a pruebas bioquímicas para miembros de la familia Enterobacteriaceae, luego de que la prueba para la (citocromo) oxidasa diera negativa. El resultado de dichas pruebas (Tabla 9) permitió finalmente identificar a la cepa ADA-3 como *Enterobacter cloacae*.

Tabla 9. Resultados del banco de pruebas bioquímicas efectuados a la cepa ADA-3.

	Prueba bioquímica	Resultado (+ = positivo / - = negativo)
KIA	Fermentación de la glucosa	+
	Fermentación de la lactosa	+
	Producción de SH ₂	-
	Producción de gas	+
LIA	Producción de SH ₂	-
	Descarboxilación de la lisina	+
	Desaminación de la fenilalanina	-
SIM	Producción de SH ₂	-
	Producción de indol	+
	Movilidad	-
TSI	Fermentación de la glucosa	+
	Producción de gas	+
	Fermentación de sacarosa y lactosa	+
	Producción de SH ₂	-
	Citrato de Simmons	+
	Ureasa	+
	Fenilalanina desaminasa	-
	Hidrólisis de la esculina	+

La cepa que mostró un crecimiento colonial atípico en el medio de cultivo TCBS, TCBS-3, se mostró al Gram como un coco Gram positivo, siendo identificado al MALDI-TOF como *Staphylococcus saprophyticus*. A partir de las cepas TCBS-2 y TCBS-3 identificadas como bacilos Gram negativos y provenientes de colonias típicas de *Vibrio* spp. en dicho medio, se realizó la extracción de su ADN y se amplificó el gen *rpoD*. Hasta el momento de la elaboración del presente trabajo se está a la espera recibir la secuencia nucleotídica de dicho gen para su estudio filogenético definitivo. No obstante, el gen *rpoD* se amplificó con gran calidad a partir del material genético que fue extraído de dichas colonias, pudiendo concluir que posiblemente nos hallemos ante crecimiento de *Vibrio* sp.

6. Discusión y conclusiones

Según las directrices establecidas en el REGLAMENTO (CE) nº 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativas a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, el número máximo de UFC/g de enterobacterias permitido en los productos de pesca frescos, salpseudados, refrigerados y congelados debe ser de 10³UFC/g. ^[53] En nuestro estudio, pudimos observar que el número de UFC/g determinado para las enterobacterias aisladas en los medios CCA y ADA (muestra M-1 y M-2 fue superior al límite permitido por la legislación (10³ UFC/g) . Esto supone un problema de salud pública, puesto que el número de UFC/g sobrepasa el valor establecido por las autoridades y podría desarrollar ciertas infecciones con un amplio rango de gravedad en aquellas personas con el sistema inmunitario deprimido, como se comentó anteriormente en el apartado 1 (Introducción). La FAO, referenciando al plan de muestreo y los límites microbiológicos recomendados para los productos pesqueros, recoge que en el pescado fresco y congelado el límite establecido para las bacterias aerobias es de 5·10⁵-10⁷ UFC/g. ^[15] Este dato nos permite establecer que la densidad microbiana de la muestra

M-2 se encuentra dentro de la normativa higiénica establecida. Resultados similares se obtuvieron durante la realización de un trabajo de la Universidad de Jaén donde se evidenció una carga de microbiota aerobia en merluza fresca de 10^7 UFC/g. ^[54] A partir de los resultados del presente trabajo pudimos comprobar que todas las muestras procedentes de los tres supermercados estudiados fueron seguras en cuanto al recuento de este grupo de microorganismos, pues no se presentó crecimiento alguno en las placas con medio de cultivo ARP incubadas en las condiciones favorables para crecimiento de bacterias mesófilas. Sin embargo, si se observó presencia de microbiota aerobia psicotrófica en todas las muestras, excepto en la M-4. No obstante, a pesar de los recuentos obtenidos el número de UFC/g se mantuvo dentro del rango establecido por las autoridades sanitarias ^[53] por lo que podemos determinar que las muestras analizadas no presentan contaminación por microorganismos psicotróficos y son seguras a nivel microbiológico.

En la muestra M-3 (supremas de salmón congelado) se obtuvo solamente el crecimiento de una colonia bacteriana en el medio TCBS determinando posteriormente que dicha colonia correspondía a *Staphylococcus saprophyticus*. Pese al bajo recuento de *S. saprophyticus* en la muestra, esto podría suponer un riesgo para la población si la cepa identificada fuera una cepa resistente a antibióticos. Este hecho se pone de manifiesto en el estudio realizado por Lee J-H. et al. de la Universidad de Corea que evidenció la posibilidad de transmisión a los alimentos de cepas pertenecientes al filo *S. saprophyticus* resistentes a antibióticos. ^[55] Chajęcka-Wierchowska W. et al., en su estudio publicado el año 2014 aislaron *S. saprophyticus* de comida lista para el consumo, pero no pudieron reportar como contaminadas las muestras contaminadas con *Staphylococcus* no pertenecientes a la especie *S. aureus*, pues la legislación solo contempla niveles máximos de *S. aureus*. Sin embargo, existen estudios en los que se establece que los estafilococos coagulasa-negativos, como es *S. saprophyticus*, se asocian comúnmente a los alimentos. ^[56] Si tenemos en cuenta estos datos y el poco crecimiento obtenido en placa de esta bacteria (1 sola colonia en una única réplica), podemos establecer que el producto del que se aisló dicho microorganismo es seguro a nivel de calidad microbiológica.

Candida krusei, levadura identificada en las muestras M-1 y M-2, hace referencia al nombre de la forma asexual de *Pichia kudriavtsevi* (anteriormente *Issatchenkia orientalis*). ^[57] Es una levadura que habita la membrana mucosa de individuos sanos, no obstante, puede causar infecciones (candidiasis) potencialmente mortales cuando los hongos infectan órganos profundamente arraigados, en pacientes inmunodeprimidos, pacientes con neoplasia hematológica e individuos que permanecen en tratamiento profiláctico prolongado con antibióticos azoles, como el fluconazol ya que éstos pueden desarrollar resistencias frente a dichos antifúngicos. ^[57,58,59] La identificación de *C. krusei* debería alertarnos sobre la calidad higiénica y microbiológica de dichas muestras de pescado y de la mala manipulación de dicho alimento. Este patógeno emergente supone una amenaza para la salud pública por su resistencia intrínseca al fármaco fluconazol y su rápida capacidad de desarrollar una resistencia cruzada con otros fármacos antimicóticos. ^[59]

Otros autores han aislado e identificado enterobacterias en muestras procedentes a diferentes tipos de alimentos. En el estudio realizado por Nyenje ME et al., donde se avaluó la calidad microbiológica de varios alimentos preparados para vender en Alice (Sudáfrica) fue aislada *Klebsiella oxytoca* en el 8% del total de las muestras analizadas. Hay que destacar que estas

muestras de alimentos no incluyeron pescado y se centraron, principalmente, en muestras procedentes a alimentos de origen animales como el pollo o la carne de res. ^[60] No obstante, en 1994 López-Sabater et al. realizó un estudio sobre la calidad bacteriológica del atún destinado al enlatado y pudieron aislar bacterias Gramnegativas formadoras de histamina, la mayoría pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, entre las cuales se encontraba *K. Oxytoca*. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el presente estudio donde pudimos aislar a partir de las muestras M-1 y M-2 dicho microorganismo (sashimi de salmón y sashimi de atún, respectivamente). También se identificó *Enterobacter cloacae* (enterobacteria identificada en la muestra M-2, perteneciente a sashimi de atún); el cual es un microorganismo aislado con frecuencia e identificado como formador de histamina débil del atún. ^[61] El recuento de enterobacterias en las placas con medios de cultivo CCA con un valor de UFC/g de 10^3 indica que no hay contaminación microbiana en las muestras y que estas son seguras para su consumo. ^[53] Sin embargo, *K. oxytoca* (bacilo Gramnegativo oblicuo en el ambiente) es bien conocido por ser un patógeno oportunista que ataca a pacientes inmunodeprimidos y dada la amplia resistencia de esta bacteria a los antibióticos, las infecciones en estos pacientes pueden ser fatales. ^[62,63]

A partir de la evaluación realizada y expuesta en el presente trabajo, se considera que la presencia de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (patógenos oportunistas), aisladas a partir de las muestras M-1 y M-2 (*Candida krusei*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*) y estafilococos coagulasa-negativos (*Staphylococcus saprophyticus*) a partir de la muestra M-3 podemos concluir que dicha presencia bacteriana en los muestras de pescados analizadas puede deberse a un deficiente proceso de lavado y desinfección de los medios y utensilios utilizados para el procesamiento de los alimentos y/o las superficies de contacto con estos alimentos, y/o a una inadecuada higiene por parte del manipulados de alimentos.

7. Bibliografía

- 1) Novoslavskij, A., Terentjeva, M., Eizenberga, I. et al. Major foodborne pathogens in fish and fish products: a review. Ann Microbiol [Internet]. 2016; 66, 1–15. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1102-5>
- 2) FAO. 2020. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción*. Roma. Disponible en: <https://doi.org/10.4060/ca9229es>
- 3) Galaviz-Silva, L., Gómez-Anduro, G., Molina-Garza, Z. J., & Ascencio-Valle, F. (2009). Food safety Issues and the microbiology of fish and shellfish. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons.
- 4) Mostert M.A., Holah, J. y Levievel, H.L. 2005. Handbook of hygiene control in the food industry. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, Cambridge, Reino Unido.
- 5) International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2004. Microorganismos de los alimentos. Acribia. Zaragoza, España.
- 6) Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M. y Fraille, C. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26, 421-431.
- 7) USDA. 2011. Fact Sheets: Foodborne Illness: What Consumers Need to Know. USDA. Disponible en: https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/foodborne-illness-and-disease/foodborne-illness-what-consumers-need-to-know/ct_index

- 8) WHO. 2007. Fact sheet Nº237: Food safety and foodborne illness. Disponible en: https://foodhygiene2010.files.wordpress.com/2010/06/who-food_safety_fact-sheet.pdf
- 9) W. C. Frazier, D. C. Westhoff. Microbiología de los alimentos. 4ª ed. Zaragoza: Acribia; 1993.
- 10) Michael T. Madigan. Brock. Biología de los Microorganismos. 10ª Edición. Madrid: Pearson; 2003.
- 11) Convet [Internet]. Corregidor Escofet, 83-85 Lleida 25005. Convet, S.L. 2020. Seguridad Alimentaria; enfermedades de transmisión alimentaria. Disponible en: <https://convet.net/enfermedades-transmision-alimentarias/>
- 12) Food and Drug Administration. Guidance for the Industry: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, Fourth Edition [Internet]. Gainesville: FDA; 2020. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/80637/download>
- 13) Alianza Nacional de HACCP para Pescados y Mariscos. Análisis de peligros y puntos críticos de control Programa de capacitación, 6.th edición [Internet]. Gainesville; SHA; 2018. Disponible en: https://www.flseagrant.org/wp-content/uploads/SGR-134_web.pdf
- 14) Kim, H., Hong, Y., Jo, J., Ha, S., Kim, S., Lee, H. and Rhee, M. Raw ready-to-eat seafood safety: microbiological quality of the various seafood species available in fishery, hyper and online markets. Lett Appl Microbiol [Internet]. 2017; 64(1): 27-34. <https://doi.org/10.1111/lam.12688>
- 15) Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Mapa de peligros alimentarios [Internet]. Barcelona: ACSA-DCAA (UAB); 2019. Disponible en <https://mapaperills.uab.cat/#>
- 16) Huss, H.H. Aseguramiento de la calidad de los productos pesqueros. *FAO Documento Técnico de Pesca*. No. 334. Roma, FAO. 1997. 174p
- 17) Universidad de León. Guía de Prácticas de Higiene y Control Microbiológico en las Industrias Agroalimentarias [Internet]. León: Universidad de León; 2013. Disponible en: https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/3051/manual_practicas_Edicion2013.0.pdf
- 18) Universidad de Santander. Manual de prácticas de laboratorio. Control y seguridad alimentaria [Internet]. Santander: UDES; 2011. Disponible en: <http://service.udes.edu.co/modulos/documentos/karenmartinez/MANUALDELABORATORIOUDES..pdf>
- 19) Fernández-Bravo A, Figueras MJ. An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms*. [Internet]. 2020; 8(1):129. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022790/>
- 20) M. J. Figueras, A. J. Horneman, A. Martinez-Murcia, J. Guarro. Controversial data on the association of *Aeromonas* with diarrhoea in a recent Hong Kong study. *JMM*. [Internet]. 2007; 56(7):996-998. Disponible en: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.47062-0>
- 21) Fernández-Bravo A. Epidemiology and pathogenic characterization of species of the genus *Aeromonas* [TESIS EN Internet]. Reus: Universitat Rovira i Virgili; 2019]. Disponible en: <https://www.tdx.cat/handle/10803/667146#page=1>
- 22) Janda JM, Abbott SL. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clin Microbiol Rev*. [Internet]. 2010; 23:35-73. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2806660/>

- 23) Teunis P, Figueras MJ. Reassessment of the Enteropathogenicity of Mesophilic *Aeromonas* Species. *Front Microbiol.* [Internet]. 2016; 7:1395. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.01395/full>
- 24) Fadua Leila Latif Eugén. *Aeromonas*, un microorganismo ambiental de importancia en salud humana y animal [tesis en Internet]. Reus: Universitat Rovira i Virgili; 2015. Disponible en: [https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/334686/Tesi%20Fadua.pdf?sequence=1&isAllowed=\\$=Sy](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/334686/Tesi%20Fadua.pdf?sequence=1&isAllowed=$=Sy)
- 25) Vila J, Ruiz J, Gallardo F, et al. *Aeromonas* spp. and traveler's diarrhea: clinical features and antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* [Internet]. 2003; 9(5):552-555. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2972757/>
- 26) Rodríguez Castro AM. Origen, distribución y caracterización de *vibrios* patógenos humanos en el medio ambiente marino de Galicia [tesis]. Santiago de Compostela: Universidad de Santiago de Compostela; 2012.
- 27) Cañigral Cárcel I. Desarrollo de métodos moleculares para la detección y caracterización de bacterias patógenas emergentes del género *Vibrio* en aguas y alimentos [tesis en Internet]. Valencia: Universitat Politècnica de València; 2011. Disponible en: <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/11799/Tesis%20Irene%20Ca%C3%B1igral%20C%C3%A1rcel.pdf?sequence=11&isAllowed=y>
- 28) Soto Varela Z., Pérez Lavalle L., Estrada Alvarado D. Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia [Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at colombia]. *Salud Uninorte.* [Internet]. 2016; 32 (1): 105-122. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/sun/v32n1/v32n1a10.pdf>
- 29) Montville, TJ., Matthews, KR. *Microbiología de los alimentos. Introducción.* 1ª ed. Zaragoza: Acribia S.A.; 2009
- 30) D. A. A. Mossel, B. Moreno y C. B. Struijk. *Microbiología de los alimentos.* 2ª ed. Zaragoza: Acribia S. A.; 2006
- 31) Leyva Castillo V, Puig Peña Y, Espino Hernández M, et al. Especies patógenas de *Vibrio* asiladas en alimentos de origen marino. *RCAN.* [Internet]. 2013; 23 (1): 31-43. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubalnut/can-2013/can131d.pdf>
- 32) Chintagari S., Hazard N., Edwards G., Jadeja R., Janes M. Risks Associated with Fish and Seafood. *Microbiol Spectrum.* [Internet]. 2017; 5 (1): 1-13. Disponible en: <https://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.PFS-0013-2016>
- 33) Lozano-León A., Torres J., Osorio C.R., Martínez-Urtaza J. Identification of *tdh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters.* [Internet]. 2003; 226(2):281–284. Disponible en: <https://academic.oup.com/femsle/article/226/2/281/578667>
- 34) DePaola A, Nordstrom JL, Bowers JC, Wells JG, Cook DW. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Appl Environ Microbiol.* [Internet]. 2003; 69 (3): 1521-1526. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC150055/>
- 35) Paris M., Enrique, 2005. Intoxicación por *Vibrio parahaemolyticus*. *Cuad. Med. Soc.* 2005; 45:43-47

- 36) Martínez-Urtaza J, Simental L, Velasco D, et al. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe. *Emerg Infect Dis*. [Internet]. 2005; 11 (8): 1319-1320. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3320470/>
- 37) Cañigral I, Moreno Y, Alonso J.L., et al. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiological Research*. [Internet]. 2010 [citado 25 feb 2021]; 165 (8): 657-664. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501309001153?via%3Dihub>
- 38) Baker-Austin, C. and Oliver, J.D. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. *Environ Microbiol*. [Internet]. 2018; 20: 423-430. Disponible en: <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1462-2920.13955>
- 39) Haftel A. *Vibrio vulnificus*. *StatPearls*. [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554404/>
- 40) Biosca EG, Amaro C. Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity. *Appl Environ Microbiol*. [Internet]. 1996; 62 (7): 2331-2337. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC168013/>
- 41) Froelich, B. A., Daines D. A. In hot water: effects of climate change on *Vibrio*–human interactions. *Environ Microbiol*, [Internet]. 2020; 22: 4101-4111. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14967>
- 42) Froelich BA, Ayrapetyan M, Fowler P, Oliver JD, Noble RT. Development of a matrix tool for the prediction of *Vibrio* species in oysters harvested from North Carolina. *Appl Environ Microbiol*. [Internet] 2015; 81 (3): 1111-1119. <https://doi.org/10.1128/AEM.03206-14>
- 43) Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: Disease and Pathogenesis. *Infection and Immunity*. [Internet]. 2009; 77 (5): 1723-1733. Disponible en: <https://iai.asm.org/content/77/5/1723>
- 44) Hernández-Cabanyero C, Sanjuán E, Fouz B, et al. The Effect of the Environmental Temperature on the Adaptation to Host in the Zoonotic Pathogen *Vibrio vulnificus*. *Front Microbiol*. [Internet]. 2020; 11: 489. Disponible en <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00489>
- 45) Nolla-Salas, J., Codina-Calero, J., Vallés-Angulo, S. et al. Clinical significance and outcome of *Aeromonas* spp. infections among 204 adult patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. [Internet]. 2017; 36(8):1393–1403. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10096-017-2945-4#citeas>
- 46) Maura J. Donohue, et al. The development of a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-based method for the protein fingerprinting and identification of *Aeromonas* species using whole cells. *J Microbiol Methods* [Internet]. 2006; 65(3):380-389. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.08.005>
- 47) Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2010; 16:1626-1630. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03364.x>
- 48) REGLAMENTO (CE) no 2073/2005 DE LA COMISIÓN de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 338/1, 22.12.2005.
- 49) Villén Funes C. Análisis microbiológico de distintas variedades de pescado [TFG en Internet]. Jaén: Universidad de Jaén; 2019. Disponible en: <https://hdl.handle.net/10953.1/10410>
- 50) Lee, J. H., Heo, S., Jeong, M., & Jeong, D. W. Transfer of a mobile *Staphylococcus saprophyticus* plasmid isolated from fermented seafood that confers tetracycline resistance.

- PloS one* [Internet]. 2019; 14(2). Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213289>
- 51) Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Sierpńska M. & Łaniewska-Trokanheim L. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin - Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food microbiology* [Internet]. 2014; 46:222-226. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.001>.
 - 52) Cavling Arendrup M. *Candida* and *Candidaemia*. Susceptibility and Epidemiology. *Dan Med J* [Internet]. 2013; 60(11):1-33. Disponible en: https://ugeskriftet.dk/files/scientific_article_files/2018-11/b4698.pdf
 - 53) Jamiu AT, Albertyn J, Sebolai OM, Pohl CH. Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Med Mycol* [Internet]. 2021; 59 (1): 14-30. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa031>
 - 54) Gómez-Gaviria M, Mora-Montes HM. Current Aspects in the Biology, Pathogeny, and Treatment of *Candida krusei*, a Neglected Fungal Pathogen. *Infect Drug Resist* [Internet]. 2020; 13: 1673-1689. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.2147%2FIDR.S247944>
 - 55) Nyenje ME, Odjadjare CE, Tanih NF, Green E, Ndip RN. Foodborne Pathogens Recovered from Ready-to-Eat Foods from Roadside Cafeterias and Retail Outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: Public Health Implications. *Int. J. Environ. Res. Public Health* [Internet]. 2012; 9(8):2608–19. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph9082608>
 - 56) López-Sabater EI., Rodríguez-Jerez JJ., Roig-Sagués AX., Mora-Ventura M.A.T. Bacteriological Quality of Tuna Fish (*Thunnus thynnus*) Destined for Canning: Effect of Tuna Handling on Presence of Histidine Decarboxylase Bacteria and Histamine Level. *J Food Prot* [Internet]. 1994; 57 (4): 318-323. Disponible en: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.4.318>
 - 57) Neog, N., Phukan, U., Puzari, M. et al. *Klebsiella oxytoca* and Emerging Nosocomial Infections. *Curr Microbiol* [Internet]. 2021; 78, 1115-1123. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02402-2>
 - 58) Singh L, Cariappa MP, Kaur M. *Klebsiella oxytoca*: An emerging pathogen? *MJAFI* [Internet]. 2016; 72 (1): 59-61. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.mjafi.2016.05.002>