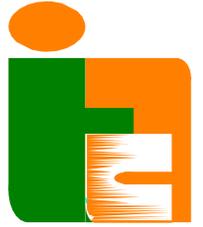




UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

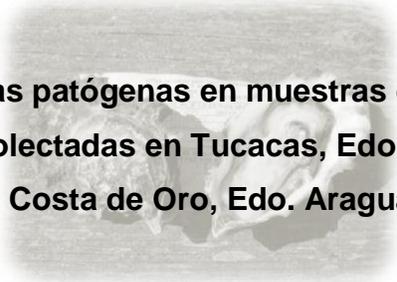
FACULTAD DE CIENCIAS



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

POSTGRADO INTERFACULTADES EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE MAESTRIA



Detección de bacterias patógenas en muestras de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) y agua, colectadas en Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua

CARACAS – VENEZUELA

2010

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

POSTGRADO INTERFACULTADES EN CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE MAESTRIA



Detección de bacterias patógenas en muestras de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*) y agua, colectadas en Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua

Tutor (a): Msc. Nathalie Frágenas

Departamento e Instituto de Química y Tecnología

UCV- FAGRO

Realizado por:

Ing^a. Agr^a. Jeniffer Rodríguez

C.I.: 15.119.585.

DEDICATORIA

Este trabajo deseo dedicárselo en primer lugar a mis hijos, por ser el motor que me da fuerzas y me impulsa a seguir alcanzando metas.

A mi madre, porque sé que su lucha siempre persiguió la finalidad de que lograra mis sueños.

A mis hermanos, Daniel, Edgar y Javier, porque sé que les sirvo de ejemplo, y estoy orgullosa de eso y de ellos.

A Ricardo, por estar tantos años a mi lado, acompañándome en diferentes etapas de mi vida, y enseñándome que la vida es preciosa si se comparte con personas como él.

A Richard, por demostrarme que confía en mí e impulsarme a seguir.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por ser quien me ha creado y ha escrito mi camino.

A mi hija Andrea Valentina, por hacerme tan feliz, enseñarme a ser madre y además ser el eje principal de mi vida, junto con su futuro hermano Ricardo Andrés.

A mi madre, por luchar día a día a mi lado, sin desmayar y enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo puede lograrse, y además por ser la mejor madre del mundo.

A Ricardo, por apoyarme y por demostrarme que en la vida la calma puede ayudarnos más que el apuro, y por entregarme su amor durante años.

A Richard, por ser la mejor imagen de padre que he conocido, por enseñarme tantas formas positivas de vivir la vida y por quererme tan incondicionalmente.

A la profesora Nathalie Frágenas, por guiarme en este camino, apoyarme, ser incondicional y ayudarme para al final obtener el fruto deseado, demostrándome siempre su confianza y cariño.

A la Ing. Nohants Rumbos, por toda su ayuda para que esta investigación se lograra de la mejor manera posible.

A Natasha Hernández y Mirbis Díaz, porque sin su ayuda este trabajo hubiese sido prácticamente imposible, por su ayuda y consejos incondicionales, por su apoyo y confianza.

A la Universidad Central de Venezuela, por ser durante mi formación profesional, como mi propia casa.

[Escriba texto]

Al Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos y sus profesores, por ser instrumentos primordiales para mi formación en esta etapa

...a todos gracias de todo corazón

RESUMEN

En la actualidad las enfermedades transmitidas por alimentos se han convertido en un problema de salud pública, numerosas bacterias entre ellas coliformes fecales y varias especies de vibrios han sido asociadas con productos de pesca, en especial con los moluscos bivalvos, sobre todo si se consumen crudos (Flores y col. 1996; Minami y col. 2010). Las costas venezolanas presentan, una elevada producción de moluscos bivalvos de amplia distribución, entre ellas las ostras que poseen un mecanismo de filtración como medio de alimentación con una consecuente acumulación de microorganismos, comportándose como portadoras de agentes patogénicos. En esta investigación, se propone la detección de bacterias patógenas en muestras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*) y agua colectadas en Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua; en un periodo de 8 semanas utilizando placas petrifilm para la cuantificación de Coliformes totales y *E.coli*; placas Petri con Agar McConkey-Sorbitol para la cuantificación de *E.coli* O157:H7 y placas Petri con Agar TCBS para la cuantificación de *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*. Aislándose en las muestras de Agua de tucacas solo Coliformes totales y *E.coli* O157:H7; mientras que en las muestras de agua provenientes de ocumare, se aislaron coliformes totales, *E.coli* O157:H7, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*. En las muestras de ostras de ambas localidades se aislaron coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*. A través de la prueba de T-Student ($\alpha=0,05$), se determinó que en la mayoría de los casos las poblaciones bacterianas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Cuando se utilizó el coeficiente de correlación de pearson, se estableció que no existe relación entre las cargas bacterianas de agua y ostras, este mismo coeficiente, ayudó a determinar que los coliformes fecales no pueden ser utilizados como indicadores de contaminación con *Vibrios spp.*

Palabras clave: coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, contaminación, agua y ostras.

ABSTRACT

At present food-borne diseases have become a public health problem, many bacteria including fecal coliforms and various species of vibrios have been associated with fish products, especially bivalve molluscs, especially when eaten raw (Flores et al. 1996, Minami et al. 2010). The present Venezuelan coast, a high production of widely distributed bivalve molluscs, including oysters, which have a filtering mechanism as a means of feeding with a consequent accumulation of microorganisms, behaving as carriers of pathogenic agents. In this research, we propose the detection of pathogenic bacteria in samples of oysters (*Crassostrea rhizophorae*) and water collected in Tucacas, Edo. Falcon and Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua, in a period of eight weeks, using Petrifilm plates for quantification of total coliforms and *E.coli*; Petri dishes with MacConkey-Sorbitol Agar for the quantification of *E.coli* O157: H7 and TCBS agar Petri dishes for quantification of *V. parahaemolyticus* and *V.cholerae*. Was isolated from water samples only Tucacas total coliforms and *E. coli* O157: H7, whereas in water samples from Ocumare were isolated total coliforms, *E.coli* O157: H7, and *V.cholerae* and *V.parahaemolyticus*. In oyster samples from both localities were isolated total coliforms, *E.coli*, *E.coli* O157: H7, and *V.cholerae* *V.parahaemolyticus*. Through the Student T-test ($\alpha = 0.05$), it was determined that in most cases bacterial populations showed statistically significant differences between them. When we used the Pearson correlation coefficient was determined that there is no relationship between bacterial load of water and oysters, the same rate, helped determine that fecal coliforms may not be used as indicators of contamination with *Vibrio* spp.

Keywords: Total coliforms, *E.coli*, *E.coli* O157: H7, *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, pollution, water and oysters.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Portada.....	i
Página de respaldo.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimiento.....	iv
Resumen.....	v
Abstract.....	vii
Tabla de Contenido.....	vii
Índice de cuadros.....	xi
Índice de figuras.....	xiii
Índice de anexos.....	xvi
1.-Introducción.....	1
2.-Objetivos.....	6
3.-Revisión bibliográfica.....	7
3.1.-Algunas generalidades sobre bacterias causantes de ETA's	7
3.1.1.- <i>Vibrio spp</i>	8
3.1.2.-Coliformes.....	9
3.1.2.1.- <i>E.coli</i>	11

3.1.2.2.- <i>E.coli</i> O157:H7.....	12
3.2.-Generalidades sobre moluscos bivalvos.....	13
3.2.1.-Concha.....	15
3.2.2.-Evolucion de la alimentación.....	15
3.2.3.-Transporte interno e intercambio gaseoso.....	16
3.2.4.-Desarrollo.....	16
3.2.5.-Produccion de moluscos y otros invertebrados acuáticos.....	17
3.3.-Enfermedades de transmisión alimentaria.....	20
3.4.-Salud publica asociada a las ETA's.....	22
3.5.-Patogenos causantes de ETA's y su relación con el medio ambiente.....	29
3.6.-Bacterias relacionadas con la calidad de los alimentos de origen marino.....	39
3.7.-Presencia de Bacterias causantes de ETA's en moluscos bivalvos.....	41
3.7.1.-Presencia de <i>Vibrio spp.</i> en moluscos bivalvos.....	42
3.7.2.-Presencia de <i>E.coli</i> en moluscos bivalvos.....	45
3.8.-Metodos utilizados para la determinación y cuantificación de bacterias patógenas en alimentos.....	49
4.-Materiales y Métodos.....	53
4.1.-Ubicación de la investigación.....	53
4.2.-Toma de muestras	53
4.3.-Preparacion de las muestras.....	54
4.4.-Análisis microbiológico.....	55

4.4.1.-Preparacion de las diluciones.....	55
4.4.2.-Coliformes totales y <i>E.coli</i>	56
4.4.3.- <i>E.coli</i> enterohemorrágica O157:H7.....	58
4.4.4.- <i>Vibrio spp</i>	59
4.5.- Pruebas Bioquímicas.....	61
4.5.1.- Pruebas Bioquímicas para <i>Vibrio spp</i>	61
4.5.2.- Pruebas Bioquímicas para <i>E.coli</i> O157:H7	63
4.6.-Disenio estadístico.....	64
4.7.-Análisis estadístico de los resultados.....	64
5.-Resultados y Discusiones.....	65
5.1.- Cuantificación de la población de coliformes totales, <i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> O157:H7, <i>V.cholerae</i> y <i>V.parahaemolyticus</i> en muestras de agua.....	65
5.2.- Cuantificación de la población de coliformes totales, <i>E.coli</i> , <i>E.coli</i> O157:H7, <i>V.cholerae</i> y <i>V.parahaemolyticus</i> en muestras de ostras	71
5.3.-Relacion entre la contaminación de las muestras de agua y las muestras de ostras.....	77
5.4.- Relación entre las cargas de coliformes fecales y <i>Vibrio spp</i>	79
5.5.-Pruebas Bioquímicas.....	81
5.5.1.-Pruebas Bioquímicas para <i>Vibrio spp</i>	81
5.5.2.-Pruebas Bioquímicas para <i>E.coli</i> O157:H7	88
6.-Conclusiones.....	90

7.-Recomendaciones.....	92
8.-Referencias bibliográficas y electrónicas.....	94
9.-Anexos.....	111

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Titulo	Pág.
1	Algunas bacterias que causan diarreas agudas e intoxicaciones alimentarias, sus síntomas y alimentos implicados	8
2	Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en Venezuela (ton)	18
3	Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en Venezuela (USD)	18
4	Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en América (ton)	19
5	Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en América (USD)	19
6	Número de casos de ETA's y cada una de las bacterias causantes de estas anualmente en los Estados Unidos.....	21
7	Principales técnicas de cuantificación y detección de microorganismos patógenos, utilizadas en la actualidad	50
8	Características cuantitativas y estadísticas simples para la carga de coliformes totales, <i>E.coli</i> , <i>V.parahaemolyticus</i> y <i>V.cholerae</i> , en muestras de agua provenientes de Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua.....	66
9	Características cuantitativas y estadísticas simples para la carga de coliformes totales, <i>E.coli</i> , <i>V.parahaemolyticus</i> y <i>V.cholerae</i> , en muestras de ostras provenientes de Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de	

	Oro, Edo. Aragua.....	72
10	Coeficiente de correlación de Pearson para los microorganismos coliformes totales, <i>E.coli</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>V. parahaemolyticus</i> y <i>V.cholerae</i> ; en la localidad de tucacas	77
11	Carga de <i>E.coli</i> en muestras de agua y mariscos en aéreas costeras poco profundas.....	79
12	Coeficiente de correlación de Pearson para los microorganismos coliformes fecales y <i>Vibrios</i> spp.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Titulo	Pág.
1	Muestra del flagelo de <i>V. parahaemolyticus</i> que le permite la movilidad.....	8
2	Coliformes.....	9
3	Muestra de los flagelo peritricos de <i>E.coli</i>	11
4	<i>E.coli</i> O157:H7.....	12
5	Ejemplo de Molusco Bivalvo (Ostras).....	15
6	Etiología de las enfermedades relacionadas con los alimentos	23
7	Mortalidad asociada con las ETA's	24
8	Numero de brotes de ETA's relacionados con diferentes factores	25
9	Representación esquemática del modelo de los riesgos desde la cosecha hasta el consumo de moluscos	26
10	Posibles rutas de transmisión de bacterias entéricas	30
11	Carga de <i>V. parahaemolyticus</i> en ostras en la Bahía Chesapeake (Estados Unidos).....	35
12	Temperatura del agua en la Bahía Chesapeake (Estados Unidos).....	35
13	Número más probable de coliformes fecales en moluscos bivalvos en India.....	37
14	Parámetros medioambientales en el sitio muestreado en India	37
15	Porcentaje de diferentes especies de <i>Vibrio</i> aisladas en mejillones azules	43

	colectados en el Mar Alemán Waden	
16	Coliformes fecales contenidos en muestras de pepitonas cocidas y ostras crudas, expendidas en la ciudad de Cumana, Venezuela	46
17	Distribución porcentual de <i>E. coli</i> no patogénica y enteropatógena en pepitonas Cocidas y ostras crudas expendidas la ciudad de Cumaná	47
18	Proceso de toma de muestras	53
19	Metodología utilizada para la preparación de las diluciones de muestras...	55
20	Placas petrifilm para recuento de coliformes totales y <i>E.coli</i> utilizadas durante la investigación.....	56
21	Metodología para recuento de coliformes totales y <i>E.coli</i>	57
22	Metodología empleada para el recuento de <i>E. coli</i> enterohemorrágica (O157:H7).....	58
23	Metodología empleada para el recuento de <i>Vibrium cholerae</i> y <i>Vibrium parahaemolyticus</i>	60
24	Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de agua de la localidad de tucacas.....	69
25	Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de agua de la localidad de ocumare	70
26	Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de ostras de la localidad de tucacas	75
27	Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de ostras de la localidad de ocumare	76
28	Carácter halófilo para <i>Vibrio spp</i>	81
29	Resistencia al NaCl.....	82

30	Prueba de Hugh – Leifson.....	83
31	Reacción de indol.....	84
32	Reducción de nitratos.....	84
33	Reacción Voges-Proskauer.....	85
34	Fermentación de carbohidratos.....	86
35	Producción de sulfuro de hidrogeno.....	87
36	Fermentación del sorbitol.....	88
37	Crecimiento a 44°C.....	89

ÍNDICE DE ANEXOS

	Titulo	Pág.
A	Placas pretrifilm con crecimiento bacteriano característico de coliformes totales y <i>E.coli</i>	112
B	Placas pretrifilm sin crecimiento bacteriano característico	113
C	Placas petri con agar Agar McConkey-Sorbitol para <i>E. coli</i> O157:H7	114
D	Placas petri con agar cólera TCBS para <i>Vibrio</i> spp. con crecimiento característico de <i>V.parahaemolyticus</i> y <i>V.cholerae</i>	115

1.- INTRODUCCIÓN

La contaminación de los alimentos por diferentes microorganismos ha sido un problema importante a nivel mundial, a través del tiempo.

Aunque históricamente las nuevas enfermedades aparecían primero y luego se descubría el agente productor, la secuencia empieza a invertirse, pues ahora se aíslan nuevos microbios y se les estudia desde el punto de vista de su capacidad para producir enfermedad, entonces cuando esta se manifiesta, el agente productor y su sensibilidad a los agentes químicos ya es conocida (Quevedo, 2002).

Bosch y col., (2008) aseguran que, cuando hablamos de la contaminación de los alimentos, son muchas las fuentes de las cuales esta puede prevenir, por ejemplo, cuando el alimento es de origen marino el agua suele ser la fuente principal de contaminación o la razón principal por la cual los alimentos de este tipo, suelen ser problemáticos para la salud, ya que muchas veces el tratamiento de las aguas residuales no asegura la remoción completa de contaminantes.

Las enfermedades transmitidas por alimentos (E.T.A.) constituyen los síndromes originados por la ingestión de alimentos y/o agua que contienen distintos agentes patógenos que afectan la salud del consumidor en forma individual o colectiva. Por un lado la ocurrencia de estas enfermedades es un indicador directo de la calidad de los alimentos, y por otro el proceso de globalización del comercio de alimentos indica la progresiva y urgente necesidad de que los programas de control de enfermedades desarrollen mecanismos eficientes de detección temprana de los brotes que suelen ocurrir (González y Rojas 2005).

[Escriba texto]

Fleming y col. (2006) afirman que, las enfermedades transmitidas por alimentos, son un conjunto de enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos contaminados con microorganismos: bacterias, mohos, levaduras, virus; Toxinas de microorganismos; Agentes químicos: plaguicidas, metales, aditivos; Alimentos que naturalmente pueden contener sustancias tóxicas: moluscos, vegetales, mohos.

Las ETA's son conocidas desde tiempos remotos pero en la actualidad los microbiólogos y los higienistas de alimentos, pueden sentirse orgullosos de haber sido los pioneros en señalar la existencia de enfermedades emergentes. En efecto debido a la naturaleza del trabajo en los laboratorios de microbiología alimentaria, y su indispensable intervención en ocasiones de brotes de ETA's, muy temprano descubrieron que, determinados microorganismos que nunca antes habían sido señalados como patógenos de humanos, eran responsables de los brotes. (Quevedo, 2002).

Greig y Rave (2009) indican que, la atribución de enfermedades entéricas a ciertos alimentos, es definida como la estimación de la proporción de casos humanos por cada enfermedad que puede ser atribuida a un alimento o materia prima. Ello proporciona información útil para los perfiles de riesgo, evaluaciones de los mismos, gestión y comunicación de riesgos en materia de seguridad alimentaria. Más concretamente, la atribución de alimentos permite la estimación del número de casos humanos, las hospitalizaciones, muertes y sus costos relacionados, es decir para cada uno determina la combinación patógeno-vehículo alimentario.

[Escriba texto]

Cuando se habla de las enfermedades transmitidas por los alimentos, es necesario prestar especial atención a aquellos alimentos marinos que se consumen crudos o con una cocción mínima y además el medio ambiente en que ellos se encuentran, ya que constituye un importante sustrato para que microorganismos patógenos puedan desarrollarse y sobrevivir por largos periodos de tiempo).

Entre los diferentes microorganismos indicadores de contaminación o de prácticas indeseables en el manejo de los alimentos se encuentran las bacterias mesófilas aerobias, los coliformes y los enterococos. El *Vibrium cholerae*, agente etiológico del cólera ha sido asociado con numerosos productos de pesca, en especial con los moluscos bivalvos, sobre todo si se consumen crudos (Flores y col. 1996; Minami y col. 2010).

Rosec y col. (2009) señalan que, el *Vibrium parahaemolyticus* es parte de la microflora natural de aguas estuarinas y costeras marinas, y puede estar presente en los pescados y mariscos especialmente en los moluscos bivalvos, este fue descubierto en los años 1950's y es una de las especies de *Vibriums* mas altamente relacionado con brotes de infecciones gastrointestinales en humanos.

En lo que se refiere a los moluscos bivalvos, Sarcos y Botero (2005) señalan que, el estudio de la calidad bacteriológica de las almejas además de que aporta datos sobre su calidad sanitaria y el peligro que pueden representar para los que las consumen, puede contribuir también a la determinación de la calidad de las aguas de donde estas son recolectadas.

Las costas venezolanas presentan entre tantas ventajas, una alta productividad y diversidad de especies autóctonas de origen bentónico y una elevada producción de conchas comestibles o moluscos bivalvos de amplia distribución entre el oriente, centro y occidente. Se conoce que para el año 1997 se alcanzaron a nivel de desembarque 600 toneladas de guacuco (*Tivella mactroides*) y almeja (*Polymesoda solida*) y 32.000 toneladas de pepitona (*Arca zebra*), en los estados Sucre y Nueva Esparta. Es importante destacar que la mayor producción corresponde a bancos naturales. En el territorio nacional se limita el consumo de forma fresca, cocida y enlatada; sin embargo, puede ser una fuente comercial para la exportación a otros países en forma viva y congelada, ya que para el año 1998 el mercado europeo tenía una demanda de 800.000 toneladas. En 1998 se estudió la posibilidad de exportar hacia la Unión Europea y al resto del mundo moluscos bivalvos. Por lo que el Sarpa, actualmente el Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (Inapesca) como organismo oficial en materia de administración y control de los productos pesqueros, y con el fin de asegurar la producción y comercialización de los moluscos bivalvos, bajo normas que garanticen su inocuidad y calidad, promulgó la Resolución N° 162 publicada en Gaceta Oficial N° 36, que establece las normas para empaque, envasado, controles sanitarios y fechas de captura de moluscos bivalvos (Morillo y Belandria, 2007).

Las ostras poseen una gran capacidad de filtración y una consecuente acumulación de microorganismos en su carne, pudiendo así fungir como portadoras pasivas de agentes patogénicos del hombre, cuando crecen en aguas contaminadas por desechos humanos. En el ambiente estuarino, estas bacterias pueden ser

[Escriba texto]

encontradas tanto en la columna de agua como en los sedimentos, pudiendo su número ser bastante elevado debido a las altas cantidades de materia orgánica (Wambier y col. 2008). Además es necesario saber que las condiciones medioambientales tales como temperatura y precipitaciones tienen una alta influencia sobre el recuento microbiológico en aguas y alimentos de origen marino (Umesha y col. 2009). En tal sentido Vernocchi y col. (2007) mencionan que los moluscos pueden acumular microorganismos, incluidos los patógenos del agua, y el número y tipo de microorganismos depende en gran parte de factores antropogénicos, climáticos y estacionales.

Por el hecho de que las infecciones derivadas del consumo de moluscos bivalvos es un problema ampliamente reconocido, se han desarrollado estrategias para gestionar los riesgos, una de ellas es la de colocar los moluscos en tanques en los que puedan ser controladas las condiciones y sobre todo la contaminación, esto en respuesta al alto número de brotes de enfermedades asociados a estos (Lee y Younger, 2002).

Por lo expuesto y debido a la escasez de trabajos en el área, se planteó la necesidad de evaluar la posible contaminación de moluscos bivalvos que se consumen en las zonas costeras de nuestro país. A partir de estos planteamientos se proponen los siguientes objetivos para la investigación:

[Escriba texto]

2.- Objetivos

2.1.- OBJETIVO GENERAL

- ② Detectar bacterias patógenas en muestras de ostras (*Crassostrea rhizophorae*), y agua colectadas en Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua

2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ② Cuantificar la población de coliformes Totales y *E. coli*, *E. coli* O157: H7, *Vibrium cholerae* y *Vibrium parahaemolyticus* en muestras de agua provenientes de las zonas de Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua.
- ② Cuantificar la población de coliformes Totales y *E. coli*, *E. coli* O157: H7, *Vibrium cholerae* y *Vibrium parahaemolyticus* en muestras de Ostras (*Crassostrea rhizophorae*), colectadas en Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua.
- ② Establecer si existen diferencias significativas entre la contaminación de las muestras de agua y ostras de las diferentes localidades.
- ② Establecer la correlación entre la contaminación de la muestras de agua y Ostras (*Crassostrea rhizophorae*), en las referidas localidades.
- ② Identificar especies aisladas a través de pruebas bioquímicas.

3.- REVISION BIBLIOGRAFICA

3.1.- Algunas generalidades sobre bacterias causantes de ETA's

En los últimos años, ha aumentado significativamente la ocurrencia de brotes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos, motivado a la alta contaminación que sufren los alimentos que son consumidos a nivel mundial. Las bacterias suelen ser una de las principales causas de estos brotes, y a pesar de las investigaciones científicas realizadas, no se ha podido detener este hecho.

Según Prescott y col. (1999), el mundo está familiarizándose con las bacterias y las enfermedades transmitidas por alimentos, situación que puede llegar a ser muy peligrosa ya que existen bacterias que poseen una dosis infectiva muy baja, como es el caso de *E.coli* O157:H7, que con solo 500 bacterias pueden desencadenar una infección.

En la **tabla 1** se muestran algunas afecciones que pueden originar ciertas bacterias causantes de ETA's. Los síntomas que puede presentar un paciente que ha sido infectado por una bacteria causante de una ETA pueden ser muy variados, no solo dependerán del microorganismo que causa la enfermedad sino del individuo en particular, ya que existen personas más susceptibles a este tipo de afecciones que otras.

Tabla 1: Algunas bacterias que causan diarreas agudas e intoxicaciones alimentarias, sus síntomas y alimentos implicados

Microorganismo	Periodo de incubación (horas)	Vómito	Diarrea	Fiebre	Epidemiología	Alimentos Implicados
<i>E.coli enterotoxigenica</i>	24-72	+/-	++	-	Los M.O crecen en el intestino y son una importante causa de la diarrea del viajero	Carne, leche, agua ,
<i>V.parahaemolyticus</i>	6-96	+	++	+/-	Los M.O crecen en mariscos e intestino y producen toxina o invasión	Mariscos y moluscos poco cocidos
<i>V.cholerae</i>	24-72	+	+++	-	Crece en el intestino y producen toxina	Pescado, moluscos , mariscos y agua .
<i>Salmonella</i>	8-48	+/-	++	+	Los M.O crecen en el intestino	Aves, pescado, agua .

Fuente: Prescott y col. (1999).

(-) Nunca, (+/-) casi nunca, (+) a veces, (++) casi siempre, (+++) siempre

3.1.1.- *Vibrios* spp.

Las *Vibriumnaceae* son una familia de bacterias Gram negativas, oxidasa positivas, anaerobias facultativas que fermentan la glucosa sin producción de gas, en forma de coma o bastón recto, que debido a un flagelo polar son móviles en medio líquido (**Ver Figura 1**) (Butt y col. 2004).

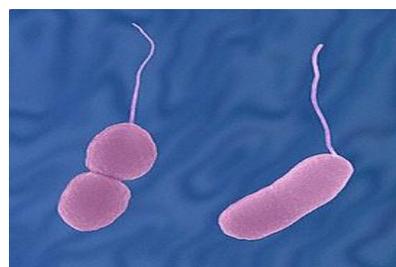


Figura 1: Muestra del flagelo de *V. parahaemolyticus* que le permite la movilidad

Tomado de: <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/Vibriu/m-para-dk.jpg> [Consulta: 10 de octubre de 2009]

[Escriba texto]

Según Prescott y col. (1999) el cólera es causado por el *V.cholerae*, esta enfermedad se contrae ingiriendo alimentos o agua contaminados con materia fecal de pacientes o portadores, además indican que los moluscos son uno de sus reservorios naturales.

Los *Vibriums* son muy comunes en ambientes acuáticos marinos y estuarinos. Este tipo de microorganismos ha sido hallado en gran cantidad de alimentos, como en mejillones muestreados en Alemania en el mar Wadden. El nivel de *Vibriums*, aunque está dentro de la normativa legal de la unión europea, representa un riesgo para la salud de los consumidores, dados los reportes de brotes en la zona. Dentro de las especies de *Vibriums* más comunes se encuentran: *V.alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V.harveyi* y *V.cholerae*, (Lhafi y Kühne, 2007).

3.1.2.- Coliformes

Según Banwart (1979), los coliformes comprenden todos aquellos bacilos no formadores de esporas, gram negativos, aeróbicos o anaeróbicos facultativos, que fermentan la lactosa con formación de gas antes de 48 horas a 35°C. Dentro del grupo de los coliformes se incluye a *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, entre otros.



Figura 2: Coliformes

Tomado de:
www.ibal.gov.co/controldecalidad/portafolio.htm
[consulta: 10 de octubre de 2009]

El mismo autor señala que el empleo de los coliformes como indicadores tiene aspectos tanto negativos como positivos. En vista de que los miembros de este grupo se encuentran en los intestinos y excrementos del hombre y los animales, su presencia podría deberse a contaminación fecal y acompañarse así mismo de patógenos entéricos, pero también podría deberse a contaminación no fecal,

Por otra parte Mc Cance (1979), indica que los coliformes son bacterias que en presencia de sales biliares u otros agentes selectivos equivalentes, pueden crecer o producir ácido y gas de lactosa cuando se incuban a 35°C -37°C.

Dentro de los coliformes podemos encontrar a los no fecales y los fecales, los fecales son relativamente específicos de la materia fecal de animales de sangre caliente, aunque también se detectan en productos frescos, ya que también pueden desarrollarse en un ambiente apropiado fuera de los intestinos (Banwart, 1979).

3.1.2.1.- *Escherichia coli*

Es un organismo gram negativo, anaeróbico facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo) (**ver figura 3**) , no forma esporas, es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Prescott y col., 1999).

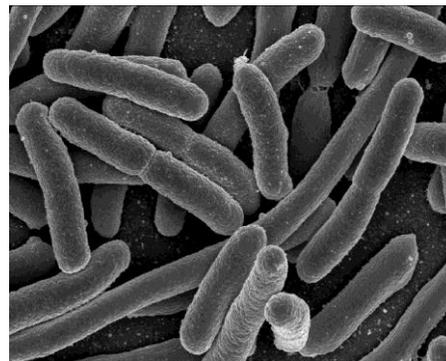


Figura 3: Muestra de los flagelo peritricos de *E.coli*

Escherichia coli se encuentra dentro del grupo de coliformes fecales, es una bacteria muy conocida y común, se conoció como causa de

enfermedades en 1982 durante el comienzo de una epidemia de diarrea sanguinolenta la cual se descubrió que tenía su origen en hamburguesas contaminadas. Desde entonces *E. coli* se ha vuelto una preocupación seria de salud pública (Keller, 2004).

Tomado de:
http://www.universityofcalifornia.edu/everyday/agriculture/images/e_coli.jpg [consulta: 10 de octubre de 2009]

E.coli es utilizada como indicadora de contaminación con virus y bacterias tanto en aguas como en alimentos, aunque no es eficaz para predecir contaminación con varios microorganismos, tal como lo indican Lhafi y Kühne, (2007), quienes confirmaron que no existía una correlación entre la población de *E.coli* y la de *Vibrium* spp. en mejillones azules en el mar de Waden (Alemania). Sin embargo aun se utiliza como indicadora de contaminación fecal (Li y col., 2009; Chigbu y col., 2005; Mc Rae y col., 2005 y Cakir y col., 2001).

Existe una enfermedad llamada “Diarrea del viajero” o infección por *E.coli* que es resultado del encuentro con virus, bacterias o protozoos que no están presentes

[Escriba texto]

en el ambiente de origen del viajero. Uno de los principales agentes causales es *E.coli*, esta bacteria circula entre la población residente normalmente, que desarrolla inmunidad. Prescott y col., (1999) argumentan que debido a que son necesarias muchas de estas bacterias para causar una infección, los alimentos y el agua contaminados son el principal vehículo para diseminar las bacterias. Los mismos autores establecen que se conocen 6 tipos o cepas de *E.coli* diarreogénicas :

- a) *E.coli* enterotoxigénica (ECET)
- b) *E.coli* enteroinvasiva (ECEI)
- c) *E.coli* enteropatógena (ECEP)
- d) *E.coli* enterohemorrágica (*E.coli* o157:H7) (ECEH)
- e) *E.coli* enteroagregante (ECEAg)
- f) *E.coli* difusamente Adherente (ECDA)

3.1.2.2.- *E. coli* O157:H7

Dentro de las características generales se tiene que esta bacteria es anaeróbica facultativa, Gram negativa, motil, no formadora de esporas, encontrándose más de 200 especies, donde los serotipos “O” son los causantes de enfermedades a los humanos y significa antígeno somático O y flagelar H (Oquendo, 2006)



Figura 4: *E.coli* O157:H7

Tomado de: www.foodpoisonjournal.com/tags/e-coli/ [consulta: 10 de octubre de 2009]

Escherichia coli son un amplio y diverso grupo de bacterias. Se encuentran diversos serotipos, O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM pero el serotipo más frecuente es O157:H7 (Gómez y col., 2005).

E. coli O157:H7 se ha encontrado en alimentos como carne picada, carne de hamburguesas, además de leche (Roldan y col., 2007), también en otros alimentos de origen animal (Reuben y col., 2003)

La *E. coli* O157:H7 fue reconocida como patógeno transmitido por alimento a partir del año 1982, luego de algunos brotes ocurridos en los Estados Unidos (Rojas y González, 2006), y a pesar de que su dosis infectiva es muy baja, entre 10 y 100 células por cc o por gr, dicha dosis es suficiente para producir trastornos gastrointestinales graves, haciéndolo responsable de numerosos brotes infecciosos (Duran, 2006).

3.2.- Generalidades sobre Moluscos bivalvos.

Los moluscos son de gran importancia tanto alimenticia, como económica. Por ello se presentan algunas generalidades de este filo. En este resumen mencionaremos a la clase bivalva que para efectos de este estudio resulta una de las más significativas; esta clase incluye animales como almejas, ostras y mejillones, que se encuentran dentro de una concha con dos valvas unidas dorsalmente. Barnes (1995), señala importante información acerca de estos animales:

[Escriba texto]

El filo Mollusca comprende las clases:

- Clase monoplacóforos (monoplacophora)
- Clase poliplacóforos (polyplacophora)
- Clase aplacóforos (aplacophora)
- Clase gasterópodos (gastropoda)
- Clase bivalvos (bivalva)
- Clase escafópodos (scaphopoda)
- Clase cefalópodos (cephalopoda)

Los miembros del filo Mollusca son algunos de los invertebrados más llamativos y mejor conocidos e incluyen formas como las almejas, mejillones, ostras, calamares, pulpos y caracoles por la gran cantidad de especies que lo conforman constituyen el mayor filo de invertebrados después de los artrópodos.

A pesar de las diferencias entre caracoles, almejas y calamares, todos los moluscos responden al mismo patrón estructural; en general, los moluscos son animales acuáticos (agua de mar y agua dulce) y también terrestres, que se van alimentando mientras se desplazan sobre la superficie de un sustrato, poseen simetría bilateral, miden varios centímetros de longitud y su cuerpo es de forma ovoide.

3.2.1.- Concha

La concha típica está constituida por dos valvas (**ver figura 5**), estas valvas se abren y se cierran por la acción de unos grandes músculos dorsales, que se extienden transversalmente entre ambas valvas. La concha puede ser muy gruesa como la de las almejas dulceacuícolas o delgadas como la de la almeja marina comestible *Mercenaria*. La forma de la concha es muy variable así como el tamaño, las ornamentas y el color (Hickman y col., 2006)



Figura 5: Ejemplo de Molusco Bivalvo (Ostras)

Tomado de:
http://farm1.static.flickr.com/64/175088375_66e5c97874.jpg [consulta: 18 de octubre de 2009]

3.2.2.- Evolución de la alimentación

Barnes (1995) afirma que, generalmente se acepta que los primeros bivalvos fueron excavadores, pero la mayoría de los actuales, se alimentan por una corriente de ventilación que entra entre las valvas; el mecanismo de alimentación por filtración, apareció con la evolución (lamelibranquios), estos se convirtieron en los bivalvos dominantes. A medida que los bivalvos evolucionaban, los microorganismos y otras partículas que provenían de la filtración comenzaron a ser utilizados como fuente de alimento. Así mismo el autor señala que la digestión en la mayoría de los casos se lleva a cabo en el estómago y de forma extracelular y la absorción se da a través de la glándula digestiva.

3.2.3.- Transporte interno e intercambio gaseoso

Tanto Barnes, (1995) como Hickman y col., (2006) señalan que los bivalvos poseen un sistema circulatorio como el de un molusco típico. El intercambio gaseoso se da a medida que el agua pasa por las branquias, la cantidad de oxígeno extraído del agua resulta pequeña en comparación con otros moluscos. La sangre de la mayoría de los bivalvos carece de pigmentos respiratorios. Aunque algunos poseen hemoglobina extracelular.

3.2.4.- Desarrollo

En la mayoría de los bivalvos, la fecundación se produce en el agua circundante, algunos bivalvos incuban sus huevos entre sus branquias. Las larvas de algunos moluscos pueden alimentarse y pueden vivir largos periodos de tiempo, las que no se alimentan solo pueden vivir como tal (larvas) por un corto periodo de tiempo. El ritmo de crecimiento y la esperanza de vida son muy variables, aunque se sabe que el ritmo de crecimiento es más acelerado durante los primeros años de vida y suelen vivir entre 20 y 30 años, aunque se han encontrado individuos de 150 años de edad (Barnes, 1995). Por su parte Hernández y col., (1998) aluden que la ostra es uno de los moluscos bivalvos más explotados en Venezuela, debido a su alta fecundidad, rápido crecimiento y rentabilidad comercial. En nuestro país, la ostra de mangle (*Crassostrea rhizophorae*) ha muy sido estudiada, demostrándose su factibilidad de cultivo comercial.

3.2.5.- Producción de moluscos y otros invertebrados acuáticos

Los productos del mar son consumidos casi en la totalidad de los países del mundo debido a la gran cantidad de nutrientes que contienen, aun cuando son tan consumidos, no en todos los países hay producción registrada en las hojas de estadística de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura). Por ejemplo en Venezuela, la producción de moluscos y otros invertebrados acuáticos es tan pequeña que no está registrada en estas hojas, mientras que la importación y exportación (muchas veces realizada como subproductos) se han visto fluctuar a lo largo de los años.

En nuestro país, mientras que las exportaciones han ido disminuyendo hasta 2 ton en el año 2006; las importaciones han ido en ascenso registrándose en 5.230 ton para el mismo año (**ver tabla 2**); los costos que este tipo de intercambio representan para la nación se expresan en la **tabla 3** (FAO, 2000-2009). Cuando hablamos de América, si encontramos registros sobre la producción de moluscos y otros invertebrados acuáticos, que se encuentra en ascenso y se registró en 666.132 ton para el año 2006, lo mismo sucede con las importaciones y exportaciones (**ver tabla 4**) mientras que el intercambio monetario que esto ha representado se expresa en la **tabla 5** (FAO, 2000-2009).

Tabla 2: Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en Venezuela (ton)

PAIS	Flujo de comercio	Producto	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
República Bolivariana de Venezuela	Export	Moluscos e invertebrados acuáticos	480	1 533	734	232	84	157	52	142	196	1	2
	Import	Moluscos e invertebrados acuáticos	3 005	3 743	4 278	5 312	7 901	9 095	7 442	2 247	4 105	6 029	5 230
	Producción	Moluscos e invertebrados acuáticos	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .	0 .
Total República Bolivariana de Venezuela			3 485	5 276	5 012	5 544	7 985	9 252	7 494	2 389	4 301	6 030	5 232

Fuente: © FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (2000-2009)

Tabla 3: Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en Venezuela (USD)

PAIS	Flujo de comercio	Producto	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
República Bolivariana de Venezuela	Export	Moluscos e invertebrados acuáticos	1 370	3 920	3 422	66	60	70	160	222	278	3	2
	Import	Moluscos e invertebrados acuáticos	2 267	1 535	1 976	3 646	5 213	6 188	5 012	2 083	5 874	9 726	6 127
Total República Bolivariana de Venezuela			3 637	5 455	5 398	3 712	5 273	6 258	5 172	2 305	6 152	9 729	6 129

Fuente: © FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (2000-2009)

Tabla 4: Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en América (ton)

Fuente: © FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (2000-2009)

Flujo de comercio	Producto	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Export	Moluscos e invertebrados acuáticos	488 439	625 936	410 298	504 455	534 906	549 353	481 054	414 546	462 218	566 451	725 276
Import	Moluscos e invertebrados acuáticos	146 555	161 757	176 843	191 232	211 170	216 797	220 321	236 596	223 186	235 834	259 950
Producción	Moluscos e invertebrados acuáticos	497 721	635 472	458 609	515 815	527 836	460 016	434 847	433 142	441 641	506 890	666 132
Reexport	Moluscos e invertebrados acuáticos	0 .	1 222	15	0 .	3	0 .	0 .	0 .	2 252	0 -	10
Total Américas		1 132 715	1 424 387	1 045 765	1 211 502	1 273 915	1 226 166	1 136 222	1 084 284	1 129 297	1 309 175	1 651 368

Tabla 5: Producción y Comercio de moluscos e invertebrados acuáticos en América (USD)

Flujo de comerc.	Producto	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
Export	Moluscos e invertebrados Acuáticos	1 261 689	1 302 538	971 049	1 068 812	1 120 076	1 139 618	1 005 688	1 077 901	1 260 759	1 516 150	1 636 753
Import	Moluscos e invertebrados acuáticos	642 372	718 152	693 405	724 898	778 721	675 345	707 687	838 256	850 044	966 205	1 047 211
Reexport	Moluscos e invertebrados acuáticos	0 .	7 538	10	0 .	53	0 .	0 .	0 .	12 550	0 -	64
Total Américas		1 904 061	2 028 228	1 664 464	1 793 710	1 898 850	1 814 963	1 713 375	1 916 157	2 123 353	2 482 355	2 684 028

Fuente: © FAO - Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Service (2000-2009)

[Escriba texto]

3.3.- Enfermedades de transmisión alimentaria

Los brotes graves de ETA's han sido documentados en todos los continentes en la última década ya que ilustran la importancia tanto social como económica de estas enfermedades, las cifras elevadas hacen que los consumidores vean este tema cada vez con mayor preocupación (Schlundt, 2002; Hughes y col. 2007, Marvin y col. 2009, Oliveira y col. 2009, Yongxing y col. 2009, Minami y col. 2010).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S) de origen microbiano y parasitario, son las causadas por el consumo de agua o comida contaminada por microorganismos patógenos, parásitos o sus toxinas (Suarez y col. 2007). La contaminación de los alimentos puede ser endógena, o bien ocurrir en algún punto de su transformación. Por tanto, el agente etiológico debe existir en los animales, vegetales o medio ambiente donde se almacena, maneja o procesa el alimento. Generalmente los microorganismos contaminan los alimentos en pequeñas cantidades, y deben encontrar en ellos las condiciones adecuadas para sobrevivir y multiplicarse hasta alcanzar los niveles necesarios para ser infectantes o producir la suficiente toxina para causar la enfermedad (Parilla y col. 1993).

Jordan y col. (2005) y Minami y col. (2010), entre otros, aseguran que los patógenos más comúnmente asociados a enfermedades transmitidas por alimentos incluyen, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrium* spp. y *Escherichia coli* O157:H7. Por su parte Devasia y col. (2006), mencionan que la *E.coli* enterohemorrágica (*E.coli* O169:H41) es una de las bacterias más comunes causante de diarreas, y que el

numero de brotes asociados a esta bacteria ha aumentado alarmantemente en los últimos años

La **tabla 6** muestra el número de casos de enfermedades de transmisión alimentaria y la bacteria asociada a los mismos, para el año 1997. Se puede observar que la bacteria que representa el mayor número de casos es *Campylobacter*, seguido por *Salmonella* y en tercer lugar *E.coli*.

El alto número de casos de enfermedades asociadas a estas y otras bacterias ha motivado a organismos de muchos países del mundo a tomar

acciones correctivas con miras a disminuir el número de estos; de hecho, Tauxe (2002b) y Yongxing y col. (2009) señalan que en los últimos años, el escenario ha sido dramático, pero que las investigaciones han permitido avances significativos, basados mayormente en la vigilancia de los brotes y los alimentos relacionados.

Así mismo, Tauxe (2002b) señala que muchas enfermedades de transmisión alimentaria pueden ser evitadas a través de la prevención y se requerirá una serie de medidas de control a lo largo de la cadena productiva hasta llegar finalmente al consumidor.

[Escriba texto]

Tabla 6: Número de casos de ETA's y cada una de las bacterias causantes de estas anualmente en los Estados Unidos

Bacteria	Nº de casos
<i>Campylobacter</i>	1.963.000
<i>Salmonella</i>	1.342.000
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 y otras	92.000
<i>E.coli</i> enterotoxigenica	56.000
Otras <i>E.coli</i>	23.000
<i>Vibrium</i>	5.000
<i>Salmonella typhi</i>	659
<i>Vibrium Cholerae</i>	49
<i>Vibrium vulnificus</i>	47

Fuente: Tauxe (2002a)

Hasta la fecha se han descrito más de 250 ETA'S. La mayoría son infecciones ocasionadas por distintas bacterias, virus y parásitos. Entre las bacterias comúnmente reconocidas como causantes de ETA'S se encuentran especies de los géneros *Campylobacter* y *Salmonella*, así como la cepa O157:H7 de la enterobacteria *Escherichia coli* (Flores y Rojas, 2005).

3.4.- Salud Publica asociada a las ETA's

El Comité de Expertos en enfermedades transmitidas por los alimentos y las partes interesadas, se reúne varias veces al año en diferentes países del mundo. En la segunda reunión del 2008 el Comité examinó el progreso de la Organización Mundial de la Salud en la estimación de los grupos de referencia para la valoración de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos y la carga microbiana de los alimentos causantes de enfermedades entéricas, parasíticas, químicas y tóxicas (Senior, 2009). En lo que a esto concierne Hird y col., (2009) aseguran que las ETA's y las muertes causadas por ETA's son una constante amenaza para la salud pública a nivel mundial.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) conjuntamente con el Departamento de Seguridad Alimentaria y de Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria has desarrollado una iniciativa para evaluar los riesgos mundiales de ETA's (OMS, 2009).

Las OMS, (2002) se ha planteado una estrategia global de inocuidad de los alimentos a través de tres principales líneas de acción:

[Escriba texto]

- Promoviendo y apoyando el desarrollo de sistemas sostenibles e integrados de inocuidad de alimentos fundamentados en riesgos.
- Formulando medidas fundamentadas en ciencia a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria que prevengan la exposición a niveles inaceptables de agentes microbiológicos y de productos químicos en los alimentos.
- Evaluando y gestionando los riesgos de transmisión alimentaria y comunicando información, en cooperación con otros sectores y aliados.

Estas estrategias están siendo tomadas en cuenta mundialmente dados los altos reportes de incidencia de ETA's de diferentes etiologías y el número de muertes que se suceden como consecuencia de estos brotes (**figuras 6 y 7**).

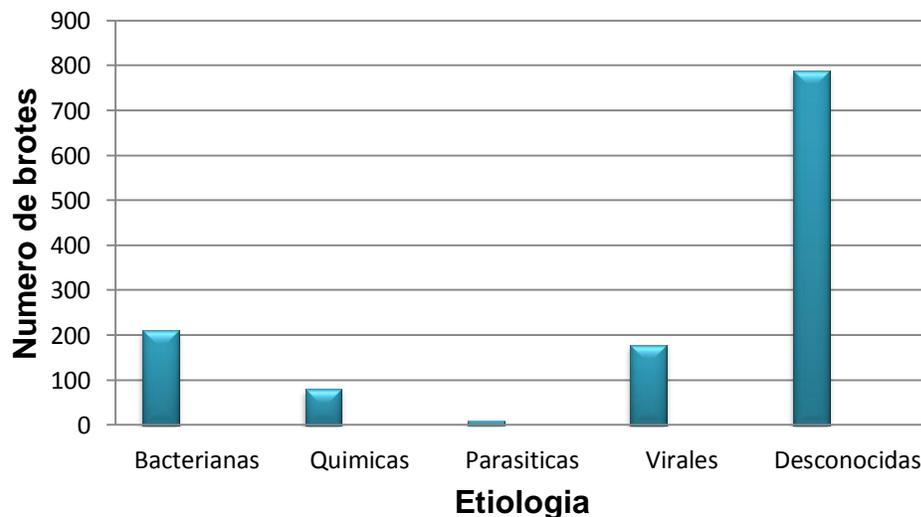


Figura 6: Etiología de las enfermedades relacionadas con los alimentos

Fuente: McCabe y Beattie, (2004)

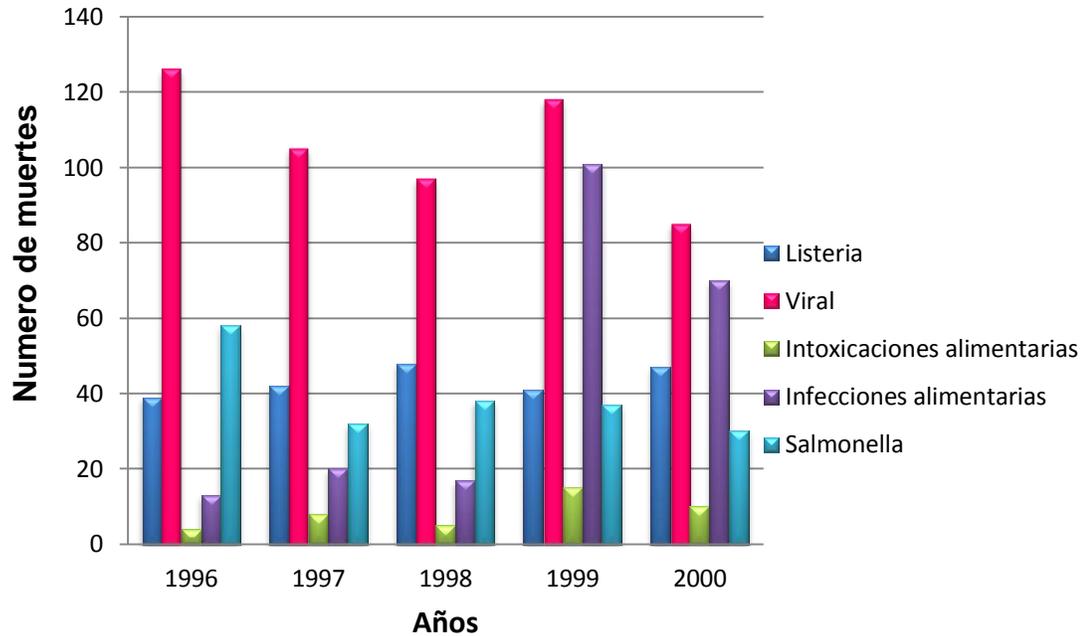


Figura 7: Mortalidad asociada con las ETA's

Fuente: McCabe y Beattie, (2004)

En las **figuras 6 y 7** se puede observar que el mayor número de brotes así como el mayor número de muertes, están asociados a la presencia de bacterias y virus siendo estos los más factibles de transmitir a través de los alimentos, por estar en muchos casos presentes en las fuentes naturales (contaminadas con microorganismos), y además los alimentos en muchas ocasiones son manipulados por personas que en la mayoría de los casos transmiten dichas enfermedades a los alimentos y en definitiva estos microorganismos llegan hasta individuos sanos que finalmente sufren de ETA's.

Según McCabe y Beattie (2004), los brotes de ETA's son el resultado del manejo inadecuado de los alimentos, comenzando por las temperaturas de

tratamientos térmicos y/o refrigeración, y por otra parte la mala higiene personal o higiene deficiente de los trabajadores que manipulan alimentos (**Figura 8**)

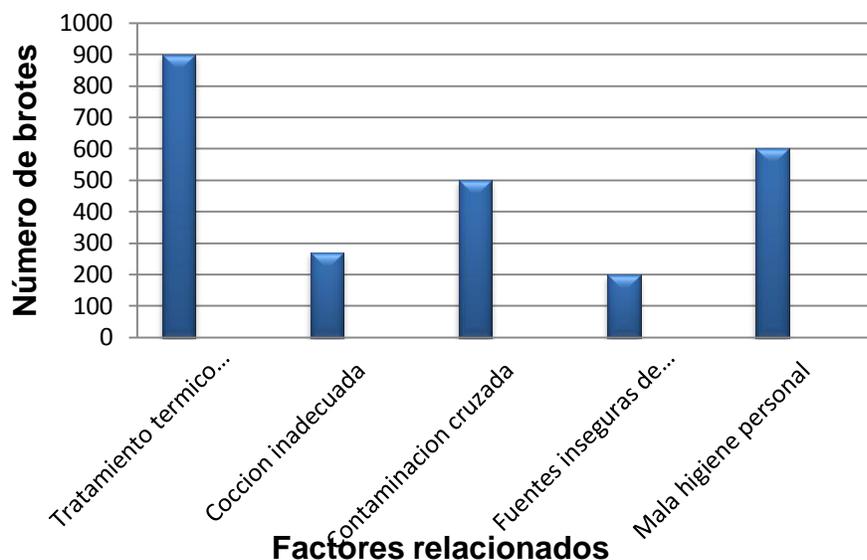


Figura 8: Número de brotes de ETA's relacionados con diferentes factores

Fuente: McCabe y Beattie, (2004)

Después de observar y analizar las cifras expresadas en las **figuras 6,7y 8**, no podemos despreocuparnos del tema de la inocuidad e higiene de los alimentos, ya que si bien es cierto que existe una flora bacteriana naturalmente asociada a ellos, también es indiscutible que es necesario mantener las poblaciones de dichos microorganismos en un límite mínimo, que garantice la no infección alimentaria tras el consumo de los alimentos. En nuestro país existen amplias zonas de producción de moluscos bivalvos, siendo estos manipulados artesanalmente, inclusive expendidos sin tomar en cuenta normas de higiene mínimas, lo que induce a un alto riesgo de los consumidores a contraer una enfermedad de transmisión alimentaria

[Escriba texto]

Según Lhafi y Kühne (2007), la significancia de la contaminación de los moluscos y de las zonas de crecimiento de estos, sobre la salud pública va a depender del estado de salud del consumidor, de la patogenicidad del Microorganismo y de la concentración del microorganismo en el alimento.

Así mismo Yamamoto y col. (2008), aseguran que la cadena de producción debe ser tomada en cuenta para poder evaluar los peligros, en la **figura 9** se sintetizan esquemáticamente los riesgos en cada eslabón de la cadena productiva de moluscos.

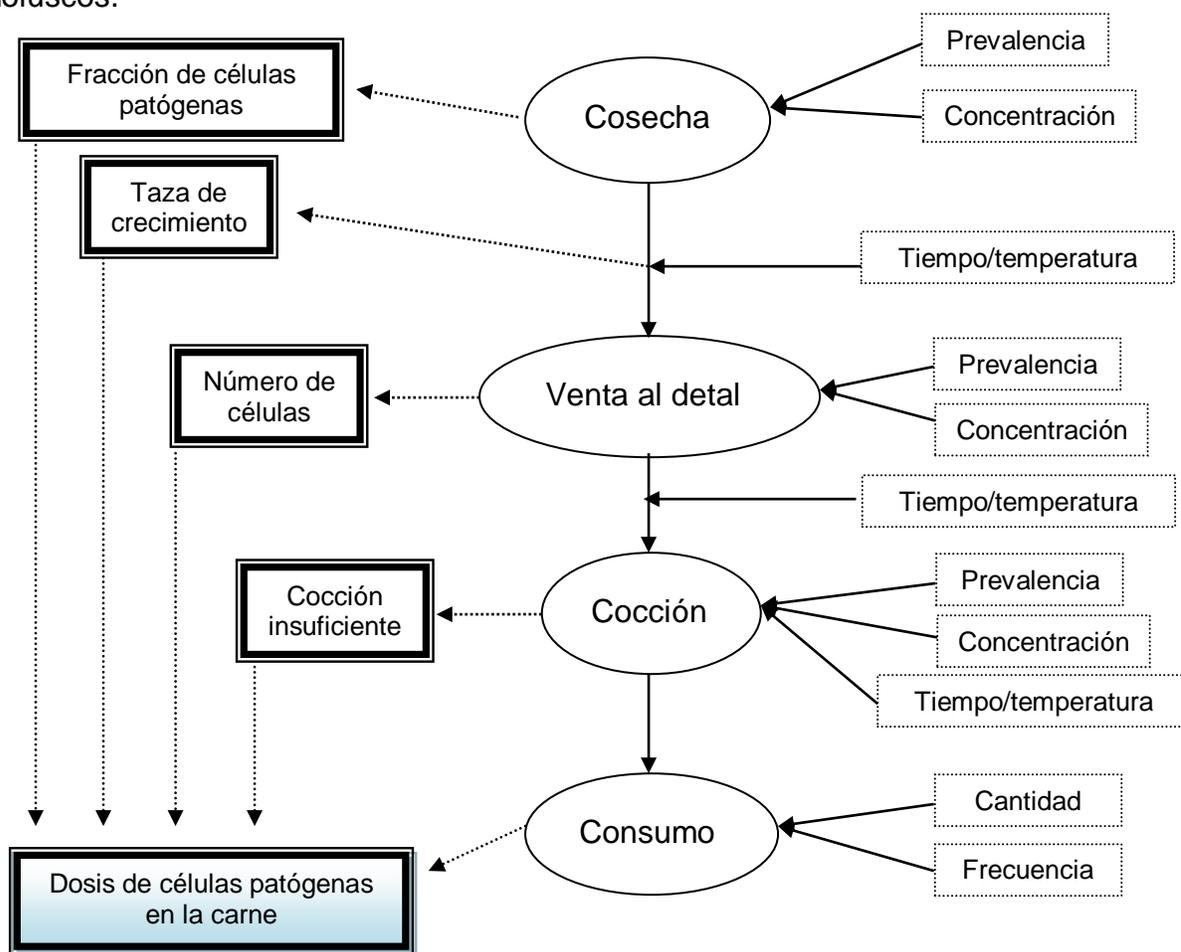


Figura 9: Representación esquemática del modelo de los riesgos desde la cosecha hasta el consumo de moluscos

Fuente: Yamamoto y col. (2008)

Es por ello que Marvin y col. (2009) apoyan el principio holístico de desarrollo de sistemas de predicción de alerta temprana, basándose en la idea de que no se puede fragmentar la cadena alimentaria en partes, que no deben estudiarse por separado, sino que es necesario verla como un todo para poder predecir el desarrollo de peligros relacionados a los alimentos.

La disponibilidad de alimentos inocuos, mejora la salud de las personas y es un derecho humano básico. Además una alimentación sana contribuye a la salud y la productividad y proporciona una plataforma eficaz para el desarrollo y la mitigación de la pobreza (Schlundt, 2002).

En muchos países la vigilancia de la salud pública ha tomado importantes lugares y se basa en un círculo de medidas preventivas y de control que se perfilan para la disminución del número de brotes y además para el aumento de la confianza de los consumidores de alimentos.

Por otra parte la ocurrencia reiterada de enfermedades bacterianas, aumenta la probabilidad de que sigan presentándose y aumentando el número de casos de este tipo, por lo que se hace preponderante la necesidad de aplicar medidas preventivas y de control que disminuyan la presencia de microorganismos patógenos del humano en los ambientes naturales (donde se producen los alimentos), en las agroindustrias (donde se manufacturan los alimentos), e inclusive en el hogar (donde se preparan los alimentos) ya que en muchos de los casos es la cocina el lugar en el que se desarrollan muchas bacterias.

En cuanto a este tema Jackson y col. (2007) mencionan que aunque los restaurantes, hoteles y sitios de comida rápida son los lugares mayormente relacionados con brotes de ETA's, son los hogares los que reportan más del 28% de los casos, por el hecho de que la población se alimenta 3 veces al día de esta fuente, mucho más en promedio que en fuentes externas (hoteles, restaurantes y sitios de comida rápida).

Si realizamos una reflexión de la idea expresada en el párrafo anterior, es razonable pensar que las causas a las que podríamos atribuirle ese alto porcentaje de enfermedades reportadas de haber sido adquiridas en el hogar, pueden ser: la contaminación cruzada por el almacenamiento inadecuado de los alimentos dentro de los refrigeradores, las fluctuaciones de temperatura a las que son sometidos los alimentos, una cocción inadecuada o insuficiente de los mismos, y por sobre todas las anteriores, las medidas de higiene que en muchos casos son desconocidas por las amas de casa.

Las actitudes en materia de seguridad e higiene de los alimentos suelen variar de país a país e inclusive dentro de un mismo país.

Tauxe (2008) asegura que, al entrar en el siglo 21 el reto de las ETA's sigue siendo variado. Debemos esperar nuevos agentes patógenos para ser identificados que pueden contaminar a los alimentos de manera sorprendente. Como la demanda de los alimentos varía durante todo el año, aumenta el comercio transnacional de alimentos producidos en lugares distantes, se hace muy importante la colaboración multinacional sobre la detección y respuesta a los brotes alimentarios.

[Escriba texto]

Si un país o región detecta un problema que puede ser causado por una práctica de producción deficiente en otro país, es probable que se beneficie la salud pública de los países involucrados al efectuar una investigación conjunta y una difusión general de los resultados.

Los objetivos en salud pública han sido tradicionalmente del tipo “Tan bajo como sea posible”, donde la gestión se centra en que las industrias alcancen un cierto nivel microbiano o en un enfoque de educación para los productores y consumidores de alimentos. Según Todd (2004), los estándares microbianos para las industrias se establecen inicialmente en cifras alcanzables y conforme la industria va mejorando sus procesos, este nivel se va disminuyendo con la finalidad de asegurar la inocuidad de los alimentos que allí se producen, aumentando así la seguridad y confianza del consumidor.

Es importante acotar que estos niveles de tolerancia nunca pueden ser “cero” para la mayoría de los microorganismos, además en la producción primaria de alimentos es muy difícil eliminar la entrada de patógenos (Tauxe, 2008).

3.5.- Patógenos causantes de ETA's y su relación con el medio ambiente y el agua

Como ya se ha mencionado, muchas veces el alimento no es la causa inicial de la presencia de bacterias u otros contaminantes sino el agua en donde vive (en el caso de pescados, Moluscos y mariscos), o con la que ha sido cultivado.

[Escriba texto]

En la actualidad las investigaciones y los adelantos en las ciencias de los alimentos y la salud, como en muchos otros campos, ha permitido que el hombre conozca más certeramente la causa de muchas enfermedades y las verdaderas fuentes de estas; tal es el caso de las ETA's, que inicialmente se creía podían ser causadas por el alimento en sí, hoy en día se conoce que son causadas por microorganismos patógenos que llegan a estos por vías no deseadas como contaminación por mala manipulación y en muchos de los

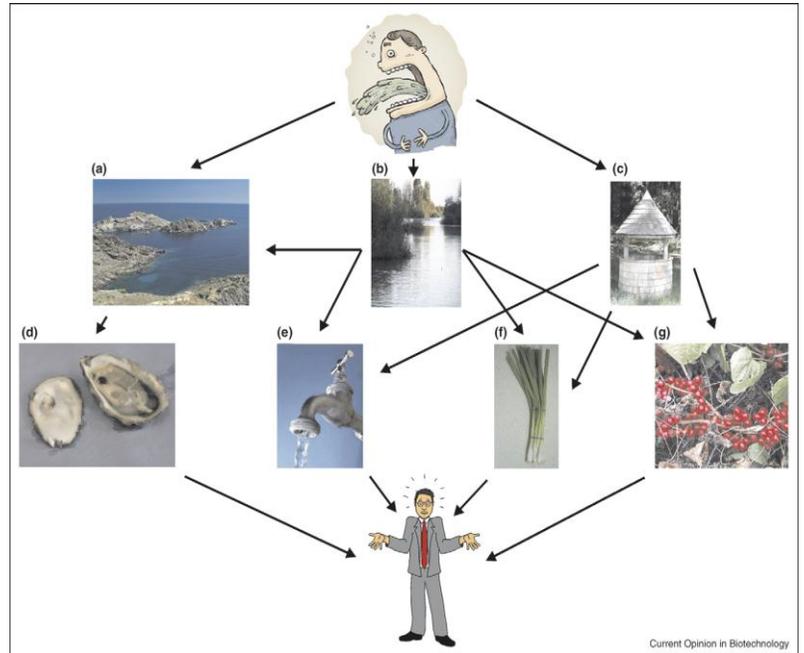


Figura 10: Posibles rutas de transmisión de bacterias entéricas
Fuente: Bosch y col. (2008). Modificado
 a)Mares, b)Lagos, c)Pozos, d)Moluscos bivalvos, e)Agua corriente, f)Vegetales y g)Frutas

casos directamente del ambiente (**figura 10**) en el que se producen los alimentos; es decir, del suelo o el agua de riego en el caso de frutas y vegetales, y directamente del agua en el caso de los alimentos de origen marino; sobre todo en la actualidad donde las aguas se encuentran altamente contaminadas como consecuencia de las actividades humanas.

La **figura 10** muestra las diversas fuentes a partir de las cuales los seres humanos podemos adquirir bacterias patógenas que nos induzcan una enfermedad, de allí la importancia de la prevención en la ingestión tanto de alimentos como de agua; además se hace inminente la necesidad de evitar la contaminación de los

La **figura 10** muestra las diversas fuentes a partir de las cuales los seres humanos podemos adquirir bacterias patógenas que nos induzcan una enfermedad, de allí la importancia de la prevención en la ingestión tanto de alimentos como de agua; además se hace inminente la necesidad de evitar la contaminación de los

[Escriba texto]

cuerpos de agua mundial, ya que estos son utilizados en la producción de alimentos, y una contaminación del agua redundara en la contaminación de los alimentos que esta ingiriendo la población.

Bosch y col., (2008) aseguran que, cuando hablamos de contaminación de los alimentos, son muchas la fuentes de las cuales esta puede provenir; por ejemplo, cuando el alimento es de origen marino el agua suele ser la fuente principal de contaminación o la razón principal por la cual los alimentos de este tipo, suelen ser problemáticos para la salud, ya que muchas veces el tratamiento de las aguas residuales no asegura la remoción completa de contaminantes.

Miraglia y col., (2009), indican que particularmente en el caso de las bacterias, la conexión entre agua-alimento es importante. Es muy conocido que los peces y mariscos que se desarrollen en aguas contaminadas, tienen mayor potencial de riesgo de producir una enfermedad, y en el caso de las frutas y vegetales la contaminación se da por el agua de riego.

En torno a esto Umbuzeiro y col, (2006) y Fleming y col, (2006) señalan que ha habido un creciente reconocimiento de la interrelación entre la salud humana y los océanos. Tradicionalmente, el foco de la investigación y la preocupación ha sido sobre el impacto de las actividades humanas en los océanos, en particular a través de la contaminación antropogénica, además del efecto de estas sobre la salud.

Existen microorganismos naturalmente presentes en el medio ambiente acuático como son los *Vibriums*, especialmente *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (Lee y col, 2002; Lee y col, 2003; F Harwood y col, 2004; Baffone y col,

[Escriba texto]

2005; Castañeda y col, 2005; Fleming y col, 2006; Parveen y col, 2008; entre otros), y otros que llegan a los cuerpos de agua por causa de la contaminación producida por las actividades humanas, como las bacterias entéricas entre las que podemos enumerar *E. coli* y *Salmonella* (Fiandrino y col, 2003; Webster y col, 2004; Neill, 2004; Martínez y Liebana, 2005; Riou y col, 2007, entre otros).

El hecho de que los cuerpos de agua estén cada vez más contaminados tiene severas implicaciones en la salud de quienes hacen uso de ellos de diferentes maneras, bien sea consumiendo el agua, utilizándola para el riego de los cultivos, para recreación o para la pesca.

La contaminación fecal de fuentes: humana, de animales domésticos, ganado o fauna silvestre, es a menudo uno de los principales factores asociados a la urbanización que contribuye con la degradación de la calidad del agua. Los métodos para poder diferenciar la contaminación por coliformes de fuente animal o humana, podría ayudar a desarrollar estrategias para proteger las zonas de pesca y de recreación (Webster y col, 2004).

Por lo antes expuesto se ha investigado considerablemente sobre la contaminación fecal de los cuerpos de agua y la influencia que esta pueda tener sobre la salud humana, inclusive cuales son las zonas y épocas del año en las que se sufre mayor riesgo.

La supervivencia, multiplicación o potencial transmisión de las bacterias en el medio ambiente y alimentos, está influenciado por la temperatura, precipitación y humedad, pero otros factores tales como el viento también pueden afectar. Además,

[Escriba texto]

muchos agentes patógenos bacterianos encontrados en los alimentos están en todas partes, en particular, en las granjas y en los ambientes acuáticos (Isaacson y col., 2004).

La supervivencia de los patógenos en el medio ambiente es importante por la posible transmisión de bacterias que puedan contaminar los alimentos y el agua. La mayoría de los virus, bacterias y protozoarios que causan enfermedades transmitidas por alimentos crecen en el agua y clima caliente. Por tanto, el aumento de la temperatura del aire y el agua podría estimular el aumento de la circulación de patógenos dañinos. Por ejemplo, se sabe que el clima influye en la supervivencia a través de factores tales como la temperatura, y la difusión de agentes patógenos, a través de la precipitación y la escorrentía. Este escurrimiento contaminado se vierte directamente en cuerpos de agua o pasan a través del suelo y contaminan las aguas subterráneas y pozos de agua de beber. Entonces, los cambios en la precipitación, temperatura, humedad, la salinidad y el viento tienen un efecto importante sobre la calidad del agua y en consecuencia, puede aumentar el riesgo de eventos de contaminación (Gantzer y col. 1998, Wetz y col. 2004, Castañeda y col. 2005).

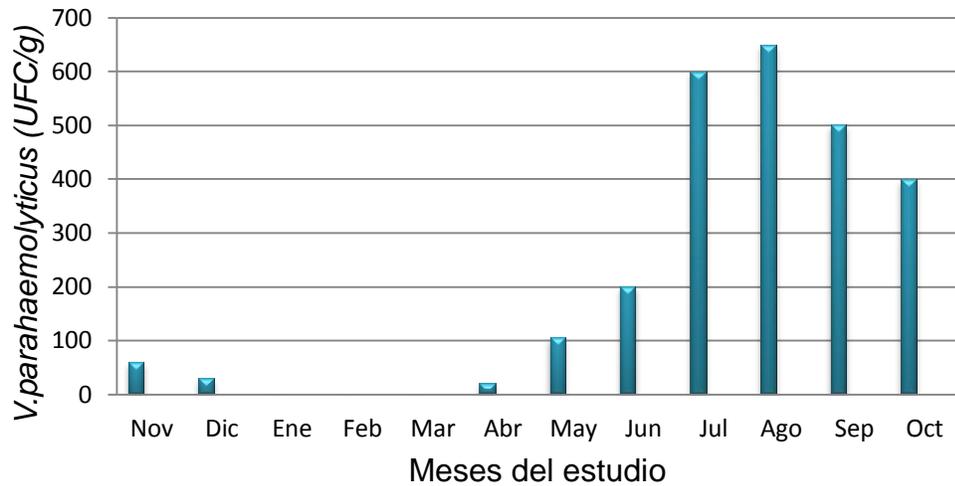
En torno a esto Riou y col. (2007), realizaron un estudio en la Península de Cotentin (Francia), en el que estudiaron la calidad microbiológica del agua y mariscos que crecen en estas, durante varias épocas del año. La investigación abarca un importante estudio de la zona muestreada, en la que se especifica la gran cantidad de actividades que se desarrollan alrededor de este cuerpo de agua. Son dos los ríos que desembocan en esta península, además de esto, existe una importante actividad

agrícola, así como una planta de tratamiento de agua que descarga las aguas tratadas en el sitio bajo estudio; por otra parte, en la península se halla también una granja de cría de mariscos. Estas condiciones, a parte de la población que hace vida en este sitio, son factores potenciales de contaminación. A partir de la investigación concluyeron que la calidad microbiológica del agua era clasificación A (<230 E. coli/100 g) en el 94% de las muestras (de acuerdo con las exigencias Europeas, no así los mariscos, que durante la época de lluvias concentraban mayor cantidad de microorganismos debido al arrastre de materia hasta su zona de crecimiento).

Existe evidencia científica de que los cambios climáticos determinan una cierta estacionalidad de la población de microorganismos patógenos en los cuerpos de agua. En torno a esto Castañeda y col. (2005), realizaron un estudio en Veracruz (México), en el que cuantificaron la presencia de *V. cholerae non-01*, *V. cholerae 01 Inaba*; encontrando resultados similares a los que en el 2008 obtuvieron Parveen y col., en los que las poblaciones más altas de *V. parahaemolyticus* se cuantificaron en los meses de julio a octubre y las menores a partir de Noviembre y hasta abril; estableciendo que los niveles totales de *Vibriums* muestran un ciclo estacional asociado principalmente a la temperatura del agua. Por ello Fleming y col. (2006) aseguran que los factores climáticos están intrínsecamente ligados a muchas aéreas de la salud humana, siendo los principales factores las variaciones ambientales, la temperatura, las precipitaciones y los vientos; ya que todos estos factores físicos interactúan con factores biológico que promueven el desarrollo de un alto número de poblaciones de microorganismos patógenos en el medio ambiente.

[Escriba texto]

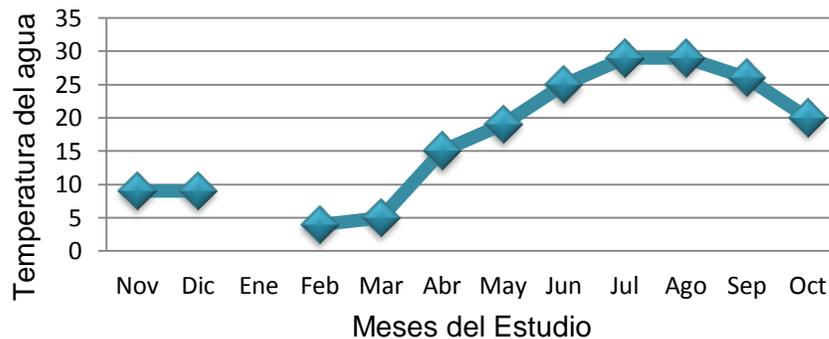
Por su parte Parveen y col. (2008) estudiaron la relación de la temperatura del agua con la presencia de *V. parahaemolyticus* en ostras, con la finalidad de establecer si existe o no una estacionalidad, para el crecimiento de ciertos microorganismos, los resultados del estudio se muestran en las **figuras 11 y 12**.



Nota: en Enero no hubo estudio

Figura 11: Carga de *V. parahaemolyticus* en ostras en la Bahía Chesapeake (Estados Unidos)

Fuente: Parveen y col, (2008)



Nota: en Enero no hubo estudio

Figura 12: Temperatura del agua en la Bahía Chesapeake (Estados Unidos)

Fuente: Parveen y col, (2008)

[Escriba texto]

En las **figuras 11 y 12** se observa claramente la íntima relación que tiene los factores medioambientales con la población de microorganismos, motivado a que el aumento en la temperatura del agua favorece el desarrollo de la materia orgánica que sirve de sustento para las bacterias que en ese cuerpo de agua se desarrollan.

Los cambios climáticos también ejercen su efecto sobre las aguas del planeta, ya que conjuntamente con las variaciones de temperatura, también se afectan otros factores como las condiciones físico-químicas y biológicas de las aguas. Con el calentamiento no solo de las aguas sino del clima, se favorece el desarrollo y supervivencia de microorganismos como virus, bacterias y protozoarios, incrementándose así la incidencia de enfermedades (Miraglia y col., 2009).

Las bacterias fecales se utilizan como indicadores de contaminación fecal, habitualmente para evaluar la calidad sanitaria del agua donde crecen los moluscos. Esto ha tenido éxito en la prevención de infecciones por moluscos contaminados con bacterias fecales. Estas, como grupo, se proponen como el más fiable, eficaz y significativo indicador de la vigilancia del medio ambiente (Umesha y col., 2008).

En concordancia con lo estudiado por Castañeda y col, (2006) y Parveen y col, (2008); Umesha y col, (2008) encontraron que las bacterias fecales han demostrado una cierta estacionalidad relacionada con los factores ambientales y físico-químicos del agua en el que crecen los moluscos bivalvos (**ver figuras 13 y 14**).

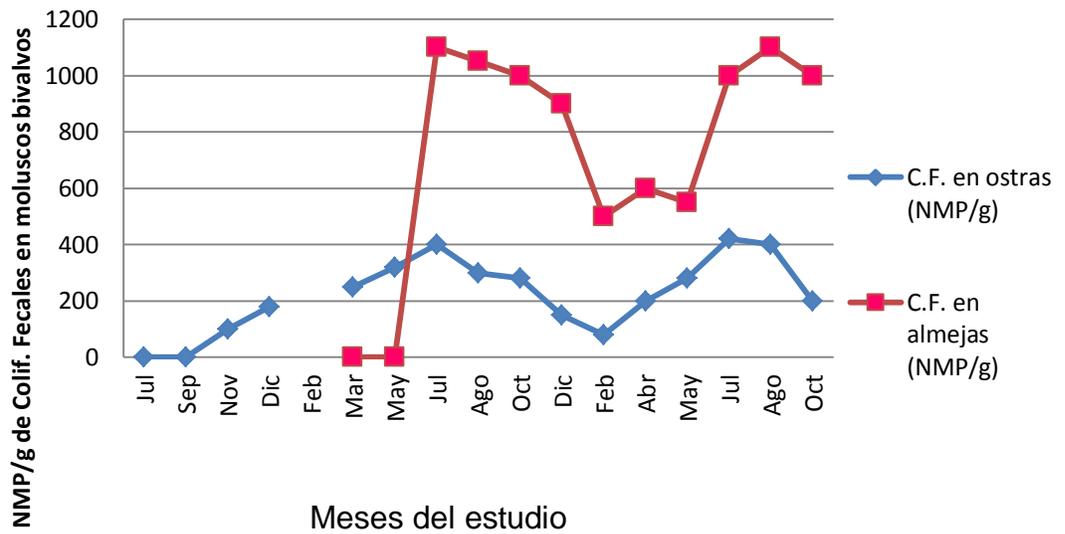


Figura 13: Número más probable de coliformes fecales en moluscos bivalvos en India.

Fuente: Umesha y col. (2008).

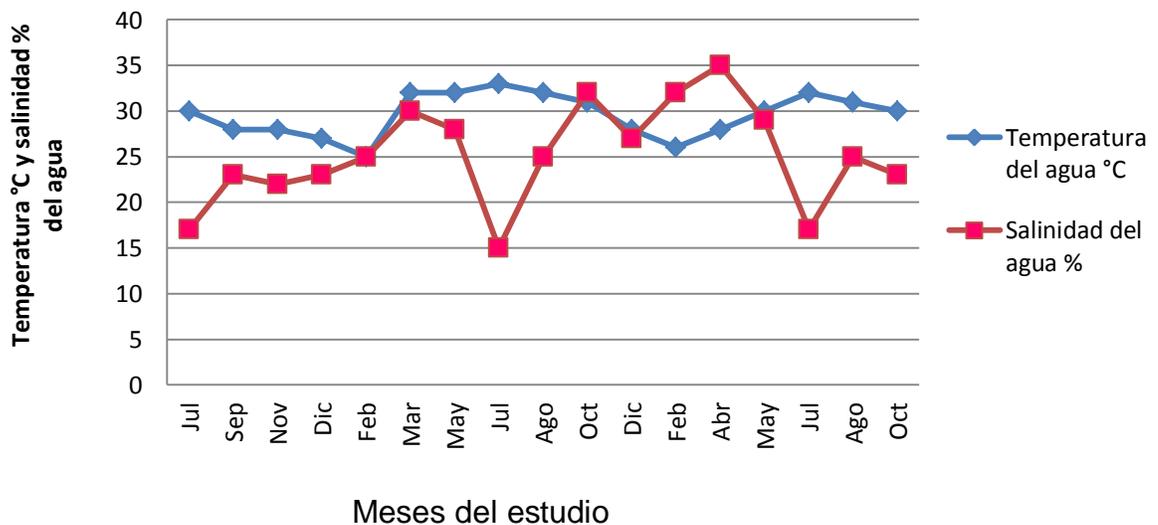


Figura 14: Parámetros medioambientales en el sitio muestreado en India

Fuente: Umesha y col., (2008).

En las **figuras 13 y 14** se puede observar que la estacionalidad de las bacterias está influenciada por un ligero incremento en la temperatura y que no así se relaciona con la salinidad del agua. Aunque las bacterias muestran una marcada estacionalidad (de mayo a diciembre), la salinidad del agua no varió significativamente durante el periodo del muestreo. Según los investigadores la contaminación con coliformes fecales aumento de manera significativa cuando la precipitación aumentó la escorrentía del rio sobre el mar.

Resultados similares habían sido demostrados por Chigbu y col, (2005), a través de su estudio realizado en el Golfo de México en aguas estuarinas, en las que determinaron la temperatura y la salinidad del agua al mismo tiempo que determinaban la carga de coliformes fecales en las mismas muestras, hallando que los microorganismos presentaban sus máximas poblaciones (Número más Probable/g) en los meses en los que la temperatura alcanzaba valores altos y la salinidad sus mínimos valores.

Las fluctuaciones estacionales de los factores meteorológicos (como por ejemplo temperatura y precipitación) influyen la presencia en el medio ambiente de patógenos acuáticos y transmitidos por los alimentos, y la incidencia de enfermedades de humanos y animales (Tauxe, 1997).

La vigilancia de las aguas costeras para la recreación, el cultivo de moluscos, y otras actividades con relevancia para la salud humana, incluye el seguimiento de la contaminación fecal. Mientras el agua represente un riesgo para la salud de los seres humanos, la contaminación fecal de fuentes humanas representa un peligro particular, ya que pueden contener agentes patógenos que

[Escriba texto]

específicamente infectan a los humanos. Aunque la detección convencional de indicadores de contaminación fecal, *E. coli* y enterococos intestinales, es sencillo, los indicadores bacterianos no proporcionan información sobre el potencial origen de la contaminación (Hsu y col., 2009).

El problema con las bacterias patógenas es complicado por el hecho de que muchas de ellas pueden sobrevivir por largos periodos y multiplicarse en el medio, por ejemplo los patógenos acuáticos y las bacterias transmitidas por los alimentos tales como *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp, (McGee y col., 2002; LeJeune y col., 2001).

3.6.- Bacterias relacionadas con la calidad de los alimentos de origen marino

Según Suarez y col., (2007), las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S) se clasifican en: las producidas por microorganismos y sus toxinas (bacterias patógenas, protozoos, otros parásitos y virus), toxinas naturales (aflatoxinas, ciguatoxinas), e intoxicaciones por químicos (metales pesados, plaguicidas y otros).

Una amplia variedad de alimentos, pueden comportarse como vehículo para la transmisión de bacterias, por ejemplo los productos que se comercializan y consumen frescos están repetidamente implicados en este tipo de situaciones (Abuxapqui y col., 1996; Parilla y col., 1993; Sarcos y Botero, 2005; Martínez y Villalobos, 2005; Rojas y González, 2006; Wambier y col., 2008, entre otros).

[Escriba texto]

La calidad microbiológica de los alimentos está condicionada, primero por la cantidad y el tipo de microorganismo inicialmente presente, y después por la multiplicación de estos dentro del alimento (Hoffmann, 2001).

Los moluscos bivalvos son mundialmente conocidos como un importante vehículo de enfermedades de transmisión alimentaria, son animales que se alimentan por filtración, llegando a circular por su tracto digestivo varios litros diarios de agua de mar (Laing, 2004), si el agua está contaminada con microorganismos patógenos, estos pueden acumularse alcanzando importantes niveles (Crocini y col., 2007).

Los moluscos bivalvos representan unos de los alimentos marinos de mayor consumo en el mundo. En Venezuela y en especial en las zonas costeras, la comercialización de este rubro alimenticio es hecho de forma industrial o tradicional, y se ubica entre unas de las principales actividades económicas de los estados ubicados en la costa (Martínez y Villalobos, 2005). La capacidad de los moluscos bivalvos de concentrar y acumular materiales del ambiente, constituye un riesgo potencial para la salud del consumidor. Varios agentes etiológicos de enfermedades en humanos, pueden ser arrastrados dentro de los materiales que pueden ser acumulados por estos organismos.

Los moluscos bivalvos se distribuyen en las zonas tropicales y templadas, se encuentran desde el nivel de las mareas hasta profundidades de 40 m. Sin embargo, son organismos que prosperan principalmente en aguas poco profundas (Téllez y col., 1999). Por ejemplo en Venezuela en la zona de Tucacas (Edo. Falcón), como en

[Escriba texto]

otras zonas, las aguas reciben descargas de la zona urbanizada que se encuentra a lo largo del parque nacional Morrocoy, aguas que están altamente cargadas de microorganismos provenientes de la actividad humana, entre las que encontramos a las enterobacterias como: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Salmonella*, entre otras (Aguado y Lumbreras, 1998; Villalobos y Elquezabal, 2001).

3.7.- Presencia de bacterias causante de ETA's en moluscos bivalvos.

La investigación científica ha permitido tanto a los expertos como a la población, conocer los riesgos que puede implicar a la salud el consumir alimentos con una alta carga microbiológica. El caso de los moluscos bivalvos es un punto al que debe prestarse especial atención, ya que estos en muchos casos se consumen crudos o realizándoles una cocción mínima, por lo que son más propensos a fungir como vehículo de bacterias y otros microorganismos patógenos al humano. Por otra parte cuando consumimos moluscos bivalvos, el riesgo de contaminación es mayor ya que estos organismos a través de su proceso natural de filtración de los alimentos, concentran en su tracto digestivo, el material que absorben del agua que los circunda, incluyendo los microorganismos patógenos que en ella coexistan.

Es por ello que las investigaciones sobre este tema se han venido desarrollando significativamente durante los últimos años, con la finalidad de poder alertar sobre el consumo de este tipo de alimentos, ya que es necesario poder concebir que si el cuerpo de agua en el que se desarrollan los moluscos está

contaminado, lo más seguro es que también lo estén ellos; entonces lo que se quiere es que la población adquiriera un poco más de conciencia sobre la conservación del medio ambiente a través del entendimiento de las consecuencias que puede tener sobre su salud y la contaminación que los seres humanos a través de sus actividades diarias, pueden generar sobre el ambiente.

La ingestión de moluscos bivalvos ha sido frecuentemente asociada con enfermedades infecciosas. Debido a los riesgos de salud inherentes a su consumo, muchos países han desarrollado reglamentos basados en el análisis microbiológico del agua y de los moluscos (Silva y col., 2003). La mayoría de estos reglamentos se basan en los recuentos de coliformes indicadores de contaminación fecal (Machado y col., 2001).

3.7.1.- Presencia de *Vibrium* spp. en moluscos bivalvos.

En países con altos consumos de alimentos de origen marino, o donde los alimentos de origen marino son tradicionales, un alto porcentaje de enfermedades de transmisión alimentaria que se registra son causadas por ellos (Butt y col, 2004). Lee y col., (2003) afirman que, el efecto perjudicial de la presencia de estos microorganismos patógenos, es aumentada por el hecho de que los mariscos, en particular las ostras se consumen en forma cruda. Además en una misma muestra pueden convivir diferentes especies de patógenos (**ver figura 15**) lo cual podría empeorar la infección. En atención a ello durante un estudio donde se evaluó la presencia de *Vibrios* spp. en mejillones que crecen en el mar Waden, fueron aisladas

[Escriba texto]

86 especies de *Vibriums* (Lhafi y Kühne, 2007) pero las más frecuentemente encontradas son las que se ilustran en la **figura 15**.

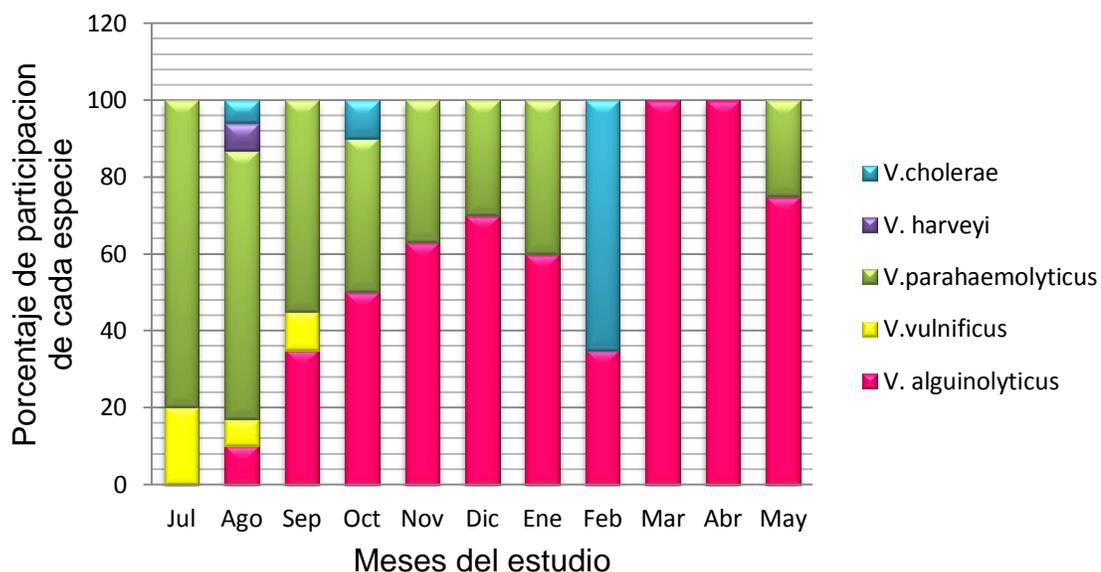


Figura 15: Porcentaje de diferentes especies de *Vibrium* aisladas en mejillones azules colectados en el Mar Alemán Waden.

Fuente: Lhafi y Kühne, (2007)

A través de la **figura 15** se evidencian los resultados obtenidos por Lhafi y Kühne, (2007), los investigadores argumentan que lo experimentado indica que *Vibriums* potencialmente patogénicos, pueden ser aislados de mejillones azules que se desarrollan en el mar Waden y que las implicaciones que esto pueda tener sobre la salud pública dependerá tanto del estado de salud de los consumidores al momento de la ingestión de este tipo de alimentos, como de la concentración y patogenicidad de los microorganismos.

[Escriba texto]

Rosec y col., (2009), durante sus investigaciones donde analizaron 9 muestras de mejillones, 39 muestras de ostras y 9 muestras de almejas, concluyeron que entre las especies de *Vibriums* la más comúnmente aislada es *V.parahaemolyticus*; resultados muy similares fueron obtenidos por Jaksie y col., (2002) los cuales evaluaron la ocurrencia de *Vibrio* spp. en pescado, camarones y moluscos bivalvos cosechados en el mar Adriático; y Colakoglu y col., (2006) quienes determinaron la ocurrencia de *Vibrios* spp. y *Aeromonas* spp. en mariscos cosechados en las costas de Turquía.

Los resultados obtenidos por muchos investigadores a cerca de la presencia de *V.parahaemolyticus* en moluscos bivalvos, se debe según lo evaluado por muchos de ellos, a que *V. parahaemolyticus* es un habitante natural de los ambientes halofíticos de las costas marinas, más específicamente de las zonas estuarinas, donde se desarrollan la mayoría de los moluscos bivalvos (Lozano y col., 2003; Di Pinto y col., 2008; Yamamoto y col., 2008).

Aunque la especie de *Vibrio* más usualmente aislada de moluscos bivalvos es el *V.parahaemolyticus*, existen otras especies que aunque en menores proporciones se ha determinado su presencia en este tipo de alimentos como lo es *V. vulnificus* (Stivers, 2008) y *V.campbellii* (Williams y col., 2009), por esta razón es necesario que se controle la presencia de estos patógenos en los alimentos.

3.7.2.- Presencia de *Escherichia coli* en moluscos bivalvos.

Dentro del gran número de bacterias que pueden afectar a los seres humanos, se encuentra *E.coli*, que es una bacteria que naturalmente coloniza el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente y humanos, quizá la mayor responsable de todos los brotes de ETA's a nivel mundial; es por ello que, Silva y col., (2003), luego de un estudio en el que evaluaron la presencia de Coliformes totales y fecales en muestras de ostras; encontraron que el 40% de las muestras analizadas están ubicadas en la categoría B según los estándares Europeos, por lo que este porcentaje de las muestras debe ser sometido a purificación antes de ser consumidos; las muestras consideradas como categoría A (<230 *E. coli*/100 g), pueden ser consumidas sin tratamiento alguno; por lo que juzgan necesario que se realice una cuantificación de las bacterias fecales presentes en el músculo y líquido intervalvar, como un parámetro estándar para la evaluación de la calidad de ostras cultivadas comercialmente.

Martínez y Villalobos (2005), realizaron una investigación para caracterizar microbiológicamente ostras y pepitonas cosechadas en Cumana, Edo. Sucre, Venezuela; basándose en la carga de *E.coli* enteropatógena y no enteropatógena; tomando en cuenta la alta demanda de estos productos en la zona y la poca vigilancia de la que son objeto y del alto número de casos de gastroenteritis que se registran en las zonas costeras, los resultados de su investigación se encuentran sintetizados en las **figuras 16 y 17**.

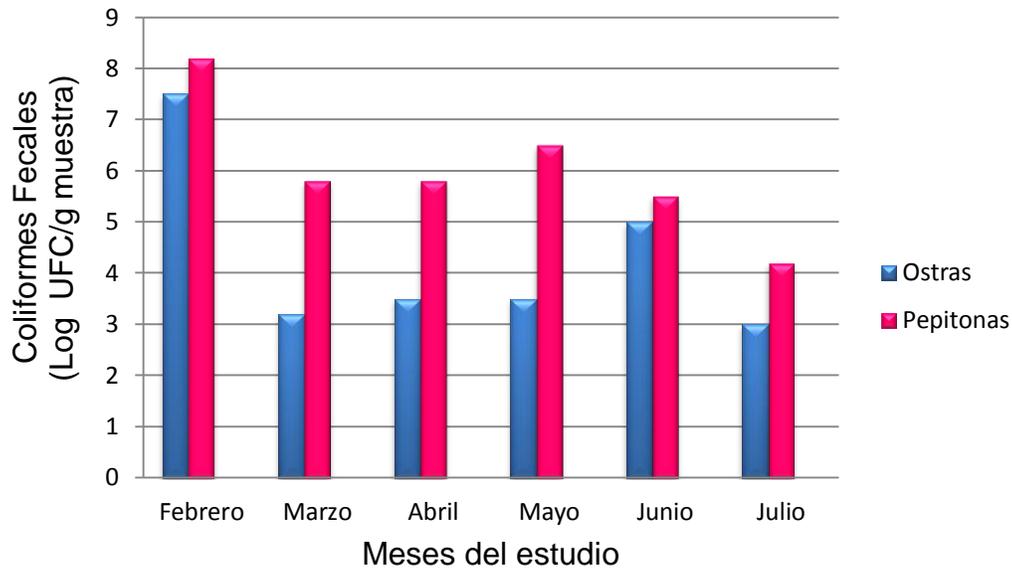


Figura 16: Coliformes fecales contenidos en muestras de pepitonas cocidas y ostras crudas, expandidas en la ciudad de Cumana, Venezuela

Fuente: Martínez y Villalobos, (2005)

La distribución promedio de bacterias coliformes mostradas en la (**figura 16**), revela valores relativamente elevados en ambos productos, lo que permite inferir que la presencia de posibles fuentes de cepas patógenas de *E. coli*, estaban presentes para el momento del estudio. Al comparar los valores obtenidos con el máximo permitido por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, 1990) que es < 23 ufc/g de bacterias coliformes fecales para moluscos bivalvos, se aprecia que ambos productos estuvieron por encima de este valor, en especial las muestras de pepitonas, las cuales luego de ser sometidas a un tratamiento previo de cocción, no debieron presentar flora natural sensible al calor.

Estos resultados sugieren que, es necesario tomar en cuenta los mecanismos de filtración y acumulación bacteriana, los cuales permiten que la flora microbiana de

[Escriba texto]

los bivalvos guarda una relación directa con el tipo y número de microorganismos presentes en el (Cakir y col., 2001; Li y col., 2009).

Villalobos y Martínez (2005) indican que también es cierto que existe la posibilidad de un proceso de recontaminación y proliferación de microorganismos, primordialmente en las pepitonas, en las cuales la población de coliformes fecales se expandió rápidamente posterior al proceso de cocción, hecho evidente en el análisis microbiológico de este producto marino.

Luego de analizar los resultados las investigadoras procedieron a determinar la carga específica de *E.coli* enteropatógena y no enteropatógena (resultados que se muestran en la **figura 17**)

■ E.coli enteropatog. en pepitonas ■ E.coli enteropatog. en ostras
■ E.coli no patogenica

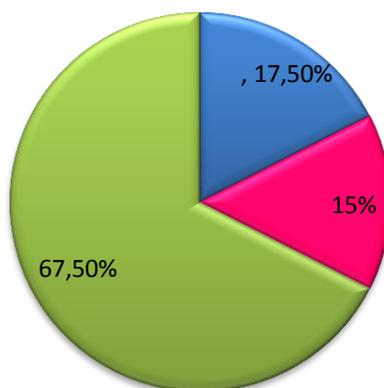


Figura 17: Distribución porcentual de *E. coli* no patogénica y enteropatógena en pepitonas Cocidas y ostras crudas expendidas la ciudad de cumaná.

Fuente: Martínez y Villalobos, (2005)

Se destaca el hecho de que en las pepitonas, el porcentaje de cepas positivas enteropatógenas fueron superiores a las halladas en las ostras crudas, lo que permite inferir que la manipulación tal como se realiza en cada uno de los expendios: sin agua potable, sin sistemas de refrigeración, falta de higiene por parte del vendedor, así como los utensilios; están afectando negativamente la calidad de cada uno estos productos marinos (Martínez y Villalobos, 2005), convirtiéndose el consumo de estos alimentos, en fuentes potenciales de brotes alimentarios (Chigbu y col., 2005; Mc Rae y col., 2005; Vernocchi y col., 2007 y Wan y col., 2009).

La abundancia y distribución de bacterias patógenas tanto en el medio ambiente como en los alimentos, va a depender de las actividades que se realicen en las adyacencias de las zonas en las que se desarrolle la actividad de producción alimentaria, así como también de la manipulación posterior a la cosecha o pesca, dependiendo del caso, inclusive las fluctuaciones ambientales como temperatura, precipitaciones y salinidad del agua han mostrado tener una fuerte influencia sobre los microorganismos que habitan el medio ambiente y que son capaces de contaminar los alimentos.

La comercialización de productos pesqueros es un punto crítico en la cadena de producción de este tipo de alimentos, ya que en estos casos, su lugar de producción es el agua, altamente contaminada en la actualidad, y además el hecho de ser alimentos altamente perecederos implica que requieran de una eficiente cadena de frío para evitar deterioro y proliferación microbiana.

3.8.- Métodos utilizados para la determinación y cuantificación de bacterias patógenas en alimentos.

El avance en la investigación científica, ha permitido desarrollar técnicas que permiten con un muy alto grado de aproximación a la exactitud, cuantificar, e inclusive identificar bacterias patógenas, no solo en los alimentos, sino en el medio ambiente.

Anteriormente las técnicas más avanzadas eran utilizadas en microbiología clínica, pero en la actualidad estas modernas técnicas son utilizadas en la mayoría de los temas relacionados con microorganismos que afectan la salud de los seres humanos y animales.

Estos avances han permitido en muchos casos mejorar la calidad de los alimentos, y en otros en los que no se ha alcanzado el objetivo de garantizar la inocuidad, por lo menos se ha logrado identificar las fuentes de la contaminación, los factores que la favorecen y además y muy importante, se ha logrado identificar los alimentos que pueden fungir como vehículos de algunas bacterias. Las metodologías se basan en protocolos establecidos, pero pueden incluirse algunas modificaciones, según el tipo de muestra, el laboratorio, el analista e inclusive el microorganismo a determinar, algunas de las técnicas más usadas son: Reacción en cadena de la polimerasa (Li y col., 2009), recuento en placas (Kural y Chen, 2008; Shen y col., 2009) y número más probable (NMP) (Prapaiwong y col., 2009).

Tabla 7: Principales técnicas de cuantificación y detección de microorganismos patógenos en alimentos

Técnica	Muestra	Microorganismo	Fuente
NMP	Ostras	<i>Vibrium</i> spp	Prapaiwong y col., (2009)
PCR	Ostras	<i>Vibrium</i> spp	Lee y col., (2003)
Recuento en placas	Ostras	<i>Vibrium campbellii</i>	Williams y col., (2009)
NMP PCR	Almejas	<i>Vibrium parahaemolyticus</i>	Yamamoto y col., (2008)
Recuentop en placas PCR	Ostras Agua	<i>Vibrium parahaemolyticus</i>	Parveen y col., (2008)
PCR	Carne Camarones Ostras Pollo Cerdo	<i>Salmonella</i> spp. <i>E.coli</i> O157:H7 <i>L. monocytogenes</i> <i>V.parahaemolyticus</i> <i>Shigella</i>	Minami y col., (2010)
NMP	Agua	<i>E.coli</i>	Webster y col., (2004); Chigbu y col., (2005)
Recuento en placas	Ostras Agua	<i>V.vulnificus</i>	Harwood y col., (2004)
Recuento en placas	Ostras	<i>V.vulnificus</i>	Kural y Chen, (2008); Mahmoud, (2009)
NMP	Ostras agua	<i>Vibrium parahaemolyticus</i>	Shen y col., (2009).
PCR	Moluscos bivalvos	<i>Vibrium parahaemolyticus</i>	Di pinto y col., (2008); Rosec y col., (2009).
Recuento en placas	Ostras	<i>Vibrium parahaemolyticus</i>	Kural y col., (2008)
Recuento en placas	Mejillones Ostras Vieiras	<i>E.coli</i> O157:H7	MacRae y col., (2005)
NMP	Mejillones	<i>E.coli</i>	Vernocchi y col., (2007)
ELISA	-	<i>E.coli</i> <i>Salmonella</i> spp. <i>Listeria</i> spp. <i>Klebsiella pneumoniae</i> . <i>Staphylococcus aureus</i>	Karoonuthaisiri y col., (2009)
Recuento en placas PCR	Ostras	<i>Salmonella typhimurium</i>	De abreu y col., (2007)
PCR	-	<i>Salmonella enteriditis</i>	Oliveira y col., (2009)

Fuente: elaboración propia

En la **tabla 7** se sintetizan las técnicas utilizadas en algunas investigaciones, las muestras objeto de estudio y el microorganismo determinado.

Como se ha mencionado dentro de las técnicas utilizadas para la detección y cuantificación de microorganismos, se pueden establecer ciertas modificaciones como el tipo de agar utilizado en el recuento en placas, el caldo en la Técnica del NMP, o el Primer en la técnica de PCR; esto debido a que hoy en día existen en el mercado un gran número de sustancias que ayudan a identificar mejor a las bacterias, como es el caso de los agares para enriquecimiento selectivo, que le proporcionan al microorganismo un medio y sustrato específico para sus requerimientos, que en la mayoría de los casos, es limitante para el crecimiento de otras bacterias, lo que permite al investigador realizar menos pruebas confirmativas, disminuyendo el tiempo y costo de los análisis.

Estas modificaciones en las técnicas, existen no solo por tratarse de diferentes microorganismos, sino que para un mismo microorganismo pueden existir condiciones diferentes, que de igual manera admiten identificarlos certeramente; por ejemplo en el caso de la técnica de PCR (técnica genética), para un mismo microorganismo puede encontrarse en el mercado diferentes cebadores (Lee y col., 2003) que se ajustan perfectamente a la cadena de ADN del microorganismo o pueden replicar de forma infalible la cadena de ADN a partir del ARN.

En definitiva, es cada vez más sencilla y eficaz la forma cuantificar microbiológicamente los riesgos asociados a los alimentos, con lo que pueden

proponerse excelentes fórmulas que ayuden a mejorar la calidad e inocuidad de los alimentos, mejorando así el problema del número de brotes causados por ETA's.

[Escriba texto]

4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Ubicación de la investigación.

La investigación fue llevada a cabo en el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV- FAGRO), la cual se encuentra localizada en las coordenadas geográficas 10° 17' de latitud norte y 77° 37' de longitud oeste a una altura de 455 msnm en Maracay, Estado Aragua.

4.2.-Toma de muestras

Se procedió a visitar las zonas de Tucacas en el estado Falcón y Ocumare de la Costa de Oro en el estado Aragua, con la finalidad de realizar una observación detallada de la zona donde se extrajeron las Ostras en las mencionadas localidades; las mismas, fueron divididas en dos zonas (zona A y zona B) cada una, de manera de asegurar una mayor representatividad (**ver figura 18**).



Figura 18: Proceso de toma de muestras

Una vez en el sitio, se tomaron 15 ostras de cada zona (en ambas localidades). Así mismo de cada zona de extracción de las ostras, se tomó una muestra de agua equivalente a 1 litro del agua circundante. Este procedimiento de toma de muestra se realizó una vez por semana durante 8 semanas consecutivas lográndose así un total de 480 ostras (240 de cada localidad, 120 de cada zona) y 32 litros de agua (16 de cada localidad, 8 de cada zona).

Las muestras de ostras fueron colocadas en bolsas plásticas estériles, y las de agua fueron tomadas directamente del mar en botellas de vidrio estériles de 1 litro de capacidad, separadas por zona en cada localidad. Estas muestras, fueron trasladadas, sumergidas en cavas con hielo al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Química y Tecnología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, para los análisis respectivos.

4.3.- Preparación de las muestras

Al llegar al laboratorio las muestras de ostras fueron lavadas con agua corriente para eliminar el exceso de material no deseable. Luego cada una de las ostras fue abierta y se extrajo el contenido, estas muestras fueron homogeneizadas en un homogeneizador Osterizer y se tomó la cantidad respectiva para la evaluación de cada microorganismo. 25 g de ostras fueron analizadas en forma fresca y 25 ml de agua para cada semana en cada una de las localidades.

4.4- Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico correspondió a la cuantificación de coliformes totales, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H, *Vibrium cholerae* y *Vibrium parahaemolyticus*; tanto en las muestras de ostras como en las muestras de agua.

4.4.1.- Preparación de las diluciones

Se realizaron diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-6}

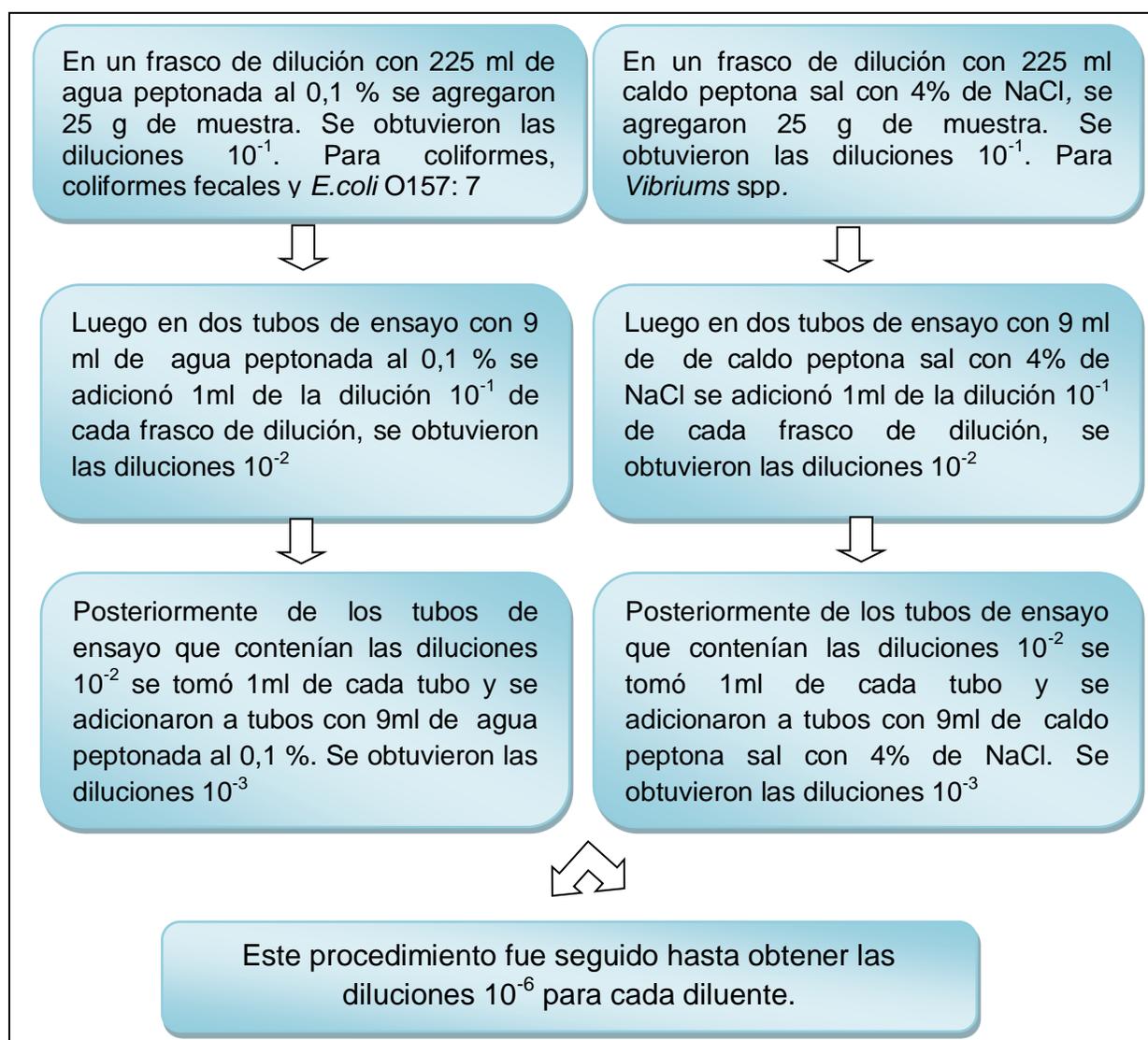


Figura 19: Metodología utilizada para la preparación de las diluciones de muestras

4.4.2.- Coliformes totales y *E. coli*

Se siguió el método de recuento en placas Petrifilm (ver figura 20) descrito en la norma COVENIN 3276:97. El medio de cultivo deshidratado que se utilizó fue el Bilis Rojo Violeta (BRV) adicionándole un agente gelificante soluble en agua fría, además del indicador 2,3,5- cloruro de trifeníl tetrazolium que permitió identificar las colonias típicas en colores rojo – azul (ver anexos A y B). Además las placas poseen un indicador colorante de glucoronidasa, que reacciona con la mayoría de las *E. coli*, el cual es el que formó un precipitado azul alrededor de las colonias.



Figura 20: Placas petrifilm para recuento de coliformes totales y *E.coli* utilizadas durante la investigación

Fuente: ficha técnica de 3M

Tomado de:

http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUmx_v58_9ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS-- [consulta: 18 de octubre de 2009]

En la **figura 21** se muestra la metodología empleada para la cuantificación de coliformes totales y *E.coli* en las muestras de agua y ostras.

[Escriba texto]

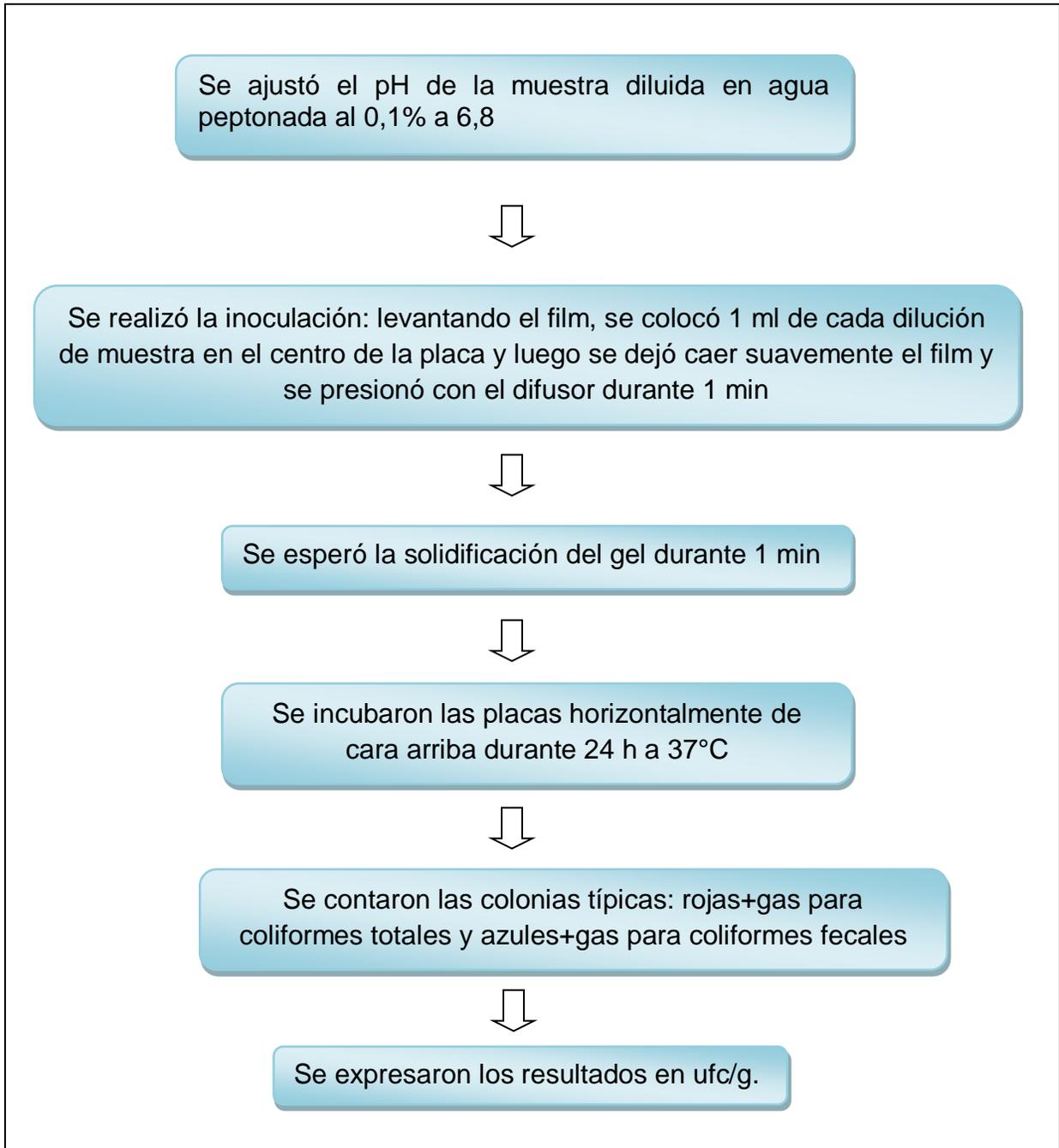


Figura 21: Metodología para recuento de coliformes totales y *E.coli*

4.4.3.- *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7)

Se determinó siguiendo la metodología de Amoroso y col., (2006), de incorporación y conteo en placas, en el que se empleó como medio selectivo Agar McConkey-Sorbitol para *E. coli* O157:H7, donde el microorganismo presentó una colonia típica de forma circular y color fucsia (**ver anexo C**).

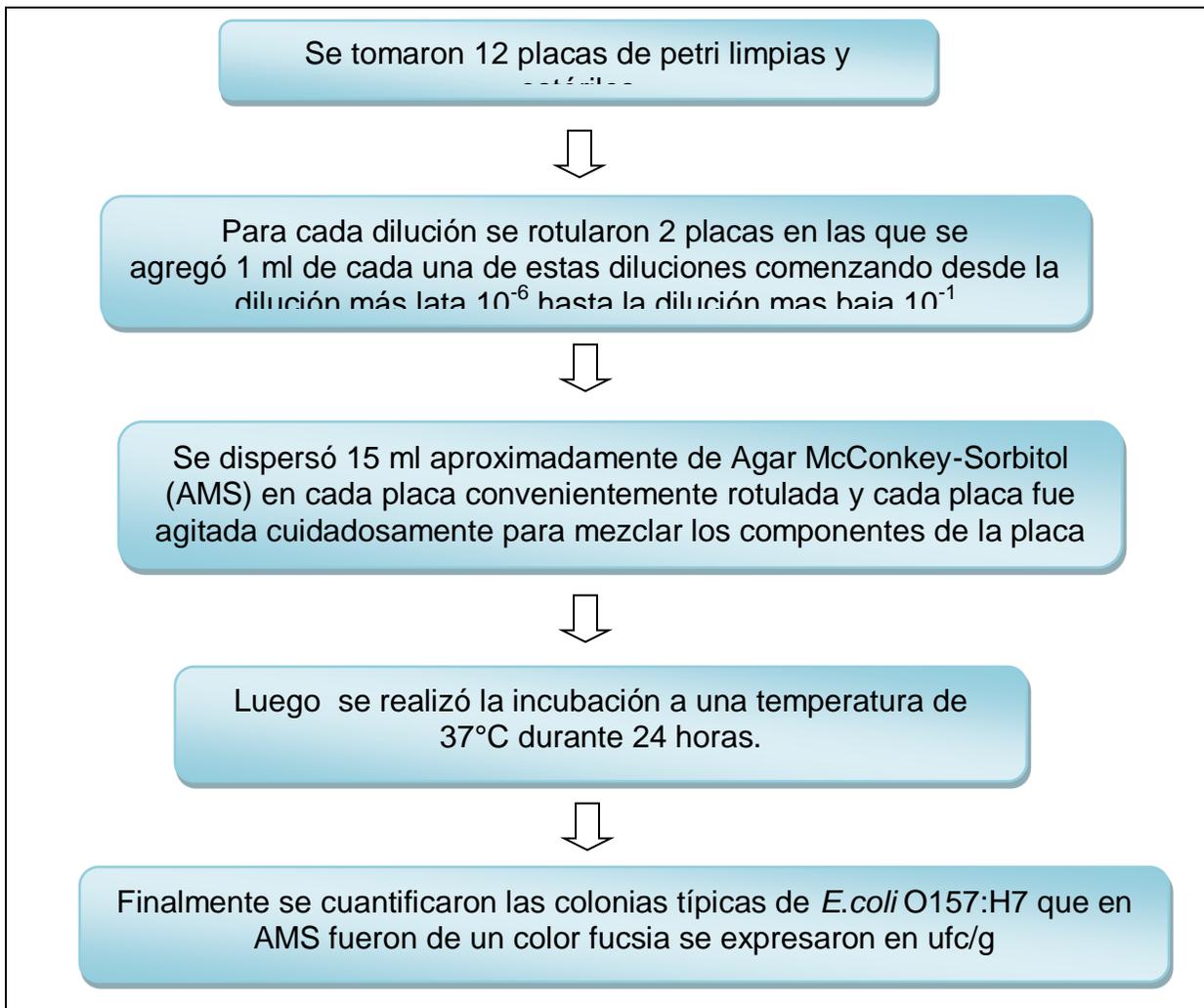


Figura 22: Metodología empleada para el recuento de *E. coli* enterohemorrágica (O157:H7)

4.4.4.- *Vibrio* spp.

Para la cuantificación de *Vibrium cholerae* y *Vibrium parahaemolyticus* se siguió la metodología de incorporación en placas en medio cólera TCBS agar (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa Agar) sugerida por Kobayashi y col. (1963) y utilizada por Harwood y col. (2004), Colakoglu y col. (2006), Kural y col. (2008) y Parveen y col. (2008). El TCBS es un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de *Vibrium cholerae*, *Vibrium parahaemolyticus* y otras especies *Vibrium* a partir de muestras de diferentes orígenes. La utilización de este medio se fundamentó en la composición del mismo ya que el extracto de levadura y la peptona proporcionan el nitrógeno y las vitaminas. El citrato sódico, el tiosulfato sódico, la bilis de buey son agentes selectivos que proporcionan un pH alcalino para inhibir los organismos gram positivos y suprimir los organismos coliformes. El pH del medio se incrementa para favorecer el crecimiento de *Vibrium cholerae* porque este organismo es sensible a los entornos ácidos. La alta concentración de sodio favorece el crecimiento de *Vibrium cholerae* que es halotolerante y de otras especies de *Vibrium*, cuya mayoría es halofílica. La sacarosa es un carbohidrato fermentable, y el cloruro sódico estimula el crecimiento. El tiosulfato sódico es una fuente de azufre y actúa con el citrato férrico como indicador para detectar la producción de ácido sulfhídrico. El azul de bromotimol y el azul de timol son indicadores de pH. El medio TCBS fue preparado según el manual de medios de cultivos de Herrera (1985).

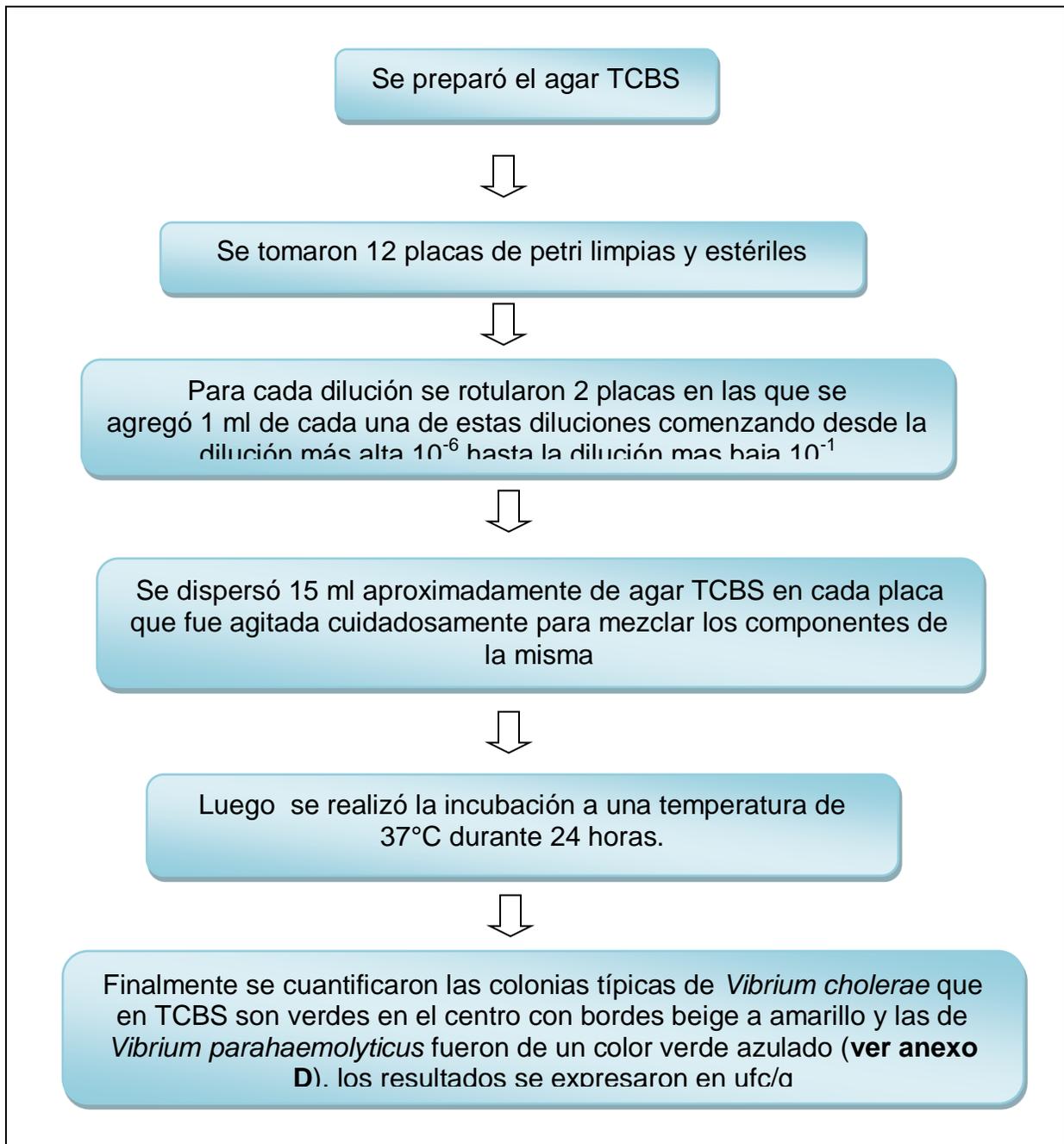


Figura 23: Metodología empleada para el recuento de *Vibrium cholerae* y *Vibrium parahaemolyticus*.

4.5.- Pruebas bioquímicas

El método más extendido para llegar a la identificación de microorganismos se basa en la realización de una batería de pruebas bioquímicas, a través de las cuales se va a detectar el metabolismo del microorganismo, enzimas que posee, características de resistencia a determinadas sustancias, etc. La identificación es mucho mejor mientras mayor es el número de caracteres investigados.

4.5.1.- Pruebas bioquímicas para *Vibrio* spp.

La identificación de las cepas de *Vibrium parahaemolyticus* y *Vibrium cholerae* (tanto de las cepas puras como de las aisladas de las muestras), se realizó a través de las siguientes pruebas sugeridas por Tatcher y Clark, (1973):

a) **Carácter halófilo:** a partir de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado, se inoculó una anzada en un tubo de caldo peptona con 3% de NaCl y se incubó a 37°C durante 18 horas.

b) **Resistencia al NaCl:** a partir de un cultivo de 24 horas en caldo peptona sal al 3% de NaCl, se inoculó una anzada en un tubo de caldo peptona sal con 7% de NaCl y otra en un tubo de caldo peptona sal al 10% de NaCl, posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas.

c) **Prueba de Hugh – Leifson:** prueba que se basa en la determinación de la fermentación oxidativa de la glucosa sin producción de gas, a través de un viraje de color de azul a amarillo. Se realizó a partir de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado, del que se tomo una anzada y se inoculó por punción en dos tubos de medio Hugh-Leifson sal; uno de los tubos se cubrió con 1,25 cm de parafina líquida y ambos tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas.

[Escriba texto]

d) **Producción de Indol:** a partir de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado se tomó una anizada y se inoculó en un tubo de caldo peptona sal al 3% que posteriormente se incubó a 37°C durante 24 horas; luego se le añadió 0,3 ml del Reactivo de indol, se agitó para dejar reposar y se observó la reacción.

e) **Reducción de nitratos:** a partir de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado se sembró una anizada en un tubo de caldo sal nitratos y se incubó a 37°C durante 24 horas, posteriormente se le añadió 1 ml de solución de ácido sulfanílico y 1 ml de solución de α -naftilamina y se agitó para la observación de la reacción.

f) **Reacción de Voges-Proskauer:** se basa en la producción de acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de la glucosa, para la realización de la prueba se partió de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado del que se tomó una anizada y se inoculó en un tubo de caldo glucosa sal (3%) tamponado y se procedió a incubar a 27°C durante 48 horas. Posteriormente se le añadió 1 ml de solución de α -naftol al 6% y 0,2 ml de hidróxido de potasio al 40% y se agitó. Se dejó reposar durante 2 horas.

g) **Fermentación de carbohidratos:** se partió de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado y se inoculó una anizada en cada tubo de caldo con diferentes carbohidratos para evaluar la capacidad de fermentar diferentes carbohidratos (Glucosa, Lactosa y Sacarosa). Los tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas.

h) **Producción de sulfuro de hidrógeno:** se partió de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo sal inclinado, luego se inoculó por punción en un tubo de agar triple azúcar hierro sal y se incubó a 37°C durante 18 horas.

Como cepas de referencia para estas pruebas se utilizaron la CVCM-306 para *V.cholerae* y la CVCM-847 para *V.parahaemolyticus*.

4.5.2.- Pruebas bioquímicas para *E.coli* O157:H7

Para la identificación de *E.coli* O157:H7 se utilizaron las pruebas del Sorbitol que se basa en la fermentación/oxidación del sorbitol y crecimiento a 44°C, pruebas sugeridas por Bravo y Villalobos, (2002).

a) **Prueba del sorbitol:** se basó en la fermentación del sorbitol, para esta prueba se partió de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo inclinado del que se tomó una anizada y se inoculo en un tubo de caldo con sorbitol y se incubó a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se observó si se dió o no el cambio de color en el medio de rojo a amarillo.

b) **Crecimiento a 44°C:** a partir de un cultivo de 24 horas en agar nutritivo inclinado, se inoculó una anizada en un tubo de caldo nutritivo y se incubó a 44°C durante 24 horas. Luego se observó si hubo crecimiento o no a partir de la presencia de turbidez en el tubo.

Como cepa de referencia se utilizó la CVCM-417 para estas pruebas.

4.6.- Diseño estadístico.

El ensayo se efectuó siguiendo un diseño completamente aleatorizado, se analizaron un total de 240 ostras y 16 litros de agua, realizándose 8 muestreos, con una diferencia de 7 días entre uno y otro.

4.7.- Análisis de los resultados.

Los datos experimentales obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Statistx 9.0 para Windows comparando las diferentes muestras de ostras y agua en estudio. En principio los datos fueron sometidos a análisis descriptivo que permitió conocer el comportamiento de cada una de las variables, así mismo se realizó una prueba de T de Student para verificar si existían diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de microorganismos presentes tanto en el agua como en las ostras de las diferentes localidades bajo estudio. Así mismo se realizó la prueba de correlación de Pearson para las poblaciones de microorganismos presentes en Agua y ostras de una misma localidad (Montgomery, 1991). Se consideró un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez realizada una observación directa de las zonas en las que se realizó el muestreo, se pudo evidenciar que en los alrededores no se encuentra ninguna planta de tratamiento de aguas residuales, además por tratarse de zonas turísticas, la afluencia de personas a estas zonas suele ser alta durante todo el año. La contaminación generada por los turistas no tiene ningún tipo de tratamiento por lo que se depositan directamente en los cuerpos de agua, significando esto, posiblemente una alta contaminación de estos y de las especies acuáticas que allí se desarrollan.

5.1.- Cuantificación de la población de coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus* en muestras de agua.

El recuento de bacterias permitió determinar los valores promedios en ufc/ml (unidades formadoras de colonia/ ml de muestra) de coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V.cholerae* y *.parahaemolyticus*.

Una vez procesados estadísticamente los resultados, se obtuvieron los estadísticos descriptivos, Media, desviación estándar y coeficiente de variación (**ver tabla 8**); además, en la misma tabla se muestra si existen diferencias estadísticamente significativas de la carga bacteriana entre las muestras de agua de las dos localidades, así como de la carga bacteriana entre las muestras de agua de una misma localidad.

Tabla 8: Características cuantitativas y estadísticas simples para el recuento de coliformes totales, *E.coli*, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*, en muestras de agua provenientes de Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua

Muestra	M.O	MEDIA	S ²	C.V	MAXIMO	MINIMO
A.T	C.T	5,0 ^{a,b}	7,5593	151,19	2,0 x 10 ¹	0
	<i>E.coli</i>	0 ^{c,a}	0	0	0	0
	<i>E.coli</i> O157:H7	2,625 x 10 ¹ ^{d,c}	15,059	57,369	4,0 x 10 ¹	0
	<i>V.cholerae</i>	0 ^{f,a}	0	0	0	0
	<i>V.parahaemolyticus</i>	0 ^{h,a}	0	0	0	0
A.O	C.T	1,0888 x 10 ⁴ ^{b,a}	1.217,1	11,179	1,25 x 10 ⁴	9,1 x 10 ³
	<i>E.coli</i>	0 ^{c,c}	0	0	0	0
	<i>E.coli</i> O157:H7	8,050 x 10 ³ ^{e,a}	1,182	14,683	9,6 x 10 ³	6,1 x 10 ³
	<i>V.cholerae</i>	1,25 x 10 ³ ^{g,b}	1162,5	93,001	3,8 x 10 ³	4,0 x 10 ²
	<i>V.parahaemolyticus</i>	3,275 x 10 ³ ^{i,b}	692,30	21,139	4,0 x 10 ³	2,1 x 10 ³

Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de T de student ($\alpha=0,05$). La primera letra relaciona a las localidades, la segunda letra relaciona las bacterias de la misma localidad,

Leyenda: Media= Media aritmética. S²=desviación estándar. C.V= coeficiente de variación. A.T=agua de tucacas. A.O= agua de ocumare

En la **tabla 8** se observa que en las muestras de agua no se evidenció la presencia de *E.coli* en ninguna de las 2 localidades; así mismo, se puede resaltar la ausencia de las dos especies de vibrio en la localidad de tucacas; mientras que los coliformes totales se encontraron en las muestras de ambas localidades. En la tabla se observa también, una gran variabilidad en los resultados del conteo de *E.coli* O157:H7; se visualiza que las poblaciones de esta bacteria en la localidad de tucacas oscilan entre 0 ufc/ml – 4x10¹ ufc/ml; mientras que en la localidad de ocumare los

[Escriba texto]

valores mínimo y máximo fueron $6,1 \times 10^3$ ufc/ml y $9,6 \times 10^3$ ufc/ml respectivamente, para este mismo microorganismo. Estas misma tendencia se observa para el resto de las bacterias.

En la **tabla 8**, se evidencia que existe diferencias estadísticamente significativas entre las muestras A.T y A.O para el caso del recuento de coliformes totales, *E.coli* O157:7, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*, pero no así para el caso de *E.coli* que en ambos casos es cero. Así mismo, para la localidad de Tucacas se apreció que no existe diferencias estadísticamente significativas en los contajes de *E.coli*, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*; no así para coliformes totales y *E.coli* O157:H7 donde se conformaron 2 grupos estadísticamente diferentes. Para la localidad de Ocumare, los recuentos que no presentan diferencias estadísticamente significativas son los de coliformes totales y *E.coli* O157:H7, y vibrios, el único microorganismo que muestra una diferencia estadísticamente significativa es *E.coli*.

En la misma tabla puede observarse que el recuento de coliformes totales se halló en el A.O con un valor de $1,08 \times 10^4$ ufc/ml el mismo se encuentra ligeramente fuera de los límites permitidos por el Council Directive de la Unión Europea, que indica que el valor máximo de este microorganismo permitido en muestras de agua en las que crecen moluscos bivalvos debe ser $1,0 \times 10^4$ ufc/ml. Para el caso de *E.coli*, las muestras de agua de ambas localidades presentaron 0 ufc/ml valor que se encuentra dentro de los límites permitidos por el Council Directive de la Unión Europea, que indica que el valor máximo para este microorganismo permitido en agua en las que crecen moluscos bivalvos es de $4,6 \times 10^1$ ufc/ml según lo reportado

[Escriba texto]

por Riou y col. (2007). En el caso de *E.coli* O157:H7 los valores promedio fueron $2,625 \times 10^1$ ufc/ml y $8,050 \times 10^3$ ufc/ml en el agua de tucacas y ocumare respectivamente, resultados que contrastan con los obtenidos por MacRae y col. (2005) que señalan contajes de $2,76 \times 10^2$ ufc/ml en aguas en las que crecen moluscos bivalvos en Francia; los resultados obtenidos en este estudio permiten inferir la existencia de un posible menor riesgo de contaminación de los animales que se desarrollan en las aguas de tucacas debido a la baja carga microbiana hallada en la misma, contrario a lo que se puede pensar en el caso de los animales que crecen en las aguas de la ciénaga en Ocumare de la costa.

Para el caso de *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus* las muestras de agua de tucacas, presentaron valores de 0 ufc/ml en contraste con las muestras de agua provenientes de la localidad de Ocumare donde se cuantificaron promedios de $1,25 \times 10^3$ ufc/ml de *V.cholerae* y $3,275 \times 10^3$ ufc/ml de *V.parahaemolyticus*; estos resultados contrastan con los obtenidos por Parveen y col. (2008) los cuales cuantificaron poblaciones de 6 ufc/ml de *V.parahaemolyticus* en la bahía de Chesapeake; así mismo, Castañeda y col. (2005) señalan que el 100% de las muestras de agua tomadas en 2 localidades en México se encontraban contaminadas con *V.cholerae*.

Por su parte, los valores de la desviación estándar (S^2) y de los coeficientes de variación (C.V.) en las muestras de agua provenientes de la localidad de tucacas permiten señalar, la presencia de una alta variabilidad en el contenido de coliformes totales presentes en cada muestra, no así para el caso de *E. coli*, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*; en el caso de las aguas provenientes de la localidad de

Ocumare, los valores de la desviación estándar (S^2) y los coeficientes de variación (C.V.) para las bacterias aisladas en estas muestras, indican valores altos para todas excepto para *E.coli*; por ello sería recomendable en futuros ensayos aumentar el número de repeticiones a fin de reducir los coeficientes de variación.

Cuando se observan los resultados de la cuantificación de bacterias en cada localidad, se aprecia que en tucacas, solo se cuantificaron coliformes totales y *E.coli* O157:H7 las cuales representan el 16% y el 84% respectivamente (**ver figura 24**).

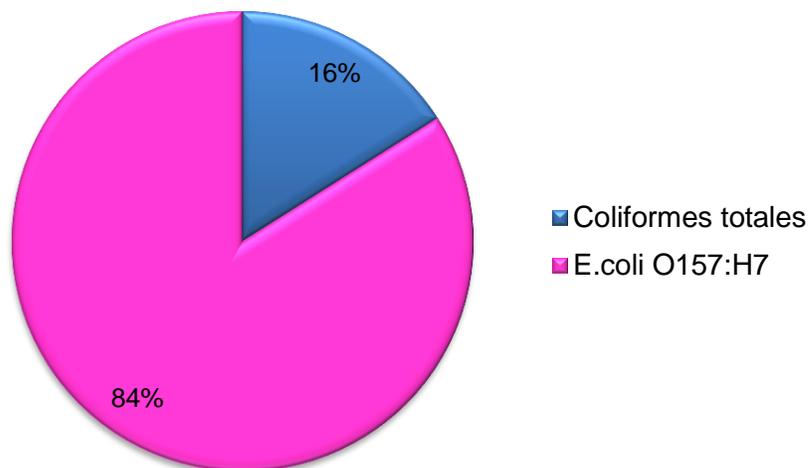


Figura 24: Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de agua de la localidad de tucacas

Para el caso de Ocumare de la Costa, se observa una mayor carga bacteriana para todas las especies cuantificadas excepto para *E.coli* que fue cero en ambas localidades, la distribución porcentual de las bacteria en las muestras de agua provenientes de la localidad de ocumare se muestran en la **figura 25**.

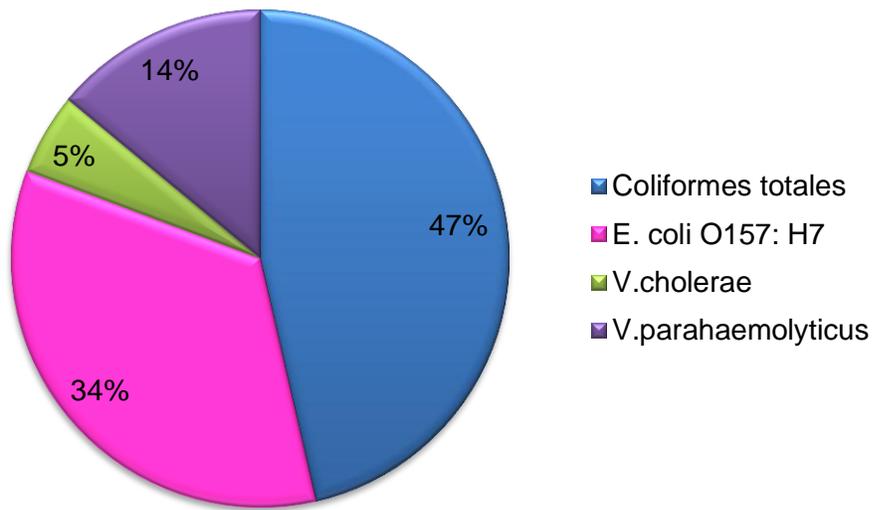


Figura 25: Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de agua de la localidad de ocumare

5.2.- Cuantificación de la población de coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157: H7, *V.cholerae* y *V.paraahaemolyticus* en muestras de ostras.

En la **tabla 9** se muestra la carga microbiana relacionada a las muestras de ostras de ambas localidades expresadas en unidades formadoras de colonia/g de muestra (ufc/g) de coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V. cholerae* y *V. paraahaemolyticus* que estaban presentes en estas para el momento del estudio.

Una vez procesados estadísticamente los resultados, se obtuvieron los estadísticos descriptivos, Media, desviación estándar y coeficiente de variación (**ver tabla 9**); además en la misma tabla, se muestra si existen diferencias estadísticamente significativas de la carga bacteriana entre las muestras de ostras de las diferentes localidades, así como para la carga bacteriana de las muestras de ostra de cada localidad.

Tabla 9: Características cuantitativas y estadísticas simples para la carga de coliformes totales, *E.coli*, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*, en muestras de ostras provenientes de Tucacas, Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de Oro, Edo. Aragua

Muestra	M.O	MEDIA	S ²	C.V	MAXIMO	MINIMO
O.T	C.T	1,675 x 10 ^{3a,b}	577,56	34,481	2,5 x 10 ³	9 x 10 ²
	<i>E.coli</i>	1,87 x 10 ^{2b,a}	112,6	60,053	4 X 10 ²	1 x 10 ²
	<i>E.coli</i> O157:H7	1,04 x 10 ^{4d,c}	779,65	7,4430	1,12 x 10 ⁴	8,9 x 10 ³
	<i>V.cholerae</i>	1,63 x 10 ^{2b,a}	172,62	105,42	4,8 x 10 ²	3 x 10 ¹
	<i>V.parahaemolyticus</i>	5,13 x 10 ^{2b,a}	94,103	18,317	6,2 x 10 ²	3,2 x 10 ²
O.O	C.T	2,76 x 10 ^{3a,a}	29,731	10,762	3,1 x 10 ²	2,4 x 10 ²
	<i>E.coli</i>	2,37 x 10 ^{1c,c}	9,1613	38,574	4 x 10 ¹	1 x 10 ¹
	<i>E.coli</i> O157:H7	8,95 x 10 ^{3a,a}	1657	18,514	1,12 x 10 ⁴	5,8 x 10 ³
	<i>V.cholerae</i>	3,25 x 10 ^{2b,b}	138,87	42,73	5 x 10 ²	1 x 10 ²
	<i>V.parahaemolyticus</i>	5,45 x 10 ^{3a,a}	678,23	12,445	6,4 x 10 ³	4,8 x 10 ³

Los valores seguidos de la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba de T de student ($\alpha=0,05$). La primera letra relaciona a las localidades, la segunda letra relaciona las bacterias de la misma localidad,

Leyenda: Media= Media aritmética. S²=desviación estándar. C.V= coeficiente de variación. O.T=ostras de tucacas. O.O= ostras de ocumare

En la tabla se evidencia que no existe diferencias estadísticamente significativas entre las muestras O.T y O.O en cuanto al recuento de coliformes totales, *E.coli* O157:H7 y *V.parahaemolyticus*, además se observa que no existe diferencias estadísticamente significativas entre las poblaciones de *E.coli* y *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*; pero no así en el caso del conteo de *E.coli* en las

muestras de ostras de ocumare, que es estadísticamente diferente al resto de las poblaciones.

En el caso de las poblaciones de bacterias dentro de la misma localidad, se puede notar que en Tucacas no existe diferencias estadísticamente significativas para recuentos de *E.coli*, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*; no así para los contajes de coliformes totales y *E.coli* O157:H7 que si muestran diferencias estadísticamente significativas. Para el caso de Ocumare, las poblaciones que no presentan diferencias estadísticamente significativas son las de coliformes totales, *E.coli* O157:H7 y *V.parahaemolyticus*, pero *V.cholerae* y *E.coli* si son significativamente diferentes, estadísticamente hablando al resto de las poblaciones de esta localidad.

También se puede observar que la mayor población de bacterias de *E.coli* O157:H7 fue encontrada en las O.T con un valor promedio $1,04 \times 10^4$ ufc/g valor que se encuentra fuera de los límites permitidos por el Council Directive de la Unión Europea, que indica que el máximo de este microorganismo permitido en moluscos bivalvos es 2,3 ufc/g. Para el caso de *E.coli*, y coliformes fecales en general estos no deben exceder 3 ufc/g por lo que ambas muestras se encuentran por fuera de estos límites con valores de $1,87 \times 10^2$ ufc/g y $1,675 \times 10^3$ ufc/g respectivamente. En el caso de las poblaciones de vibrios, no se encontró normativa que reflejara los límites de estos en ostras. Para el caso de la carga de *E.coli* O157:H7 se encontró un valor promedio de $1,04 \times 10^4$ ufc/g en las ostras de la localidad de tucacas y $8,95 \times 10^3$ ufc/g en las ostras de la localidad de ocumare, ambos resultados contrastan con los obtenidos por MacRae y col. (2005) que indican cargas de $2,76 \times 10^2$ ufc/g en moluscos bivalvos en Francia, es decir los valores obtenidos durante este estudio,

[Escriba texto]

son mayores a los encontrados por los investigadores antes referidos y además por Umesha y col. (2008), quienes señalan valores de 5×10^2 ufc/g de coliformes fecales en ostras en la India.

Para el caso de *V.parahaemolyticus* en las muestras de ostras provenientes de la localidad de Tucacas, el recuento promedio fue de $5,13 \times 10^2$ ufc/g en contraste con las muestras de ostras provenientes de la localidad de Ocumare que fue de $5,45 \times 10^3$ ufc/g, estos resultados son muy similares a los obtenidos por Parveen y col. (2008) quienes cuantificaron valores de 4×10^2 ufc/g de *V.parahaemolyticus* en ostras colectadas en la bahía de Chesapeake. Estos valores se encuentran por debajo del límite establecido por la FDA que es $< 10^4$ ufc/g de *V.parahaemolyticus*/g en comidas listas para consumir (FDA, 1986).

Por su parte las poblaciones promedio de *V.cholerae* en muestras de ostras de Tucacas y Ocumare fueron $1,63 \times 10^2$ ufc/g y $3,25 \times 10^2$ ufc/g respectivamente, lo que contrasta con los resultados obtenidos por Pereira y col. (2006), los cuales al evaluar muestras de ostras colectadas en Florianopolis, Brasil, ninguna estaba contaminada con *V.cholerae*.

Por su parte, los valores de la desviación estándar (S^2) y de los coeficientes de variación (C.V.) en las muestras de ostras en estudio provenientes de ambas localidades muestran valores altos; por ello sería recomendable en futuros ensayos aumentar el número de repeticiones a fin de reducir los coeficientes de variación.

La gran variabilidad en los resultados obtenidos entre ambas muestras en cuanto a la carga de microorganismos aislados, se muestran en la **figura 26**.

[Escriba texto]

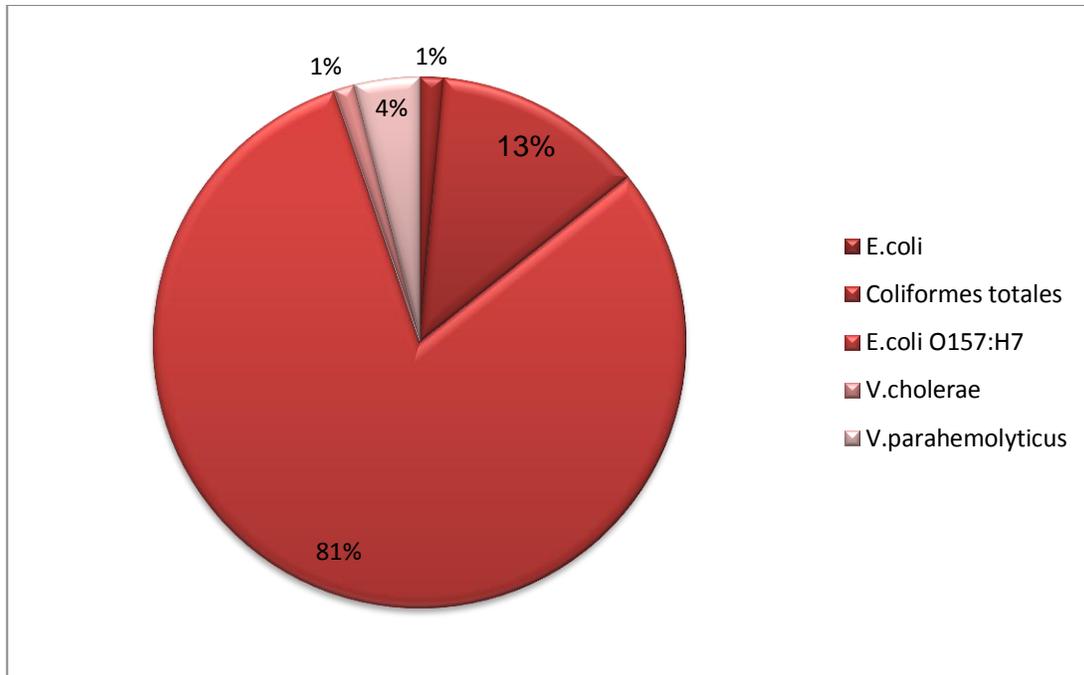


Figura 26: Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de ostras de la localidad de tucacas

En la figura 29 se muestra una distribución bastante desigual de las poblaciones de bacterias estudiadas; se observa que del total de bacterias cuantificadas el 81% está representado por *E.coli* O157:H7, seguido por coliformes totales (13%), y la menor proporción representada por *E.coli*, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jacsie y col. (2002), que al analizar muestras de moluscos bivalvos en el mar Adriático hallaron que aunque en bajos porcentajes la población de *V. parahaemolyticus* es mayor a la de otros vibrios. Estos porcentajes se relacionan con los determinados en las muestras de agua (aunque en proporciones diferentes) para estas mismas bacterias, ya que en las muestras de agua de la localidad de tucacas predominó *E.coli* O157:H7 con un 84% seguido de un 16% para los coliformes totales.

En el caso de las muestras de ostras de la localidad de ocumare, las proporciones de los recuentos en las muestras se muestran en la **figura 27**.

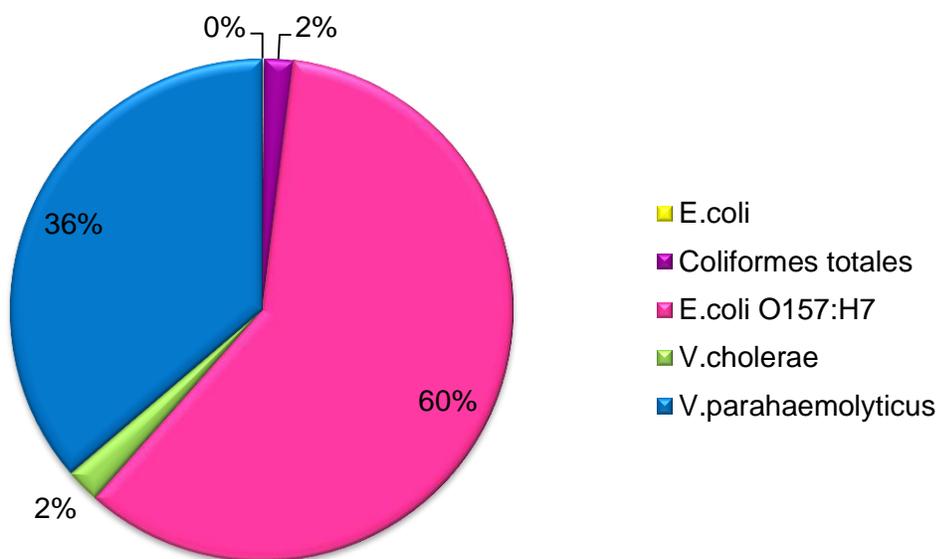


Figura 27: Distribución porcentual de las bacterias aisladas de las muestras de ostras de la localidad de ocumare

Estos porcentajes se correlacionan (aunque en proporciones diferentes) con los obtenidos de la población bacteriana de las muestras de agua de la misma localidad en las que las mayores proporciones la alcanzaron los contajes de la *E.coli* O157:H7, seguido por los de *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Jacsie y col. (2002), que cuando analizaron muestras de moluscos bivalvos en el mar Adriático hallaron que aunque en bajos porcentajes la población de *V. parahaemolyticus* fue mayor que la de otros vibrios.

5.3.- Relación entre la contaminación de las muestras de agua y las muestras de ostras

A objeto de determinar si existe o no relación entre la contaminación de los dos tipos de muestras (agua y ostras), haciendo referencia a los microorganismos aislados, se estableció estadísticamente el coeficiente de correlación de Pearson entre cada microorganismo de las muestras, el cual mide la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Los resultados se exponen en la **tabla 10**.

Tabla 10: Coeficiente de correlación de Pearson para los microorganismos coliformes totales, *E.coli*, *E. coli* O157:H7, *V. parahaemolyticus* y *V.cholerae*; en la localidad de tucacas.

	C.T _A – C.T _O	E.c _A – E.c _O	E.C O157:H7 _A -E.C O157:H7 _O	V.pa- V.po	V.ca- V.co
Coeficiente de Correlación de Pearson en localidad de tucacas	0,19	0	-0,49	0	0
Coeficiente de Correlación de Pearson en la localidad de ocumare	0	0	0,72	-0,03	0,72

Leyenda: C.T_A – C.T_O= Coliformes totales en agua Vs Coliformes totales en ostras
 E.c_A – E.c_O= *E.coli* en agua Vs *E.coli* en ostras
 E.C O157:H7_A-E.C O157:H7_O= *E.coli* O157:H7 en agua Vs *E.coli* O157:H7 en ostras
 V.pa-V.po= *V.parahaemolyticus* en agua Vs *V.parahaemolyticus* en ostras
 V.ca-V.co= *V.cholerae* en agua Vs *V.cholerae* en ostras

Los valores del Coeficiente de Correlación de Pearson mostrados en la **tabla 10** demuestran que entre la contaminación del agua y la contaminación de las ostras no existe relación alguna estadísticamente hablando, ya que estos coeficientes muestran valores bajos siendo inclusive en algunos casos cero, y en otros inferiores a cero, estos resultados se deben posiblemente a lo afirmado por autores como

[Escriba texto]

Baffone y col. (2005) y Di pinto y col. (2008), investigadores que aseguran que por las condiciones ambientales y los cambios sufridos por el agua, los microorganismos son capaces de permanecer durante periodos de tiempo más prolongados en los moluscos bivalvos que en las aguas en las que estos crecen, ya que el microorganismo tiene la capacidad de adherirse al tejido epitelial del animal. Estos hallazgos concuerdan con los mostrados por Li y col. (2009), cuando analizando muestras de moluscos bivalvos no hallaron una correlación entre la carga de *E.coli* en agua y en moluscos, determinando que en diferentes épocas del año en las que las condiciones climáticas y del agua variaban, estas cargas bacterianas no se correlacionaban.

Así mismo Riou y col, (2007) afirman lo antes expuesto cuando realizan análisis a muestras de agua y en este caso no de moluscos pero si de mariscos y encuentran que las poblaciones de *E.coli* en muestras de agua y de mariscos muestran resultados que son numéricamente tan diferentes (como se muestra en la **tabla 11**) que no se correlacionan estadísticamente. Resultados similares fueron encontrados por MacRae y col. (2005) cuando realizaron la detección de *Cryptosporidium parvum* y *Escherichia coli* O157:H7 en moluscos bivalvos.

Tabla 11: Carga de *E.coli* en muestras de agua y mariscos en aéreas costeras poco profundas

	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3	Sitio 4
Carga de <i>E.coli</i> en agua (ufc/ml)	1,7	$7,4 \times 10^{-1}$	2×10^{-2}	4×10^{-1}
Carga de <i>E.coli</i> en mariscos (ufc/g)	1×10^2	$1,7 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,34 \times 10^2$

Fuente: Riou y col. (2007)

En cuanto a la correlación de las cargas de *Vibrios* spp entre muestras de agua y ostras los resultados señalados por otros investigadores difieren de los obtenidos en esta investigación, ya que Parveen y col. (2008) indican valores del 10% de muestras de ostras y agua contaminadas con *V.parahaemolyticus* en la bahía de Oregón; en el mismo estudio, el 13% ostras recolectadas en Alabama se encontraron contaminadas con este mismo microorganismo. Por su parte Castañeda y col. (2005) reportaron que de las muestras recolectadas en México, el 100% de las ostras estaban contaminado con *V.cholera* mientras que de las muestras de agua, el 97% también se encontraba contaminado con este microorganismo. Mientras que por su parte, Butt y col. (2004) afirman haber hallado una relación entre la contaminación de agua y ostras con diferentes especies de vibrios.

5.4.- Relación entre el recuento de Coliformes fecales y *Vibrio* spp.

A objeto de determinar si existe o no relación entre los contajes de los microorganismos aislados, se estableció estadísticamente el coeficiente de correlación de Pearson entre los mismos (ver **tabla 12**).

Tabla 12: Coeficiente de correlación de Pearson para los microorganismos coliformes fecales y Vibrios spp.

	V.c- E.c	V.c- E.C O157:H7	V.p - E.c	V.p- E.C O157:H7
Coeficiente de Correlación de Pearson en el agua de tucacas	0	0	0	0
Coeficiente de Correlación de Pearson en ostras de tucacas	0,17	0,12	0,11	-0,21
Coeficiente de Correlación de Pearson en el agua de ocumare	0	-0,77	0	-0,02
Coeficiente de Correlación de Pearson en ostras de ocumare	0,14	-0,75	-0,03	-0,6

Leyenda: V.c- E.c = *V.cholerae* Vs *E.coli*
V.c- E.C O157:H7 = *V.cholerae* Vs *E.coli* O157:H7
V.p - E.c = *V.parahaemolyticus* Vs *E.coli*
V.p- E.C O157:H7 = *V.parahaemolyticus* Vs *E.coli* O157:H7

En la tabla anterior se muestran los coeficientes de correlación de Pearson para determinar la relación entre la contaminación de coliformes fecales (*E.coli* y *E.coli* O157:H7) y los *Vibrio* spp. (*V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*) aislados de las muestras analizadas; se puede observar que los valores mostrados en la tabla son lo bastante bajos (en su mayoría cero o menores a cero) como para afirmar que existe una relación estadísticamente significativa entre ambos microorganismos en las muestras de las dos localidades.

Resultados similares han sido indicados por otros investigadores tales como Lhafi y Kühne (2007) y Di Pinto y col. (2008), quienes aseguran no haber encontrado correlación entre la presencia de *E.coli* y *Vibrios* spp. en muestras de mariscos en el mar alemán Wadden y en el sur de Italia respectivamente.

5.5.- Pruebas Bioquímicas

5.5.1.- Pruebas bioquímicas para *Vibrio* spp.

La identificación de las cepas de *Vibrium parahaemolyticus* y *Vibrium cholerae*, se realizó a través de las siguientes pruebas:

a) **Carácter halófilo** para lo cual se utilizaron tubos de caldo peptona con 3% de NaCl donde hubo crecimiento característico de ambos microorganismos (**ver figura 28**).

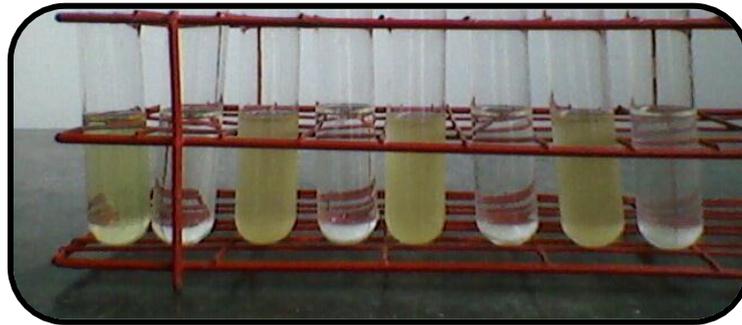


Figura 28: Carácter halófilo para *Vibrio* spp.

En la **figura 28** se observa una serie de tubos en los que se muestra un medio amarillo en el cual hubo crecimiento de *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus* en un caldo peptona con adición de 3% de NaCl; los 4 tubos con crecimiento se corresponden con: 1 con una cepa de *V.cholerae* aislada de muestras analizadas, 1 con una cepa de *V.parahaemolyticus* aislada de muestras analizadas, 1 con una cepa pura de *V.cholerae* CVCM-306, 1 con una cepa pura de *V.parahaemolyticus* CVCM-847; los

[Escriba texto]

tubos con medio transparente se muestran como testigos del medio inicial sin inocular.

b) **Resistencia al NaCl:** se utilizaron tubos de caldo peptona con 7% y 10% de NaCl creciendo las cepas de *V.parahaemolyticus* solo en los tubos en los que la concentración de sal fue 7%; y las cepas de *V.cholerae* no tuvieron crecimiento a 7% de concentración de NaCl (ver figura 29).

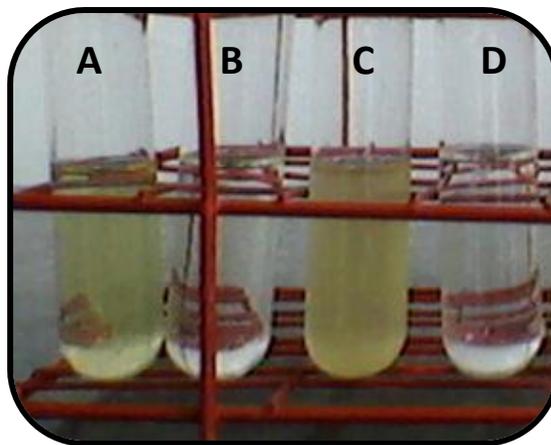


Figura 29: Resistencia al NaCl (A) *V.parahaemolyticus* (aisladas de Muestra) 7% NaCl, (B) *V.cholerae* (aisladas de Muestra) 7% NaCl, (C) *V.parahaemolyticus* (cepa pura) 7% NaCl, (D) *V.cholerae* (cepa pura) 7% NaCl

En la **figura 29** se puede observar que para ambas cepas de *V.cholerae* (tanto pura como aislada de las muestras) no hubo crecimiento a 7% de concentración de NaCl (tubos B y D), a diferencia de las cepas de *V.parahaemolyticus* (tanto pura como aislada de las muestras) que si mostraron crecimiento a una concentración de 7% de NaCl, esta característica de la resistencia a la concentración de NaCl en

distintiva entre estas dos cepas de *Vibrio*. A concentraciones de 10% de NaCl ninguna de las cepas mostró crecimiento.

c) **Prueba de Hugh – Leifson:** prueba que se basó en la determinación de la fermentación oxidativa de la glucosa sin producción de gas (**ver figura 30**).

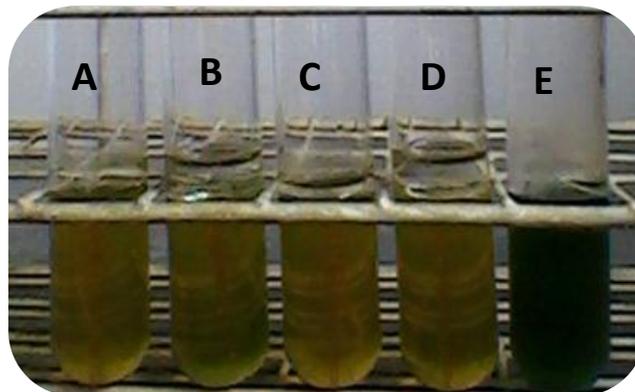


Figura 30: Prueba de Hugh - Leifson (A) *V.parahaemolyticus* (aisladas de Muestra), (B) *V.parahaemolyticus* (cepa pura), (C) *V.cholerae* (aisladas de Muestra), (D) *V.cholerae* (cepa pura), (E) Tubo testigo

En la **figura 30** se puede observar que todas las cepas sometidas a la prueba de la fermentación oxidativa de la glucosa reaccionaron positivamente a esta, siendo esta reacción característica de las cepas estudiadas de *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*.

d) **Producción de Indol:** en un tubo de caldo peptonado 3% de sal se le agregó el reactivo de indol siendo el resultado positivo, que se evidenció por la aparición de una franja roja sobre el caldo, característico de ambos microorganismos (**ver figura**

[Escriba texto]

31). El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano.

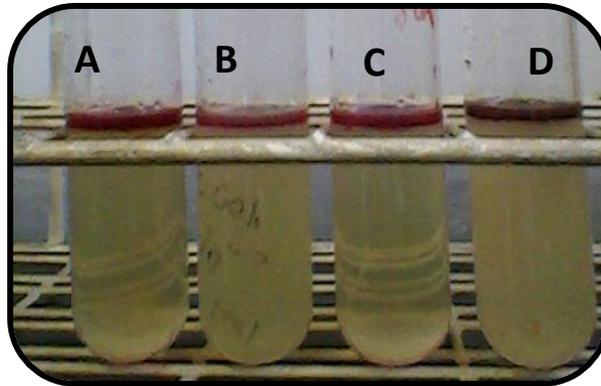


Figura 31: Reacción de indol (A) *V.parahaemolyticus* (aisladas de Muestra), (B) *V.parahaemolyticus* (cepa pura), (C) *V.cholerae* (aisladas de Muestra), (D) *V.cholerae* (cepa pura), (E) Tubo testigo

e) **Reducción de nitratos:** en un tubo de caldo nitratos luego de la adición de ácido sulfanílico y α -naftilamina se evidenció la aparición de un color naranja propio de una reacción positiva, característica de ambos microorganismos (**ver figura 32**).

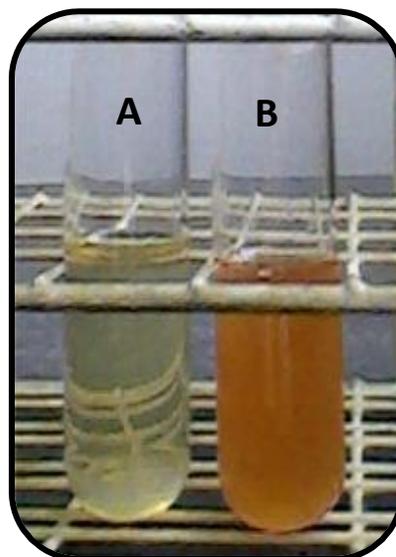


Figura 32: Reducción de nitratos (A) Tubo testigo, (B) Tubo muestra de reacción positiva

Cuando se realizó la prueba de reducción de nitratos a nitritos, las cepas de *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus* (tanto puras como aisladas de las muestras) mostraron una reacción positiva, evidenciándose en el tubo la aparición de un color anaranjado tal como se muestra en la **figura 32**. Esta prueba se realizó tanto para las cepas aisladas de muestras estudiadas, como para las cepas puras, las cuales coincidieron en los resultados.

f) **Reacción de Voges-Proskauer:** se basó en la producción de acetilmetilcarbinol a partir de la fermentación de la glucosa.

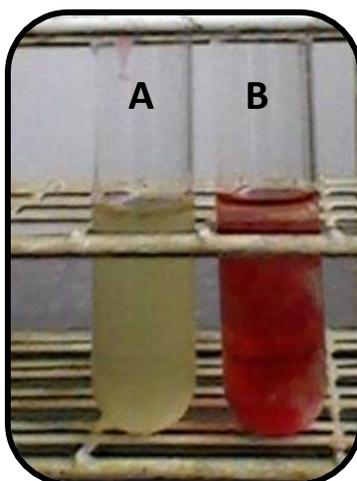


Figura 33: Reacción Voges-Proskauer (A) cepa de *V.parahaemolyticus*, (B) cepa de *V.cholerae*

Para esta prueba la cepa de *V.parahaemolyticus* mostró una reacción negativa que se evidenció por la presencia de color amarillo para la cepa de *V.parahaemolyticus*, mientras que para la cepa de *V.cholerae* se observó un viraje a color rosado que indicó prueba positiva, es decir hubo producción de acetilmetilcarbinol (**ver figura 33**). La reacción de Voges – Proskauer es otra de las

[Escriba texto]

pruebas que ayudan a confirmar cepas de *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*. Esta prueba se realizó tanto para las cepas aisladas de muestras estudiadas, como para las cepas puras y las cuales coincidieron en los resultados.

g) **Fermentación de carbohidratos:** se inocularon ambas cepas en tubos de caldos con diferentes carbohidratos (Glucosa, Sacarosa y Lactosa) para evaluar la capacidad de fermentar diferentes carbohidratos (**ver figura 34**).

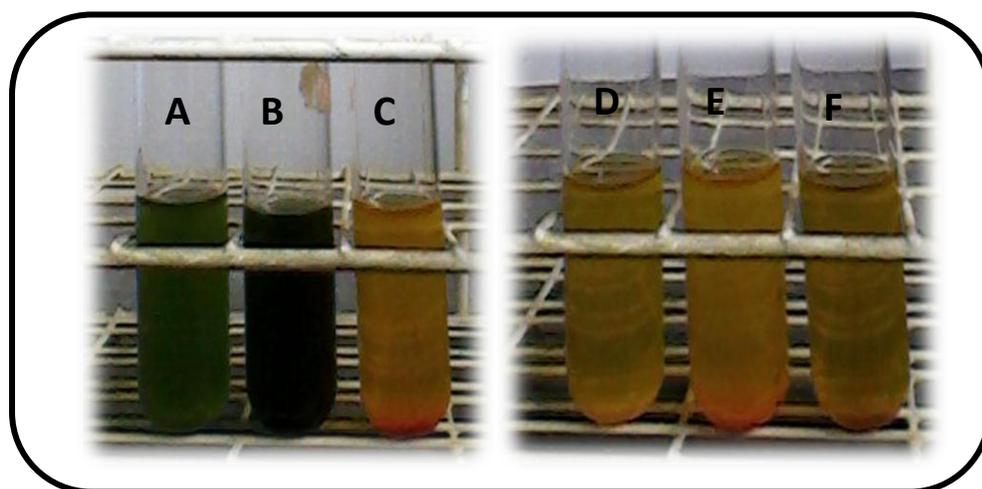


Figura 34: Fermentación de carbohidratos. (A) *V.parahaemolyticus* en un tubo de caldo de lactosa, (B) *V.parahaemolyticus* en un tubo de caldo de sacarosa, (C) *V.parahaemolyticus* en un tubo de caldo de glucosa, (D) *V.cholerae* en un tubo de caldo de lactosa, (E) *V.cholerae* en un tubo de caldo de sacarosa, (F) *V.cholerae* en un tubo de caldo de glucosa.

En la **figura 34** se puede observar que la cepa de *V.parahaemolyticus* fue capaz de fermentar la glucosa (tubo amarillo que denotó una reacción positiva) pero no la sacarosa ni la lactosa (tubos verdes, típicos de una reacción negativa); a diferencia de la cepa de *V.cholerae*, cepa que fermentó los tres carbohidratos, dicha fermentación se evidenció por presentar color amarillo en los tubos con reacción

positiva. Esta prueba se realizó tanto para las cepas aisladas de muestras estudiadas, como para las cepas puras y las cuales coincidieron en los resultados.

h) **Producción de sulfuro de hidrogeno:** esta prueba se basa en la determinación de la capacidad de las bacterias de producir sulfuro de hidrogeno a partir del tiosulfato de sodio añadido al medio (**ver figura 35**).

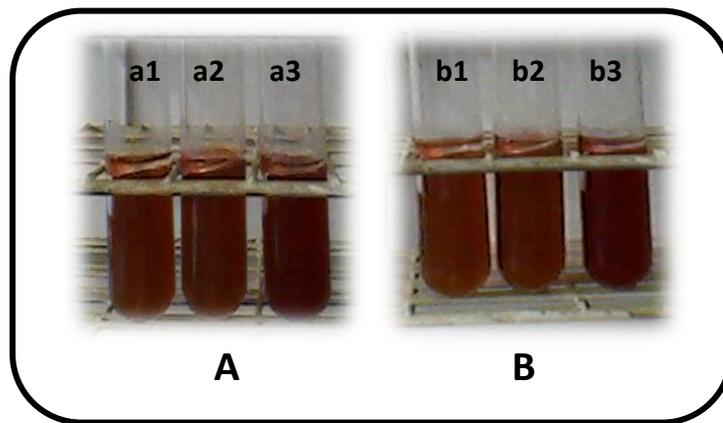


Figura 35: Producción de sulfuro de hidrogeno. (A) *V.parahaemolyticus* (a1 cepa pura, a2 cepa aislada de las muestras estudiadas, a3 tubo testigo) , (B) *V.cholerae* (b1 cepa pura, b2 cepa aislada de las muestras estudiadas, b3 tubo testigo).

En la **figura 35** se puede observar que todos los tubos inoculados con las cepas de *V.cholerae* (tanto cepa pura como cepa aislada de las muestras estudiadas) y *V.parahaemolyticus* (tanto cepa pura como cepa aislada de las muestras estudiadas), permanecieron idénticos al testigo, es decir de color rojo y sin formación de un producto negro (el sulfuro de hidrogeno), características propias de una reacción negativa propia de ambas cepas.

Como cepas de referencia para estas pruebas se utilizaron la CVCM-306 para *V.cholerae* y la CVCM-847 para *V.parahaemolyticus*.

5.5.2.- Pruebas bioquímicas para *E.coli* O157:H7

Para la identificación de *E.coli* O157:H7 se utilizaron las pruebas:

a) **Sorbitol:** que se basó en la fermentación del sorbitol que fue negativo para esta cepa, es decir en la prueba el tubo de ensayo se vió de un color rojo (**ver figura 36**).

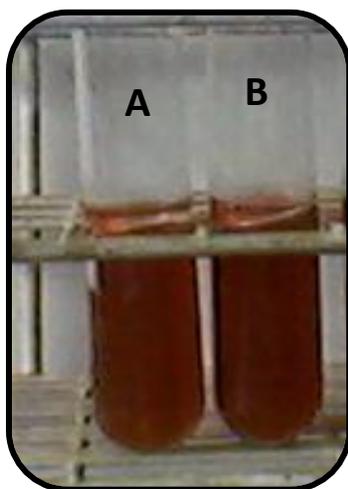


Figura 36: Fermentación del sorbitol. (A) Cepa pura de *E.coli* O157:H7, (B) cepa de *E.coli* O157:H7 aislada de las muestras estudiadas

En la **figura 36** se puede observar que ambos tubos (inoculado tanto con cepa pura como con cepa aislada de las muestras estudiadas de *E.coli* O157:H7), permanecieron de color rojo/naranja, en el caso de una reacción positiva estos tubos hubiesen mostrado un viraje a color amarillo propio de la evidencia de la fermentación oxidativa del sorbitol. Esta cepa de *E.coli* es la única que no fermenta el sorbitol, por lo que esta prueba bioquímica fue fiable para confirmar que la cepa aislada es

[Escriba texto]

efectivamente *E.coli* O157:H7, ya que los resultados fueron comparados con los obtenidos por la cepa pura, que igualmente se muestra en la **figura 36**.

b) **Crecimiento a 44°C**: luego de la incubación se observó si hubo o no crecimiento de las cepas (**ver figura 37**).

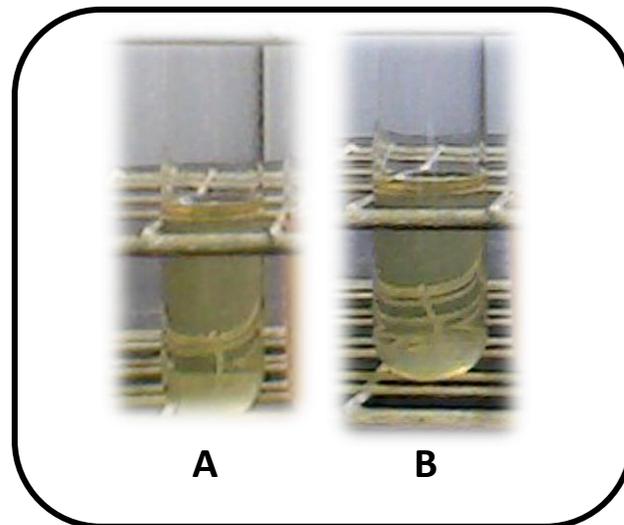


Figura 37: Crecimiento a 44°C. (A) Cepa pura de *E.coli* O157:H7, (B) cepa de *E.coli* O157:H7 aislada de las muestras estudiadas

Luego de ser incubados los tubos inoculados no se observó crecimiento de las cepas de *E.coli* O157:H7, ya que no se evidenció turbidez en ninguno de los tubos, esta prueba es confirmativa para esta cepa de *E.coli*, ya que no puede crecer a esta temperatura a diferencia del resto de las *E.coli*.

Estas pruebas fueron sugeridas por Bravo y Villalobos, (2002). Como cepa de referencia se utilizó la CVCM-417.

[Escriba texto]

6.- CONCLUSIONES



Se cuantificaron las poblaciones de Coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*, en muestras de agua de la localidad de Tucacas Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de oro Edo. Aragua encontrándose que en la localidad de Tucacas solo se aislaron Coliformes totales y *E.coli* O157:H7; mientras que en Ocumare de la Costa se aislaron Coliformes totales, *E.coli* O157:H7, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*. y en ambos casos la mayor población fue alcanzada por la *E.coli* O157:H7



Se cuantificaron las poblaciones de Coliformes totales, *E.coli*, *E.coli* O157:H7, *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*, en muestras de ostras de la localidad de Tucacas Edo. Falcón y Ocumare de la Costa de oro Edo. Aragua encontrándose que en ambas localidades, se aislaron todas las bacterias bajo estudio, reportándose en ambos casos la prevalencia de *E.coli* O157:H7.



Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras Agua de la localidad de Tucacas y Agua de ambas localidades el caso de la carga de coliformes totales, *E.coli* O157:H7, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*, pero no así en el caso de la carga de *E.coli*



En el caso de las poblaciones de bacterias pero en la misma localidad se puede notar que en la localidad de Tucacas no existen diferencias estadísticamente significativas para las cargas de *E.coli*, *V.cholerae* y *V.parahaemolyticus*; no así para la carga de coliformes totales y *E.coli* O157:H7.



En el caso de la localidad de Ocumare las cargas que no presentan diferencias estadísticamente significativas son las de coliformes totales y *E.coli* O157:H7, ni los *Vibrios* entre ellos, mientras que la *E.coli* O157:H7 fue estadísticamente diferente al resto.



A través de la determinación de los Coeficientes de Correlación de Pearson, de la contaminación entre el agua y las ostras de cada localidad, se estableció que no existe relación estadística alguna de la contaminación entre el agua y las ostras.



A través de la determinación del Coeficiente de Correlación de Pearson entre el recuento de coliformes fecales y *Vibrios* spp., se estableció que no existe relación estadística alguna entre las poblaciones de dichos microorganismos por lo que no puede utilizarse la carga de coliformes fecales (*E.coli* y *E.coli* O157:H7), como indicadores de contaminación con *Vibrios* spp.



A través de las pruebas bioquímicas realizadas se confirmó que las cepas aisladas fueron concluyentemente *E.coli* O157:H7, *V. cholerae* y *V.parahaemolyticus*.

7.- RECOMENDACIONES



Se recomienda en futuras investigaciones realizar pruebas serológicas a las colonias aisladas.



Dado que existe un gran número de bacterias capaces de ser transmitidas por moluscos bivalvos, se recomienda realizar un estudio en el que sean aisladas otras bacterias tales como *Salmonella*, otras especies de *Vibrios*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Pseudomonas*, *Listeria*, entre otras; por ser estas bacterias halotolerantes.



Tomando en cuenta los resultados obtenidos luego del análisis estadístico, se recomienda aumentar el número de muestras, a fin de disminuir los coeficientes de variación.



Promover investigaciones que permitan establecer mecanismos de vigilancia y control de productos de origen marino a fin de asegurar su calidad e inocuidad, ya que el hecho de que los moluscos bivalvos se desarrollen en medio acuático y tengan una alimentación por filtración, los convierte en uno los alimentos más riesgosos para el hombre, en cuanto a las infecciones bacterianas se refiere.



Considerando la importancia e incremento de las enfermedades bacterianas, es necesario que en nuestro país, se efectuó un mayor número de estudios sobre la forma de controlar este tipo de enfermedades en alimentos que se consumen crudos.



Evaluar la cadena productiva de alimentos de origen marino, a fin de establecer los puntos críticos que ayuden a reducir o prevenir los brotes de infecciones bacterianas.



Minimizar el consumo de pescados y mariscos crudos o con poca cocción, ya que la cocción disminuye el riesgo de sufrir ETA's.



Informar y concientizar a las amas de casa y al público en general sobre las buenas prácticas de manufactura en el hogar para la elaboración o preparación de los alimentos. Además de normas para proteger el medio ambiente, por jugar este un papel fundamental en la vida de los seres humanos e influenciar directamente la calidad de los alimentos que se producen en la naturaleza.

8.- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abuxapqui, J.; Suarez G.; Heredia, M.; Puc, M.; Monsreal, J. 1996. Calidad microbiológica de los alimentos marinos en la ciudad de Mérida, Yucatán. *Veterinaria México* 27(4):319-324.
- Aguado, J.; Lumbreras, B. 1998. Infecciones por enterobacterias. *Medicine* 7(78): 3622-3628.
- Amoroso, A.; Bonofiglio, L.; Gardella, N.; Massa, R.; Power, P.; Radice, M.; Rodríguez, M. 2006. Microbiología superior. Guía de trabajos prácticos.
- Baffone, W., Vittoria, E., Campana, R., Citterio, B., Casaroli, A., Pierfelici, L. 2005. Occurrence and expression of virulence-related properties by Environmental halophilic *Vibrium* spp. in in vitro and in vivo systems. *Food Control*, 16(5): 451-457.
- Banwart, G. 1979. Microbiología Básica de los alimentos. Ediciones Bellatera. España, pp. 220-230.
- Barnes, R. 1995. Zoología de los invertebrados. 6^{ta} edición. Editorial Mc Graw-Hill interamericana. México. Págs. 365-49.
- Bosch, A.; Guix, S.; Sano, D. ; Pintó, R. 2008. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology* 19:295-30.
- Bravo, V. y Villalobos, L. 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2):119-121

- Butt, A., Aldridge, K., Sanders, C. 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: Viral and Bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 4(4):201-212.
- Cakir, I., Dogan, H., Halkman, K., Worobo, R. 2001. An alternative approach for enumeration of *Escherichia coli* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 68(3): 217-223.
- Castañeda, M., Pardo, V., Orrantia, E., Lango, F. 2005. Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrium cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, México. *Marine Pollution Bulletin*, 50(12):1641-1648.
- Chigbu, P.; Gordon, S.; Strange, T. 2005. Fecal Coliform bacteria disappearance rates in a north-central gulf of Mexico estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Sciences* 65:309-318.
- Colakoglu, F., Sarmasik, A., Koseoglu, B. 2006. Occurrence of *Vibrium* spp. and *Aeromonas* spp. in shellfish harvested off Dardanelles coast of Turkey. *Food Control*, 17(8):648-652.
- COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Ministerio de Fomento. 1997. Alimentos. Recuento de Coliformes y *Escherichia coli*. Método en placas con películas secas rehidratables (Petrifilm). Norma Venezolana 3276:97. Caracas.
- COUNCIL DIRECTIVE 91/492/EEC. 1991. Laying down the health conditions for the production and the placing on the market of live bivalve mollusks.

http://www.eugbc.net/files/52_129_311914_Com.2-CouncilDirective91-492-EEC.pdf

- Croci, L.; Losio, N.; Suffredini, E.; Pavoni, E.; Di Pasquale, S.; Fallacara, F.; Arcangeli, G. 2007. Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *International Journal of Food Microbiology* 114(2):252-257.
- De Abreu, A., Dutra, J., Moresco, V., Rogerio, C., Luiz, A., Oliveira, C., Monte, C. 2007. Depuration dynamics of oysters (*Crassostrea gigas*) artificially contaminated by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Marine Environmental Research*, 63(5):479-489.
- Devasia, R., Jones, T., Ward, J., Stafford, L., Hardin, H., Bopp, C., Beatty, M., yb colaboradores. 2006. Endemically Acquired foodborne outbreak of Enterotoxin producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. *The American Journal of Medicine*, 119(2): 168.e7-168.e10.
- Di Pinto, A., Ciccarese, G., De Corato, R., Novello, L., Terio, V. 2008. Detection of pathogenic *Vibrium parahaemolyticus* in southern Italian shellfish. *Food Control*, 19(11):1037-1041.
- Duran, F. 2006. Manual del Ingeniero de Alimentos. Microbiología de Alimentos. Editorial Grupo Latino. 111-112p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación). 2000-2009. Departamento de pesca y acuicultura. Producción y comercio de productos pesqueros. (En línea). Consultado 20 Abr. 2009. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/collection/global-fish-consump/es>.

Fiandrino, A., Martin, Y., Got, P., Bonnefont, J., Troussellier, M. 2003. Bacterial contamination of Mediterranean coastal seawater as affected by riverine inputs: simulation approach applied to a shellfish breeding area (Thaulagoon, France). *Water Research*, 37(8):1711-1722.

Fleming, L., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., Pomponi, S., Smith, S., Solo, H., Walsh, P. 2006. Oceans and human health. Emerging public health risks in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 53(10-12):545-560.

Flores, J., Suarez, G., Heredia, M., Puc, M., Monsreal, J. 1996. Calidad de los alimentos marinos en la Ciudad de Mérida, Yucatán. *Veterinaria México*, 27(4):319-324.

Flores, T.; Rojas, R. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Salud pública de México* 47(5):388-390.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (F.D.A). 1990. Sanitation of shellfish growing areas. National shellfish sanitation program. Manual of operations. Part. I. United State Department of Health and Human Services.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 1986. Programa Nacional de Saneamiento de mariscos. Manual de Operaciones. Parte II. Saneamiento de la recolección y procesamiento de mariscos. Disponible en: (<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/vprisk4.htm>). [Consulta 12 de septiembre de 2009]

Gantzer, C., Dubois, E., Crance, J.M., Billaudel, S., Kopecka, H., Schwartzbrod, L., Pommeputy, M., Le Guyader, F., 1998. Influence of environmental factors on

[Escriba texto]

the survival of enteric viruses in seawater. *Ocean Observation Laboratory Acta* 21, 983–992. doi:[10.1016/S0399-1784\(99\)80020-6](https://doi.org/10.1016/S0399-1784(99)80020-6).

Gómez, D.; Miliwebsky, E.; Silva, A.; Deza, N.; Zotta, C.; Costella, O.; Martínez, E.; Chinen, I.; Fernandez, C.; Rivas, M. 2005. Aislamiento de *E. coli* productor de toxina shiga durante un brote de gastroenteritis en un jardín maternal en la ciudad de Mar del Plata. *Argentina* 37:176-181.

González, T. Rojas, A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *salud pública de méxico*, 47(5):388-390.

Greig, J., Ravel, A. 2009. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2):77-87.

Harwood, V., Gandhi, J., Wright, A. 2004. Methods for isolation and confirmation of *Vibrium vulnificus* from oysters and environmental sources: a review. *Journal of Microbiological Methods*, 59(3):301-316.

Hernández, O., Troccoli, L., Millán, J. 1998. Crecimiento, Engorde y Sobrevivencia de la Ostra de Mangle *Crassostrea rhizophorae* Guilding, 1828 en la Isla de Cubagüa, Venezuela. *Caribbean Journal of Science*, 34(3-4):243-249.

Herrera, A. 1985. Manual de medios de cultivo. Editorial Científico – técnica. Cuba. 74p.

Hickman, C., Roberts, L., Larson, A., l'Anson, H., Einsenhour, D. 2006. Principios Integrales de Zoología. Decima tercera edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. Págs. 376-398.

- Hird, S., Stein, C., Kuchenmüller, T., Green, R. 2009. Meeting report: Second annual meeting of the World Health Organization initiative to estimate the global burden of foodborne diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2):210-212.
- Hoffmann, F. 2001. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Brasil alimentos* 9:23-30.
- Hsu, B-M.; Chen, C-H.; Wam, M-T.; Po-Jen, Chang, P-J. ; Fan, C-W. 2009. Detection and identification of enteroviruses from various drinking water sources in Taiwan. *Journal of Hydrology* 365(1-2):134-139.
- Hughes, C., Gillespie, I., Brien, S. 2007. Foodborne Transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Food Control*. 18(7):766-772.
- Isaacson, R.E., Torrence, M., Buckley, M.R., 2004. Preharvest Food Safety and Security. American Society for Microbiology, Washington, DC.
<<http://www.asm.org/Academy/index.asp?bid=33019>>
- Jackson, V., Blair, I., McDowell, D., Kennedy, J., Bolton, D. 2007. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control*, 18(4):346-351.
- Jaksie, S., Uhtil, S., Petrak, T., Bazulie, D., Gumhalter, L. 2002. Occurrence of *Vibrium* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. *Food Control*, 13(8):491-493.
- Jordan, C., Jensen, K., Yen, S. 2005. Awareness of foodborne pathogens US consumers. *Food Quality and Preference*, 16(5):401-412.

- Karoonuthaisiri, N., Charlermroj, R., Uawisetwathana, U., Luxananil, P., Kirtikara, K., Gajanandana, O. 2009. Development of antibody array for simultaneous detection of foodborne pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(6):1641-1648.
- Keller, J. 2004. Manual del Empleado de la Seguridad de los alimentos. Tercera Edición. J.J. Keller & Associates, Inc. Wisconsin EE.UU. pag.122
- Kobayashi, T., Enomoto, S., Sakazaki, R., Kuwahara, S., 1963. A new selective isolation medium for *Vibrium* group on a modified Nakanishi's medium (TCBS agar medium). *Japanese Journal of Bacteriology*, 18:387-392.
- Kural, A., Chen, H. 2008. Conditions for a 5-log reduction of *Vibrium vulnificus* in oysters through high hydrostatic pressure treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2):180-187.
- Kural, A., Shearer, A., Kingsley, D., Chen, H. 2008. Conditions for high pressure inactivation of *Vibrium parahaemolyticus* in oysters. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2):1-5.
- Laing, I. 2004. Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture: Elizabeth Gosling, Blackwell Science, UK. 2003. vii+443pp., illustrated hardback, price GBP69.50, ISBN 0 852 38234 0. *Aquaculture* 229(1-4): 507-508.
- Lee, C., Panicker, G., Bej, A. 2003. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLinkk NH microwell plate sandwich hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 53(2): 199-209.
- Lee, R., Younger, A. 2002. Developing microbiological risk assessment for shellfish purification. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(3-4):177-183.

- Lee, S., Wang, H., Law, S., Wu, R., Kong, R. 2002. Analysis of the 16S–23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine *Vibrio* for species-specific signature DNA sequences. *Marine Pollution Bulletin*, 44(5):412-420.
- LeJeune, J.T., Besser, T.E., Hancock, D.D., 2001. Cattle water troughs as reservoirs of *Escherichia coli* O157. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3053–3057. doi:10.1128/AEM.67.7.3053-3057.2001.
- Lhafi, S., Kühne, M. 2007. Occurrence of *Vibrium* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2):297-300.
- Li, H., Toubiana, M., Monfort, P., Roch, P. 2009. Influence of temperature, salinity and *E. coli* tissue content on immune gene expression in mussel: Results from a 2005–2008 survey. *Developmental and Comparative Immunology*, 33(9):974-979.
- Lozano, A., Torres, J., Osorio, C., Martínez, J. 2003. Identification of tdh-positive *Vibrium parahaemolyticus* from an outbreak associated with raw oyster consumption in Spain. *FEMS Microbiology Letters*, 226(2):281-284.
- Machado, I.C.; Paula, A.M.R.; Buzzo, A.; Jakabi, M.; Ristori, C.; Sakuma, H. 2001. Estudo da ocorrência de contaminação orgânica no estuário da Cananéia, como subsídio para a extração, manejo e cultivo da ostra do mangue (*Crassostrea brasiliana*). 2 - Análise da ostra (tecidos moles e líquido intravalvar). *Higiene Alimentaria* 15(83): 44-48.

- Mahmoud, B. 2009. Reduction of *Vibrium vulnificus* in pure culture, half shell and whole shell oysters (*Crassostrea virginica*) by X-ray. *International Journal of Food Microbiology*, 130(2):135-139.
- Martinez, J., Liebana, E. 2005. Investigation of clonal distribution and persistence of *Salmonella* Senftenberg in the marine environment and identification of potential sources of contamination. *FEMS Microbiology Ecology*, 52(2): 255-263.
- Martínez, R.; Villalobos, L. 2005. *Escherichia coli* enteropatógena en moluscos crudos y cocidos. *Revista Científica, FCV-LUZ* 15(2):163-167.
- Marvin, H., Kleter, G., Prandini, A., Dekkers, S., Bolton, D. 2009. Early identification systems for emerging foodborne hazards. *Food and Chemicals Toxicology*, 47(5):915-926.
- Mc Cabe, B., Beattie, S. 2004. Food Safety: Emerging Trends in Foodborne illness surveillance and prevention. *Journal of The American Dietetic Association*, 104(11):1708-1717.
- Mc Cance, H. 1979. Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos, pp. 132-136
- Mc Gee, P., Bolton, D.J., Sheridan, J.J., Earley, B., Kelly, G., Leonard, N., 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in farm water: its role as a vector in the transmission of the organism within herds. *Journal of Applied Microbiology* . 93, 706–713. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01752.

- McRae, M., Hamilton, C., Strachan, N., Wright, S., Ogden, I. 2005. The detection of *Cryptosporidium parvum* and *Escherichia coli* O157 in UK bivalve shellfish. *Journal of Microbiological Methods*, 60(3):395-401.
- Minami, A., Chaicumpa, W., Chongsa, M., Samosornsuk, S., Monden, S., Takeshi, K., Makino, S., Kawamoto, K. 2010. Prevalence of foodborne pathogens in open markets and supermarkets in Thailand. *Food Control*, 21(3):221-226.
- Miraglia, M.; Marvin, H.; Kleter, G.; Battilani, P.; Brera, C.; Coni, E.; Cubadda, F.; Croci, L.; De Santis, B.; Dekkers, S.; Filippi, L.; Hutjes, R.; Noordam, N.; Pisante, M.; Piva, G.; Prandini, A.; Toti, L.; Van Den Born, G. y Vespermann, A. 2009. Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Chemical Toxicology*, doi:10.1016/j.fct.2009.02.005.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Editorial Iberoamérica. México. 13-45p.
- Morillo, N., Belandria, J. 2007. Aspectos legales para la producción y comercialización de moluscos bivalvos en Venezuela. *INIA Divulga* enero /diciembre 2007: 2-5.
- Neill, M. 2004. Microbiological índices for total coliform and *E.coli* bacteria in estuarine waters. *Marine Pollution Bulletin*, 49:752-760.
- Oliveira, F., Geimba, M., Pasqualotto, A., Brandelli, A., Pasquali, G., Padilha, W., Tondo, E. 2009. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in southern Brazil. *Food Control*, 20(6):606-610.

- Oquendo, M. 2006. Incidencia de *E. coli* O157:H7 en carne proveniente de ganado Bovino de mataderos de Puerto Rico, Universidad de Mayagüez, Puerto Rico.
- Parrilla, M., Vázquez, J., Saldade, E., Nava, L. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. *Salud Pública de México*, 35(5):456-463.
- Parveen, S., Hettiarachchi, K., Bowers, J., Jones, J., Tamplin, M., McKay, R., Beatty, W., Brohawn, K., DaSilva, L., DePaola, A. 2008. Seasonal distribution of total and pathogenic *Vibrium parahaemolyticus* in Chesapeake bay oysters and waters. *International Journal of Food Microbiology*, 128:354-361.
- Pereira, M., Nunes, M., Nuernberg, L., Schulz, D., Batista, C. 2006. Microbiological quality of oysters (*Crassostrea gigas*) produced and commercialized in the coastal region of Florianópolis - Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2): 159-163.
- Prapaiwong, N., Wallace, R., Arias, C. 2009. Bacterial loads and microbial composition in high pressure treated oysters during storage. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3):145-150.
- Prescott, L., Harley, J., Klein, D. 1999. Microbiología. Primera Edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. Págs. 820-824, 955-957.
- Quevedo, F. 2002. Enfermedades emergentes y re-emergentes transmitidas por alimentos. *Ciencia e Investigación*, 2:25-35.
- Reuben, A.; Tremino, H.; Chávez, M.; Chávez, C. 2003. Presencia de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, y *Salmonella* spp, en alimentos de origen animal en Costa Rica. Facultad de Microbiología. Universidad de Costa Rica.

- Riou, P., Le Saux, J., Dumas, F., Caprais, M., Le Guyader, S., Pommepeuy, M. 2007. Microbial impact of small tributaries on water and shellfish quality in shallow coastal areas. *Water Research*, 41(12):2774-2786.
- Rojas, R.; González, T. 2006. Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica* 31(2):69-76.
- Roldan, M.; Chinen, I.; Otero, L.; Miliwebsky, E.; Alfaro, N.; Burns, P.; Rivas, M. 2007. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *E. coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Universidad Nacional del Litoral. Argentina.
- Rosec, J., Simon, M., Causse, V., Boudjemaa, M. 2009. Detection of total and pathogenic *Vibrium parahaemolyticus* in shellfish: Comparison of PCR protocols using pR72H or toxR targets with a culture method. *International Journal Of Food Microbiology*, 129(2):136-145.
- Sarcos, M., Botero, L. 2005. Calidad microbiológica de la almeja *Polymesoda sólida* recolectada en playas del Municipio Miranda del estado Zulia. *Ciencia*, 13(1):34-43.
- Schlundt, .2002. New directions in foodborne disease prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1-2):3-17.
- Senior, K. 2009. Estimating the global burden of foodborne disease. *The Lancet*, 9(2):80-81.
- Shen, X., Cai, Y., Liu, C., Liu, W., Hui, Y., Su, Y. 2009. Effect of temperature on uptake and survival of *Vibrium parahaemolyticus* in oysters (*Crassostrea*

plicatula), *International Journal of Food Microbiology*, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.012.

Silva, A.; Vieira, R.; Menezes, F.; Fonteles, A.; Torres, R.; Sant'Anna, E. 2003.

Bacteria of fecal origin in mangrove oysters (*Crassostrea rhizophorae*) in the cocó river estuary, ceará state, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 34:126-130.

Stivers, T. 2008. Diagnosing and treating deadly *Vibrium vulnificus* infection. *Journal of Emergency Nursing*, 34(2):139-141.

Suárez, Y.; Soca, M.; Fabrè, Y.; Sánchez, S.; Quintana, J.; Rojo, R.; Fuentes, M.; Barrios, A.; Guerrero, Y.; Castro, R.; Martínez, A.; Cepero, O. y Castillo, J. 2007. Estudio de algunos indicadores de riesgo asociados al manejo local de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA'S). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 8(8):1-11.

Tatcher, F; Clark, D. 1973. Análisis microbiológico de los alimentos. Editorial Acribia. 1^{era} edición. España. 271p.

Tauxe, R. 2002a. Emergin foodborne pathogens. *International Journal of food microbiology*, 78(1-2):31-41.

Tauxe, R. 2002b. Surveillance and investigation of foodborne diseases; roles for public health in meeting objectives for food safety. *Food control*, 116(2):363-369.

- Tauxe, R. 2008. Real Burden and potential risks from foodborne infections: the value of multijurisdictional collaborations. *Food Science and Technology*, 19(1):s18-s25.
- Tauxe, R., 1997. Emerging diseases: an evolving public health challenge. *Emerging Infectious Diseases* 3:425–434. <http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol3no4/tauxe.htm>.
- Téllez, S.; Oliva, M.; Ramírez de León, J.; Vázquez, M. 1999. Evaluación de la calidad microbiológica del ostión de "la laguna madre" de tamaulipas (México). *Ciencia y tecnología alimentaria* 2(3): 152-157.
- Tood, E. 2004. Microbiological safety standards and public health goals to reduce foodborne disease. *Meat Science*, 66(1):33-43.
- Umbuzeiro, G., Kummrow, F., Roubicek, D., Tominaga, M. 2006. Evaluation of the water genotoxicity from Santos Estuary (Brazil) in relation to the sediment contamination and effluent discharges. *Environment International*, 32(3):359-364.
- Umesha, K.; Bhavani, N.; Venugopal, N.; Karunasagar, Indrani.; Krohne, G. y Karunasagar, Iddya. 2008. Prevalence of human pathogenic enteric viruses in bivalve molluscan shellfish and cultured shrimp in south west coast of India. *International Journal of Food Microbiology*, 122(3):279-286.
- Vernocchi, P., Maffei, M., Lanciotti, R., Suzzi, G., Gardini, F. 2007. Characterization of Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) harvested in Adriatic Sea (Italy). *Food Control*, 18(12):1575-1583.

- Villalobos, L.; Elquezabal, L. 2001. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. *Acta Científica Venezolana* 52: 55-61.
- Wambier, S., Monteiro, T., Kolm, H., Cancela da Cruz-Kaled, A. 2008. Qualidade da água em área de cultivo de ostras na baía de guaratuba (paraná – brasil). *Ciências Biológicas e da Saúde*, 14(1):67-71.
- Wan, M., Poole, S., Deeth, H., Dykes, G. 2009. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: A review. *Food Control*, doi:10.1016/j.foodcont.2009.06.020.
- Webster, L., Thompson, B., Fulton, M., Chestnut, D., Van Dolah, R., Leight, A., Scott, G. 2004. Identification of sources of *Escherichia coli* in South Carolina estuaries using antibiotic resistance analysis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298(2):179-195.
- Wetz, J.J., Lipp, E.K., Griffin, D.W., Lukasik, J., Wait, D., Sobsey, M.D., Scott, T.M., Rose, J.B., 2004. Presence, infectivity, and stability of enteric viruses in seawater: relationship to marine water quality in the Florida Keys. *Marine Pollution Bulletin* 48:698–704. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.09.008.
- Williams, H., Macey, B., Burnett, L., Burnett, K. 2009. Differential localization and bacteriostasis of *Vibrium campbellii* among tissues of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(4):592-600.
- Yamamoto, A., Iwahori, J., Vuddhakul, V., Charenjiratragul, W., Vose, D., Osaka, K., Shigematsu, M., Toyofuku, H., Yamamoto, S., Nishibuchi, M., Kasuga, F.

2008. Quantitative modeling for risk assessment of *Vibrium parahaemolyticus* in bloody clams in southern Thailand. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1):70-78.

Yongxing, L., Yuanqian, L., Bo, Z., Lingli, Q., Can, L. 2009. Determination of foodborne pathogenic bacteria by multiplex PCR-microchip capillary electrophoresis with genetic algorithm-support vector regression optimization. *Analytica Chemica Acta*, 643(1-2): 100-107.

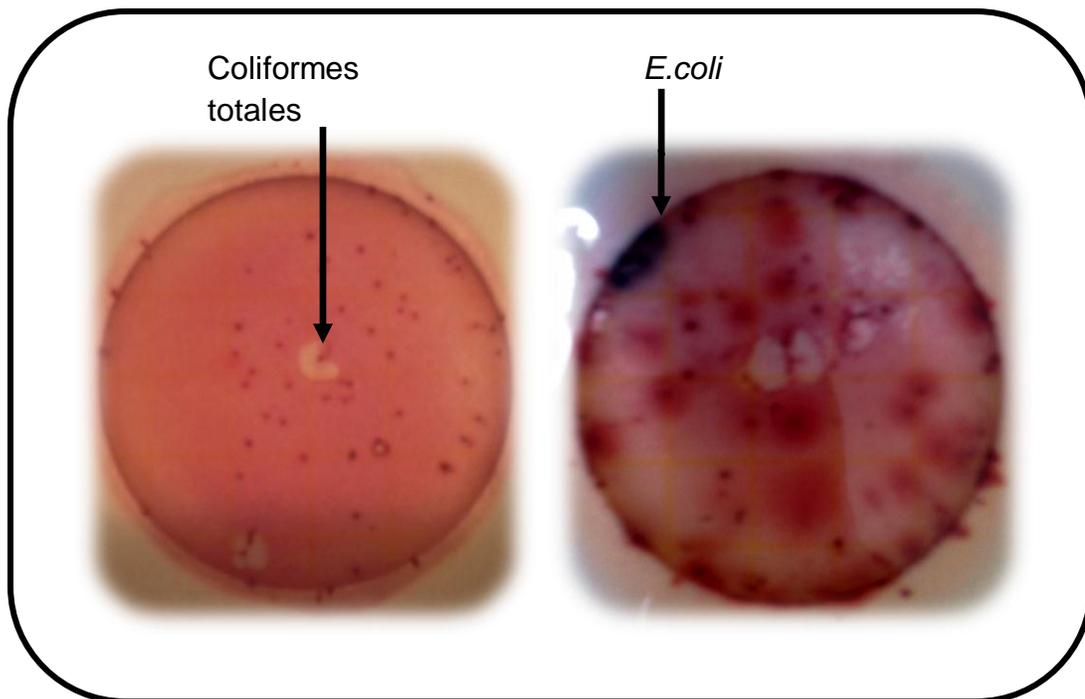
Consultas en línea

- http://blogs.phillyburbs.com/news/bcct/wpcontent/blogs.dir/2/files/2009/January/Friday/salmonella_T.jpg [consulta 10 de octubre de 2009]
- http://farm1.static.flickr.com/64/175088375_66e5c97874.jpg [consulta: 18 de octubre de 2009]
- http://multimedia.3m.com/mws/mediawebserver?mwsId=SSSSSu7zK1fslxtUmx_v58_9ev7qe17zHvTSevTSeSSSSSS-- [consulta: 18 de octubre de 2009]
- <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/Vibrium-para-dk.jpg> [Consulta: 10 de octubre de 2009]
- http://www.universityofcalifornia.edu/everyday/agriculture/images/e_coli.jpg [consulta: 10 de octubre de 2009]
- Organización Mundial de la Salud. Estrategia global de la OMS para la inocuidad de alimentos. 2002. http://www.who.int/foodsafety/publications/general/en/strategy_es.pdf. [Consulta 12 de septiembre de 2009]

- Organización Mundial de la salud. Initiative to estimate the Global Burden of Foodborne Diseases. 2009.
http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/ferg/en/index.html. [Consulta 12 de septiembre de 2009].
- www.foodpoisonjournal.com/tags/e-coli/ [consulta: 10 de octubre de 2009]
- www.ibal.gov.co/controldecalidad/portafolio.htm [consulta: 10 de octubre de 2009]

ANEXOS

[Escriba texto]

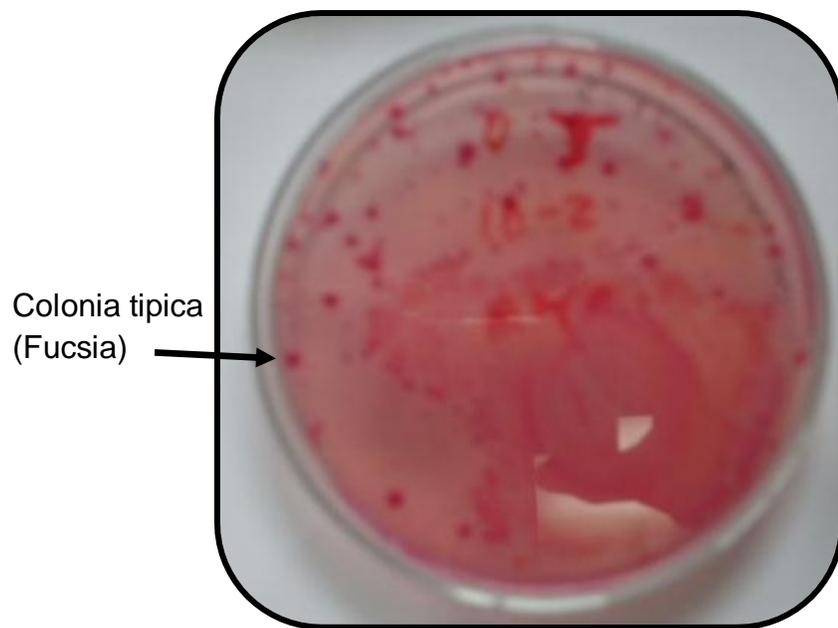


ANEXO A: Placas pretrifilm con crecimiento bacteriano característico de coliformes totales y *E.coli*



ANEXO B: Placas pretrifilm sin crecimiento bacteriano característico

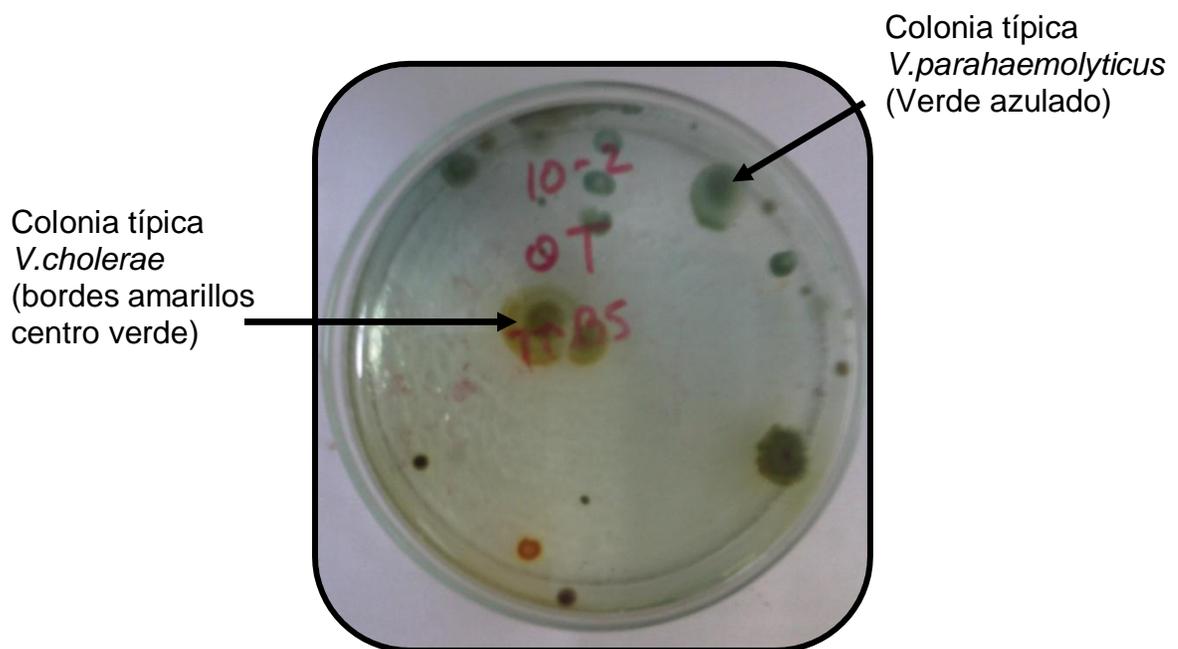
[Escriba texto]



Colonia tipica
(Fucsia)

ANEXO C: Placas petri con agar Agar McConkey-Sorbitol para *E. coli* O157:H7

[Escriba texto]



ANEXO D: Placas petri con agar cólera TCBS para *Vibrio* spp. con crecimiento característico de *V.parahaemolyticus* y *V.cholerae*