

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL
(ETSIAMN)



TÍTULO

DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD HIGIÉNICO-SANITARIA Y
RELACIÓN CON LA PRESENCIA DE PATÓGENOS EN MOLUSCOS
BIVALVOS

ALUMNO/A: Laura Almenar Rivilla

TUTOR/A: Ana González Pellicer

COTUTOR/A: María Antonia Ferrús Pérez

Curso Académico: 2013-2014

VALENCIA, 30 DE JUNIO DEL 2014

Licencia Creative Commons "Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada".



TÍTULO

Determinación de la calidad higiénico-sanitaria y relación con la presencia de patógenos en moluscos bivalvos.

RESUMEN

En este trabajo, enmarcado dentro de la seguridad alimentaria, se propone la determinación de la calidad microbiológica de muestras de alimentos presentes en el mercado. Concretamente, se analizaron muestras de moluscos bivalvos vivos. Se determinó la contaminación de microorganismos indicadores, así como la posible presencia de patógenos, de acuerdo con la legislación española para este tipo de productos. Se analizó también la presencia de patógenos emergentes del género *Arcobacter*. Las muestras se analizaron además por métodos moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, y los resultados se compararon para obtener conclusiones sobre la calidad del producto que llega al consumidor y el método más adecuado para su determinación. Por último, se hizo un breve estudio sobre resistencia a antibióticos de las cepas aisladas.

ABSTRACT

In this work, part of food security, the determination of the microbiological quality of food samples on the market is proposed. Specifically, samples were analyzed bivalve molluscs. Pollution indicator organisms was determined, and the possible presence of pathogens, according to the Spanish legislation for this type of products. The presence of emerging pathogens of the genus *Arcobacter* was also analyzed. Samples were also analyzed by molecular methods such as chain reaction polymerase, PCR, and results were compared to draw conclusions about the quality of the product that reaches the consumer and the most appropriate method for their determination. Finally, a brief study on antibiotic resistance of isolated strains was made.

PALABRAS CLAVE: Moluscos bivalvos vivos, *E. coli*, *Salmonella*, *L. monocytogenes*, *Arcobacter*, coliformes totales, calidad, seguridad alimentaria, resistencia a antibiótico, PCR.

ALUMNO/A: Laura Almenar Rivilla

TUTOR/A: Ana González Pellicer

COTUTOR/A: María Antonia Ferrús Pérez

VALENCIA, 30 DE JUNIO DEL 2014

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”.



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que hicieron posible este trabajo.

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutoras Ana González Peciller y a M^a Antonia Ferrús Pérez por este trabajo porque es tanto mío como suyo. Tampoco olvidarme de Ana I. Jiménez Belenguer que, aunque no haya sido mi tutora, para mí ha sido una tercera tutora siendo este trabajo también suyo. Gracias a las 3 por animarme en los peores momentos y por haberme ayudado tanto y aconsejado. Tampoco olvidar la paciencia que han tenido conmigo.

En segundo lugar, agradecer a los compañeros y profesores del laboratorio por haberme ayudado en él y resuelto aquellas dudas. Destacar especialmente a Favian Bayas Morejón, que ha sido un pilar importante en mi evolución del trabajo con *Arcobacter* en moluscos.

En tercer lugar y no menos importante, agradecer a mis amigos, tanto de la Universidad como fuera de ella, destacando a Fran por la paciencia y los ánimos durante tanto tiempo en la universidad: a Raquel por apoyarme y aconsejarme en todos los pequeños detalles; y a Jorge, por estar ahí día a día escuchándome, animándome y apoyándome en todo momento, ofreciéndome incluso su ayuda a pesar de no conocer el tema.

Tampoco me puedo olvidar de Elías, siendo un apoyo incondicional junto con mi familia en este trabajo. No lo hubiera podido conseguir sin él.

Por último, quiero agradecer muy especialmente a mi familia, tanto la de Alcázar como la de Madrid y Valencia. Darle las gracias a mis padres (Elena y Javi) por ofrecerme su apoyo incondicional y estar ahí en todos estos años y animándome en mis momentos de debilidad. A mi hermano Javier por aconsejarme. Y destacar a Iván, mi primo y mi gran ejemplo a seguir, por corregirme y aconsejarme en esta etapa y en este trabajo a pesar de tener unos conocimientos básicos en esta materia.

ÍNDICE

1. MOLUSCOS Y MICROBIOTA	7
1.1 INTRODUCCIÓN.....	7
1.2 MICROBIOTA.....	7
1.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	7
1.4 INTOXICACIONES EN MOLUSCOS.....	8
1.5 CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS MOLUSCOS	8
2. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS	8
3. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	9
3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN.....	9
3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	9
3.3 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN	10
3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	10
4. <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	11
4.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN.....	11
4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	12
4.3 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN	12
4.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS: LISTERIOSIS	13
5. GÉNERO <i>SALMONELLA</i>	13
5.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN.....	13
5.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	14
5.3 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN	14
5.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS: SALMONELOSIS.....	15
6. GÉNERO <i>ARCOBACTER</i>	15
6.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN.....	15
6.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	16
6.3 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN	17
6.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS	17
7. IMPORTANCIA A LA RESISTENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN MICROBIOTA DE MOLUSCOS.....	18
8. MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS.....	20
8.1 PCR.....	20
9. OBJETIVOS.....	21
10. MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
10.1 TOMA DE MUESTRAS.....	22
10.2 ANÁLISIS DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN BIVALVOS	22
10.2.1 AEROBIOS MESÓFILOS	22
10.2.2 DETECCIÓN DE <i>E. COLI</i>	23
10.2.2.1 RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS LACTOSA POSITIVO (COLIFORMES) POR EL MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.....	23
10.2.2.2 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. COLI</i>	23
10.2.2.3 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MEDIANTE EL MÉTODO DE ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA	23

10.2.3	RECuento DE <i>LISTERIA monocytogenes</i>	24
10.2.4	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i>	25
10.2.4.1	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> MEDIANTE LA NORMA ISO 6579	25
10.2.4.2	MÉTODO MOLECULAR DE DETECCIÓN: PCR PARA <i>SALMONELLA</i>	25
10.2.5	DETECCIÓN <i>ARCOBACTER</i>	26
10.2.5.1	CULTIVO EN PLACA DE <i>ARCOBACTER</i>	26
10.2.5.2	MÉTODO MOLECULAR DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN: PCR DE <i>ARCOBACTER</i>	26
11.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
11.1	MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS	28
11.2	<i>LISTERIA monocytogenes</i>	28
11.3	<i>E. COLI</i> Y COLIFORMES TOTALES.....	29
11.3.1	SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DEL AISLADO	30
11.4	<i>SALMONELLA</i>	31
11.4.1	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> spp.	31
11.4.2	MÉTODO MOLECULAR MEDIANTE PCR PARA LA DETECCIÓN DE <i>SALMONELLA</i>	31
11.5	<i>ARCOBACTER</i>	32
11.5.1	DETECCIÓN DE <i>ARCOBACTER</i>	32
11.5.1.1	POR CULTIVO EN PLACA.....	32
11.5.1.2	POR MÉTODO MOLECULAR.....	33
11.5.1.3	COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS MÉTODOS	34
12.	CONCLUSIONES.....	36
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	37
14.	ANEJOS.....	43
14.1	PROTOCOLOS DE LOS MÉTODOS.....	43
14.1.1	AEROBIOS MESÓFILOS	43
14.1.2	DETECCIÓN DE <i>E. COLI</i>	44
14.1.3	RECuento DE <i>LISTERIA monocytogenes</i>	45
14.1.4	DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE <i>SALMONELLA</i> MEDIANTE LA NORMA ISO 6579	46
14.1.5	DETECCIÓN <i>ARCOBACTER</i>	47
14.2	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	48
14.3	ÍNDICE DE TABLAS.....	50
14.4	ÍNDICE DE FIGURAS	51

1. MOLUSCOS Y MICROBIOTA

1.1. INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos (ostras, almejas, berberechos, vieiras, chirlas y mejillones) son animales invertebrados, filtradores inmóviles y, en consecuencia, su microbiota depende enormemente de la calidad del agua donde residen, la calidad del agua de lavado y de otros factores, como puede ser la temperatura del agua donde se han recogido, la zona de pesca y la estación del año. También influyen la salinidad, la concentración de oxígeno disuelto y el pH (Montville y Mattnews, 2008) es decir, es un reflejo del agua donde se ha capturado o desarrollado (Jay *et al.*, 2005).

A veces, los moluscos pueden ser capturados en zonas cercanas a las costas, por lo que están expuestos a contaminaciones de origen terrestre, de aquí que el análisis microbiológico deba estar dirigido a la investigación de la microbiota de origen fecal. Además, su presencia en los moluscos bivalvos tiene que ver con el lugar de desarrollo de estos animales y su forma de alimentarse, ya que la concentración de microorganismos en su cuerpo es notable, sobre todo si los moluscos se consumen crudos (Pascual y Calderón, 2000). El hecho que se capturen en diferentes regiones del mundo, hace que haya diferencias muy marcadas en los niveles de contaminación, en la composición genérica y en las características fisiológicas de las especies aisladas (Horsley, 1977).

1.2. MICROBIOTA

A pesar de que la microbiota de los moluscos ha sido poco estudiada, se han identificado los siguientes géneros bacterianos en bivalvos vivos: *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Shewanella putrefaciens*, *Lactobacillus*, *Flavobacterium/Cytophaga*, corineformes y *Micrococcus*. (Romero *et al.*, 2002; Cann, 1977). También pueden deteriorar los moluscos microorganismos pertenecientes a los siguientes géneros *Acinetobacter/Moraxella* (Montville y Mattnews, 2008), *Vibrio*, *Achromabacter* y escasos microorganismos grampositivos (Pascual y Calderón, 2000).

En los moluscos alterados aumenta considerablemente el recuento total microbiano y predominan las bacterias gramnegativas proteolíticas: *Pseudomonas* y *Vibrio* y sacarolíticas (*Lactobacillus*). Entre los microorganismos más importantes en seguridad alimentaria están los de origen entérico: *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio Cholerae*, *Escherichia coli*, virus, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus enterotoxigénico*, etc. (Pascual y Calderón, 2000).

1.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los problemas más importantes de salud pública relacionados con el consumo de moluscos bivalvos vivos derivan fundamentalmente de su capacidad para concentrar los virus y las bacterias de las aguas que les rodean, así como de la frecuente contaminación de estas aguas con aguas residuales y de la rutina de consumir algunos moluscos, después de una cocción relativamente ligera (ICMSF, 1998) o de los microorganismos que pueden acceder, entre otras cosas, cuando se produce la apertura de dichos moluscos. Por ello, la calidad sanitaria de las aguas donde se capturan los moluscos es un factor crítico para la determinación de la calidad microbiológica de éstos (Silverman *et al.*, 1961).

Los periodos de conservación normales son de ocho a diez días. La principal alteración que sufren los moluscos es fermentativa, siendo los microorganismos los principales responsables (Liston, 1980). Los moluscos se alteran más rápidamente que los peces porque son más pequeños, no se evisceran después de la captura y sufren rápidamente autólisis enzimática y son más ricos en aminoácidos, lo que favorece el crecimiento bacteriano (Early y Stroud, 1982) y, por tanto son más propensos a alterarse rápidamente, siendo éste un factor que explica la costumbre corriente de mantenerlos vivos hasta inmediatamente antes de su consumo (ICMSF, 1998).

1.4. INTOXICACIONES EN MOLUSCOS

Los moluscos bivalvos son portadores en ocasiones de biotoxinas marinas. Éstas producen distintos trastornos para la salud después de consumir determinadas sustancias tóxicas. (Pascual y Calderón, 2000). Los moluscos, y especialmente los mejillones, filtran grandes cantidades de agua de mar para retener el plancton que les sirve de alimento. En esta operación, se fijan las toxinas en el hepatopáncreas de los mejillones y en el sifón de las almejas. El hombre, al consumirlos, presenta diversos cuadros de intoxicación, según las especies de toxinas acumuladas (Pascual y Calderón, 2000).

Son frecuentes los casos de fiebres tíficas, paratíficas y hepatitis víricas por consumo de ostras. Los mejillones crudos, mal cocinados o recontaminados pueden ser la causa de fiebres tíficas y salmonelosis (Pascual y Calderón, 2000). Hay muchos casos de intoxicación alimentaria por consumo de moluscos, entre ellos, un brote por biotoxinas alimentarias debido al consumo de moluscos y pescados en España durante 2003-2006 con diversos síntomas como diarrea, cefalea, insuficiencia respiratoria o pérdida de la memoria (ISC, 2007). Otro caso es el consumo de moluscos bivalvos como agentes transmisores del virus de la hepatitis A (Marañón *et al.*, 2013) y también la detección de un brote de hepatitis A en Ceuta por el consumo de navajas (Ortega *et al.*, 2008).

1.5. CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LOS MOLUSCOS

Según la legislación vigente para moluscos vivos, se realizan los análisis microbiológicos correspondientes al recuento de aerobios mesófilos y *Listeria*, y aislamiento y detección de *Salmonella* y *E. coli*.

Tabla 1. Criterios de seguridad alimentaria aplicables a moluscos bivalvos vivos.

Criterios de seguridad alimentaria			
Parámetro	<i>Salmonella</i>	<i>Escherichia coli</i> .	<i>Listeria monocytogenes</i>
Método de referencia	EN/ISO 6579	ISO TS 16649-3	ISO 11290-2
Criterio microbiológico	n=5, c=0, m=Ausencia en 25 g, M= Ausencia en 25 g	n=1, c=0, m=230 NMP/100 g de carne y líquido intervalvar, M= 230 NMP/100 g de carne y líquido intervalvar	n= 5, c= 0 , m= 100 ufc/g, M= 100 ufc/g.
Fase en la que se aplica el criterio	Productos comercializados durante su vida útil		
Interpretación del resultado	Satisfactorio, si todos los valores observados indican ausencia de la bacteria. Insatisfactorio, si se detecta la presencia de la bacteria en cualquiera de las muestras	Satisfactorio, si todos los valores observados son ≤ m. Insatisfactorio, si alguno de los valores observados son > al límite.	Satisfactorio, si todos los valores observados son ≤ m. Insatisfactorio, si alguno de los valores observados son > al límite

Aunque no está recogido en la legislación, también es interesante determinar la presencia de bacterias pertenecientes al género *Arcobacter* en este tipo de muestras por el elevado número de nuevas especies obtenidas a partir de moluscos (Levicán *et al.*, 2014).

En los criterios de seguridad alimentaria en moluscos bivalvos vivos Reglamento CE 2073/05, DOUE L338/1 22.12.2005, modificado por el Rto. CE 1441/2007. DOUE L322/12 7.12.2007 se establecen los criterios microbiológicos a controlar aplicables a los moluscos bivalvos vivos, los cuales aparecen en la tabla 1.

2. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS

Son aquellos microorganismos capaces de multiplicarse en aerobiosis a unas temperaturas medias, comprendidas entre 25 y 40-45 °C. Normalmente, se van a cultivar de forma óptima a 31 ± 1 °C durante 72 horas, en un agar determinado para dar unas colonias visibles y poder realizar el recuento correspondiente (Pascual, 1989). Su recuento estima la microbital, es decir,

va a incluir los microorganismos patógenos y no patógenos. Estos microorganismos tienen una tasa de crecimiento bastante elevada y su tiempo de generación es corto (Pascual, 1989; Pascual y Calderón, 2000).

El recuento de microorganismos aerobios mesófilos reconoce, en conjunto, la calidad microbiológica o sanitaria de los alimentos analizados, probando la forma como fueron manipulados durante su elaboración, sin relacionarla con la posible presencia de microorganismos patógenos o sus toxinas ya que éstos se deben buscar de forma directa por procedimientos específicos que permitan conocer la peligrosidad o inocuidad de dichos alimentos. Un recuento bajo no va a garantizar que el alimentos analizado esté exento de patógenos o sus toxinas (Pascual y Calderón, 2000).

Exceptuando aquellos productos que han sido elaborados por fermentación, altos recuentos microbianos son poco aconsejables para la mayor parte de alimentos, indicando defectos en el procesamiento. Sus posibles causas pueden ser varias (Pascual y Calderón, 2000): que la materia prima de la cual proviene esté muy contaminada o por los deficientes métodos de manipulación durante la elaboración de los productos. Altos recuentos de mesófilos aerobios suelen ser signo de inmediata alteración del producto. Tasas superiores a 10^6 - 10^7 microorganismos por gramo suelen ser ya inicio de deterioro. Se puede concluir diciendo que, un alimento cuya microbiota es alta, debe ser considerado el alimento como impropio para el consumo humano (Pascual, 1989).

3. *ESCHERICHIA COLI*

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN

El bacteriólogo alemán Theodor Escherich aisló por primera vez en 1885 en heces de niños con enteritis (ICMSF, 1998), la bacteria que conocemos como *Escherichia coli* (Pascual, 1989). El estudio científico que se ha elaborado desde esa fecha ha sido muy extenso, por lo que, en la actualidad, posiblemente sea el microorganismo que mejor se conoce (ICMSF, 1998).

E. coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y al género *Escherichia*. Muchas de las cepas de *E. coli* no producen enfermedad, y se consideran comensales aprófitos. Sin embargo, se han determinado varios tipos de *E. coli* enteropatógenas, basándose en diferentes factores de virulencia: *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enterotoxígena (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEA) y *E. coli* de adherencia difusa (ECAD). Existe una mayor información de los primeros cuatro tipos mencionados, pero se conocen peor la patogenicidad y la prevalencia de cepas de ECEA y ECAD (O'Connor, 2002).

3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

E. coli es un huésped universal del intestino del hombre y de los animales de sangre caliente. Dado que está presente de forma habitual en las heces, su fácil cultivabilidad, su carácter patogénico y su supervivencia en agua, se ha adoptado como indicador de contaminación fecal y de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua (ICMSF, 1998). Puesto que *E. coli* es un huésped del tracto intestinal, fuera de éste va a vivir durante muy poco tiempo (Pascual y Calderón, 2000).

Es una bacteria Gram-negativa, de forma bacilar corta, catalasa positiva, oxidasa negativa y anaerobia facultativa. La mayoría de las cepas son capaces de fermentar la lactosa (Adams y Moss, 1997) con producción de ácido y gas una vez ha pasado 24-48 h. Normalmente es ureasa negativo con excepciones y algunas cepas son sulfhídrico positivas aunque la mayoría son negativas. Además, es no esporógeno (ICMSF, 1998). Es rojo de metilo positivo y Voges-Proskauer negativo y no crece en el medio de citrato de Simmons, produciendo indol la mayoría de cepas (IMViC +++- o +-+-) (Evans *et al.*, 1979).

En 1945, Kauffmann realizó un estudio acerca de la estructura antigénica de las cepas (Pascual, 1989), llegando a la conclusión en que las cepas se distinguen unas de otras en base a los

antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K) (Adams y Moss, 1997), aunque raramente son encapsulados (Pascual, 1989).

E. coli crece en unos límites de temperatura amplios, entre 15 y 45°C (Pascual, 1989). En cambio, hay algunas cepas que crecen a temperaturas tan bajas como son 4°C (ICMSF, 1998). Normalmente su temperatura óptima va a ser 44°C. El calor los destruye a 60°C en 15 minutos y a 55°C en una hora (Pascual, 1989), es decir, se elimina a temperatura de pasteurización y también cuando se almacena el producto en frío, sobre todo a temperatura de congelación (Pascual y Calderón, 2000).

3.3 EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

La posible contaminación fecal en las redes de abastecimiento de agua y los manipuladores de alimentos contaminados, han sido implicados frecuentemente en distintos brotes de enfermedad (ICMSF, 1998). La mayoría de los brotes relacionados con este microorganismo han sido debido al consumo de carne picada de vacuno poco cocida y brotes relacionados con alimentos elaborados con leche cruda (Doyle y Padye, 1989). También existen brotes que relacionan el consumo de moluscos y la presencia de *E. coli* en ellos, como es el caso de una posible detección de *E. coli* enteropatógena en bivalvos en Cumaná, Venezuela debido sobre todo a una contaminación cruzada entre el manipulador y los moluscos (Martínez y Villalobos, 2005).

La investigación de *E. coli* en alimentos sigue siendo un problema debido a que no existen medios selectivos específicos para diferenciar cada una de las cepas en el resto de éstas. Por tanto, su recuperación en los distintos alimentos es mucho más complicado que cuando se aísla en distintas muestras clínicas de enfermos (Pascual, 1989).

La tendencia en los casos humanos de *E. coli* productoras de verocitotoxina (VTEC / STEC), ha ido en aumento desde 2008 y se fortaleció aún más debido a un brote en el verano de 2011 (EFSA, 2013). En 2012 el número de casos disminuyó un 40% respecto al año anterior (5.671 frente a 9.485 casos en 2011). Esta bacteria está mayoritariamente asociada a la carne y al ganado vacuno, aunque en 2011 hubo un gran brote en Alemania y Francia asociado al consumo de semillas germinadas, por la cepa O104:H4. La tendencia en España, al igual que en la UE, es de aumento los últimos años (EFSA, 2014).

3.4 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En cuanto a síntomas y signos, va a depender del tipo de *E. coli* patógeno intestinal que va a causar la infección. A continuación se resume en la siguiente tabla los distintos tipos de *E. coli* con sus signos y síntomas (Doyle y Padye, 1989).

Tabla 2. Tipos de *E. coli* patógenos (Doyle y Padye, 1989)

Tipo de <i>E. coli</i> patógeno	Tiempo para el comienzo	Duración de la enfermedad	Síntomas
Enteropatógeno (EPEC)	17-72 h (prom. 36h)	6h-3d (prom. 24h)	Diarreas, náuseas, dolor abdominal, vómito, fiebre, escalofríos, cefalalgia,...
Enterotoxigénico (ETEC)	8-44 h (prom. 26h)	3-19d	Diarrea acuosa, fiebre ligera, retortijones abdominales, malestar, náuseas, en la forma más grave cólera,...
Enteroinvasor (EIEC)	8-24 h (prom. 11h)	Días a semanas	Diarrea profusa o disentería, escalofríos, fiebre, cefalalgia, mialgia, retortijones abdominales; con frecuencia las deposiciones contienen moco y vetas de sangre
Enterohemorrágico (EHEC)	3-9d (prom. 4d)	2-9d	Colitis hemorrágica, diarrea muy sanguinolenta, dolor abdominal intenso, vómito, sin fiebre. Síndrome urémico hemolítico (SUH)

Se cree que las personas portadoras, ya sean sintomáticas o asintomáticas, son el reservorio principal y la fuente de las distintas cepas. Se encuentran presentes en el tracto intestinal y van a

ser excretados en las heces. Algunas medidas importantes para evitar esta contaminación incluye la formación de los operarios que manipulan de distintas formas los alimentos y una higiene personal adecuada, calentamiento adecuado de los alimentos para destruir los patógenos y mantener los distintos alimentos en unas buenas condiciones para que no se produzca una proliferación de las bacterias. Además, no se deben utilizar aquellas aguas residuales humanadas que no hayan sido tratadas, ni agua no clorada para abonar alimentos o para lavar utensilios que se vayan a utilizar después para modificar el estado inicial de los alimentos (Adams y Moss, 1997).

Los alimentos de origen animal pueden estar contaminados por distintas vías, entre ellas exponerlos a un calentamiento insuficiente con lo cual no se destruye dicho microorganismo, a través de contaminaciones cruzadas entre un alimento crudo y otro tratado o entre uno tratado y un utensilio que no ha sido lavado. También pueden estar contaminados los animales si han estado en contacto con materia fecales en distintas operaciones como puede ser el sacrificio o el ordeño (Adams y Moss, 1997).

4. LISTERIA MONOCYTOGENES

4.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN

En la última década, la listeriosis ha sido una de las principales enfermedades de origen alimentario (Doyle *et al.*, 1997). *Listeria monocytogenes*, por su gran interés para la salud pública y su impacto económico, es uno de los microorganismos más importantes en las últimas décadas (Pascual y Calderón, 2000).

Fueron Murray y colaboradores quienes hicieron una descripción clara en 1926 con el nombre de *Bacterium monocytogenes* (ICMSF, 1998), que causaba enfermedad en conejos y cobayas, ya que infectaba a los monocitos (leucocitos) de la sangre (Adams y Moss, 1997). Desde su aislamiento, se ha nombrado de muchas formas. Primero se nombró *Bacterium monocytogenes*, por ser la monocitosis uno de los síntomas de la enfermedad. Después pasó a llamarse *Listeria hepatolytica*, en honor a Lister y por su asociación con una alteración del hígado de conejo. Por último, se denominó *Listeria monocytogenes*, nombre que está descrito desde 1940 por Pirie (Pascual y Calderón, 2000).

El género *Listeria* engloba seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Sólo *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenas. La primera es un patógeno humano; en cambio, la segunda es un patógeno animal (Montville y Mattews, 2008). En la siguiente tabla se muestra la taxonomía del género *Listeria* y la especie más importante de ésta: *L. monocytogenes*.

Tabla 3. Taxonomía Género *Listeria* (Collins *et al.*, 1991)

Dominio	Bacteria
Phylum	Firmicutes
Clase	Bacillus
Orden	Bacillales
Familia IV	<i>Listeriaceae</i>
Género II	<i>Listeria</i>
Especies	<i>L. ivanovii</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>L. innocua</i>
	<i>L. seeligeri</i>
	<i>L. welshimeri</i>
	<i>L. grayi</i>

Debido a este microorganismo se han relatado infecciones en una gran variedad de animales incluyendo el ganado vacuno y ovino, los roedores, los peces, las aves (Gray y Killinger, 1966) y también en las personas (Seeliger, 1961). *L. monocytogenes* tiene 13 serovariedades con

diferentes grupos antigénicos. Estas serovariedades son las causantes de la mayoría de los casos de listeriosis identificados en humanos (Doumith *et al.*, 2004).

4.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

La especie *L. monocytogenes* está formada por bacilos cortos y con extremos redondeados que miden entre 0,5-2 μ de largo por 0,2-0,5 μ de grueso y; a veces, puede adoptar forma de cocobacilo. Se puede presentar aislado, en parejas, cadenas cortas o agrupado en V (Pascual y Calderón, 2000). Son Gram-positivos, hemolíticos, no esporulados ni ácido-resistentes, anaerobios facultativos, catalasa-positivos y oxidasa-negativos (ICMSF, 1998). Son móviles a 25°C pero inmóviles a 35°C (Adams y Moss, 1997), debido a sus flagelos peritricos (ICMSF, 1998). La movilidad es óptima entre 20-22°C (Pascual y Calderón, 2000). Además, carece de cápsula (Pascual, 1989).

Las colonias de *L. monocytogenes* tienen un aspecto característico gris-azulado cuando crecen en la superficie del agar triptosa, que cambia a azul-verde cuando se observan con luz oblicua (Adams y Moss, 1997, ICMSF, 1998).

En cuanto a temperaturas de crecimiento, tiene un límite muy amplio, comprendido entre 1°-45°C, con una óptima de 30-37°C. Es una bacteria psicrófila. Para que se destruya se necesita alcanzar una temperatura de 70°C alrededor de 2-3 minutos (Pascual y Calderón, 2000). Además, la congelación no va a reducir el tamaño de la población bacteriana (Montville y Mattews, 2008). Respecto al pH, es capaz de desarrollarse entre 5,1 y 9,6. Su pH óptimo es 7,5 (Pascual y Calderón, 2000). *L. monocytogenes* crece de forma óptima en una actividad de agua (a_w) \geq 0,97. (Montville y Mattews, 2008). Este microorganismo es muy tolerante a la sal, creciendo en un 10% de cloruro de sodio y es capaz de sobrevivir durante un año en un 16% de NaCl a pH 6,0 (ICMSF, 1998).

4.3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

L. monocytogenes es un microorganismo ubicuo en el ambiente, se ha podido aislar tanto en el agua dulce como salada, en el suelo, en el lodo de las aguas residuales, en los vegetales en putrefacción, en el ensilado, etc. (ICMSF, 1998). *L. monocytogenes* ha sido aislada en muchos grupos de alimentos, como puede ser la leche y los productos lácteos, productos cárnicos, productos del mar, etc. En cuanto a productos del mar incluye crustáceos, moluscos y pescados frescos, ahumados o incluso congelados. Los moluscos bivalvos vivos de los cuales cabe destacar los mejillones, las almejas y las ostras, pueden presentar un alto riesgo de “listeriosis” (Montville y Mattews, 2008). El predominio de esta bacteria en los moluscos crudos y listos para consumir puede ser elevado de hasta el 25% (Farber, 1991).

Estudios realizados en UK, en EEUU, en Australia y otros, han demostrado una gran frecuencia de aislamiento de *L. monocytogenes* en carnes y productos cárnicos, donde generalmente predomina el serotipo 1 (ICMSF, 1998). Como se muestra en la siguiente tabla, hay una gran variedad de alimentos en los que se han detectado las distintas especies del género *Listeria*.

Tabla 4. Obtención de especies en alimentos (Jay *et al.*, 2005)

<i>L. monocytogenes</i>	Productos lácteos, productos cárnicos y productos del mar (moluscos,...)
<i>L. innocua</i>	Detectado en leche, carne, productos de la pesca congelados, queso semicurado, nuestras de huevo entero y hortalizas (Loessner <i>et al.</i> , 1990)
<i>L. welshimeri</i>	Aislado en leche cruda, carne asada, hortalizas y carne de pavo. También en salchichas de cerdo y carne de cerdo en Alemania (Schmidt <i>et al.</i> , 1988) y productos de delicatessen en Francia (Nicolas y Vidaud, 1987)
<i>L. grayi</i>	Leche cruda, carne de vacuno y de aves
<i>L. seeligeri</i>	Leche cruda, hortalizas, coles, rábanos, carne de cerdo y salchichas de cerdo (Jay, 1996)
<i>L. ivanovii</i>	Es patógena en animales (Montville y Mattews, 2008)

Las vías de contaminación suelen ser por contacto a través de la piel y por vía digestiva. La enfermedad que va a producir se llama listeriosis (Pascual, 1989).

4.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS: LISTERIOSIS

El primer brote, a causa de una ensalada de col, se conoció en 1981 (Montville y Mattnews, 2008). Desde entonces, ha habido un número creciente de brotes descritos, en lo que han estado implicados diversos alimentos, en Europa y en América del Norte. Los alimentos contaminados más frecuentes son: ensalada de col, hortalizas crudas (apio, tomates y lechuga), leche pasteurizada procedente de un rebaño con listeriosis, queso de estilo mexicano y queso blando, de tipo vacherin. La mayoría de los casos de listeriosis humana son esporádicos. El tiempo de incubación de hasta 5 semanas dificulta el origen de la infección con el alimento y el examen de aquellos alimentos posiblemente infectados (Montville y Mattnews, 2008). Esta enfermedad ha sido notificada principalmente en países industrializados; la incidencia en África, Asia y América del Sur se desconocen o es baja (Doyle *et al.*, 1997). El número de casos en Europa aumentó ligeramente en el 2012 respecto a 2011. En 2012 se notificaron 1.642 casos humanos confirmados. En este microorganismo, al contrario que en *Salmonella*, se observa una tendencia creciente en el periodo 2008-2012. La tasa de letalidad es elevada, alrededor del 18% siendo superior en niños y en ancianos (Pascual, 1989). En España se notificaron 107 casos humanos confirmados (tasa de 0,93 casos por 100.000 habitantes, muy superior a la media de la UE que fue de 0,41). Dentro de la UE, nuestra tasa sólo es superada por Finlandia, con 1,13 casos por 100.000 habitantes (EFSA, 2014).

Recién nacidos y adultos inmunodeprimidos son especialmente sensibles a esta infección, debido a que las condiciones que favorecen la incidencia de esta enfermedad son: el cáncer, los trasplantes de órganos, la terapia inmunosupresora y la infección VIH (Montville y Mattnews, 2008). En estos grupos causa septicemia, meningitis y meningoencefalitis. Otros de los grupos de riesgo que encontramos son las mujeres embarazadas siendo afectadas comúnmente durante el tercer trimestre de la gestación. La infección de la madre puede ser asintomática o parecerse a una enfermedad similar a la gripe con fiebre, mialgia o dolor de cabeza. Las consecuencias para el feto son muy graves ya que la madre puede abortar de forma esporádica, puede producir la muerte del feto, el nacimiento prematuro, septicemia neonatal grave y meningitis (Bula *et al.*, 1995). Las madres infectadas van a eliminar la bacteria por orina y secreción vaginal durante 4-5 días después del parto (Pascual, 1989). No se conoce bien la dosis con la que el hombre se puede infectar, aunque algunos investigadores pueden estimar que puede estar entre 10^3 y 10^5 microorganismos/gramo de alimento, en el caso de personas sensibles. Esta dosis sería más alta para aquellas personas sanas (Pascual, 1989).

5. GÉNERO SALMONELLA

5.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN

Salmonella fue observado por primera vez por los bacteriólogos alemanes Eberth y Koch en 1880 y, posteriormente fue cultivado por Gaffky. Salmon y Smith en 1885 aislaron *Bacillus cholerae-suis* en cerdos con peste porcina, enfermedad cuya etiología vírica se desconocía y asimismo fueron aisladas bacterias tanto en casos de infección transmitida por alimentos como en casos de enfermedad animal.

Estos microorganismos fueron aislados por primera vez por Achard y Bensaud (1896) y por Gwyn (1898). El género *Salmonella* fue nombrado definitivamente en 1900 por Lignières y se le denominó así en honor de D. E. Salmon, el patólogo veterinario americano que describió por primera vez *Salmonella cholerae-suis* (ICMSF, 1998).

Al principio del siglo XX se descubrieron las formas serológicas de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H) de este género. Más tarde se elaboró un esquema más detallado de la clasificación del género *Salmonella*, que actualmente incluye más de 2.500 serotipos (Montville y Mattnews, 2008), aunque según el esquema de Kauffmann-White pueden llegar a ser posibles 20.000 combinaciones (Adams y Moss, 1997). Los serotipos predominantes en Europa, son *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* (EFSA, 2014). Existen 3 especies de *Salmonella*: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*. La única especie de *Salmonella* con interés clínico es *S. enterica*.

(ISC, 2009), observando en la siguiente tabla las especies y subespecies de *Salmonella* con sus correspondientes números de serotipos.

Tabla 5. Género *Salmonella*:

Especies y subespecies de <i>Salmonella</i> (núm.)	Núm. de serotipos
<i>S. entérica</i> subsp. <i>entérica</i> (I)	1454
<i>S. entérica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489
<i>S. entérica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94
<i>S. entérica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324
<i>S. entérica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70
<i>S. entérica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12
<i>S. bongori</i> (V)	20

5.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* (Montville y Mattnews, 2008). Son bacilos pequeños, gram-negativos, no esporulados, habitualmente móviles mediante flagelos peritricos aunque hay algunas especies que son inmóviles (Pascual y Calderón, 2000). El tamaño oscila de 0,3µm x 1,0-1,6 µm. Son aero-anaerobios facultativos, quimiororganótrofos y poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo, produciendo ácido y, a menudo, gas. Son catalasa positivos y oxidasa negativos (Bourdegois *et al.*, 1994). Crecen en citrato como única fuente de carbono, decarboxilan la lisina y la ornitina y no hidrolizan la urea (Doyle *et al.*, 1997).

Salmonella es capaz de crecer a temperaturas por debajo de 5°C incluso hasta una temperatura de 47°C, con un crecimiento óptimo de 37°C (ICMSF, 1998). También se ha demostrado su crecimiento en almacenados entre 2 y 4°C (Doyle *et al.*, 1997). A una temperatura de 60°C o superior se destruyen entre los 5-15 minutos (Pascual, 1989), ya que son sensibles al calor. La pasteurización a 72°C durante 15 segundos va a asegurar la destrucción de la bacteria en la leche (Bourdegois *et al.*, 1994).

En cuanto al pH, puede crecer en valores entre 4,5 y 9,5, con un pH óptimo de 6,5-7,5 (Montville y Mattnews, 2008). Puede llegar a crecer a un pH de 4,05. La aw afecta bastante al crecimiento de esta bacteria (Adams y Moss, 1997). Van a tener un buen crecimiento con una aw entre 0,945 a 0,999. A valores muy bajos como 0,20 el producto está deshidratado y, por tanto, van a sobrevivir durante mucho tiempo (Bourdegois *et al.*, 1994), sobreviviendo perfectamente un año (Adams y Moss, 1997). Otro factor que influye en el crecimiento es la concentración de sal. *Salmonella* no tolera altas concentraciones de sal. Una salmuera superior al 9% llega a ser bactericida (Jay, *et al.*, 2005).

5.3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

Salmonella es un agente zoonótico ubicuo (Adams y Moss, 1997). Son huéspedes habituales del tracto gastrointestinal (ICMSF, 1998) en hombres y en animales (aves, reptiles, animales de granja) (Jay *et al.*, 2005). También, se puede encontrar en animales de compañía, tales como perros, gatos y roedores (Pascual, 1989). Se excretan a través de las heces, desde donde pueden ser transmitidos por insectos y otros seres vivos a un gran número de lugares. Como están en el intestino también se pueden encontrar en el agua contaminada.

Los alimentos que más suelen estar contaminados por *Salmonella* son las carnes y productos cárnicos, los ovoproductos y otros diversos como es la leche. (Bourdegois *et al.*, 1994). Aunque también hay alimentos, como es el caso de los moluscos y en concreto en almejas, que están contaminados con esta bacteria (Quiñones *et al.*, 2000).

En los últimos años, se le ha dado una importancia comercial a los moluscos porque en los países desarrollados se suelen alimentar a estos animales con despojos de carne cruda que pueden estar contaminados con salmonelas tifoideas o paratifoideas y ciertos piensos que puedan contener *Salmonella*. En el medio ambiente también pueden aparecer en los efluentes de

aguas residuales y en los lodos de aguas residuales, conteniendo en este último sitio una elevada población (Adams y Moss, 1997).

En 2012 se notificaron 91.034 casos confirmados de salmonelosis, un 4,7% menos que el año anterior. En el periodo 2008-2012 se ha observado una tendencia significativamente descendente, lo que se asume que se debe a los programas de control de *Salmonella* en aves aplicados en los países europeos. El alimento en el que se han observado más casos es la carne de pollo, aunque también se ha visto que hay alimentos que no cumplen con los requerimientos europeos respecto a *Salmonella*, como preparados a base de carne picada y moluscos bivalvos vivos. (ISC, 2007). España notificó 4.181 casos confirmados de *Salmonella* en 2012, procedentes del Sistema de Información Microbiológica (SIM) (tasa de 36,2 casos por 100.000 habitantes). Aunque nuestra tasa es superior a la media europea (22,2), ocupamos una posición intermedia entre los países de la UE, y la tendencia en los últimos años también es descendente. Según el SIM en España, en los últimos 5 años han disminuido los casos por Comunidad Autónoma el número de infecciones por *Salmonella*. La cifra más alta fue en 2003 con 8.671 casos. Hay que destacar que en determinadas Comunidades, el número de infecciones ha sido muy superior respecto al resto como son las Comunidades Autónomas de Cataluña, País Vasco y Navarra (ISC, 2009).

5.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS: SALMONELOSIS

La infección humana por *Salmonella* puede producir varias enfermedades, incluyendo enterocolitis no complicadas, infecciones sistémicas, etc.

Salmonella no tifoidea produce una enterocolitis que se manifiesta entre las 8-72 h una vez el paciente ha entrado en contacto con dicha bacteria. La enfermedad clínica suele ser autolimitante y se caracteriza por diarreas no sanguinolentas y dolor abdominal que aparece a los 5 días desde que comienza los síntomas. Aquí, el uso de antibióticos está contraindicado porque puede llegar a prolongar la enfermedad y la excreción de formas viables. Estas cepas también pueden degenerar en infecciones sistémicas y producir diversas enfermedades crónicas (D'Aoust, 1991), como la artritis reactiva aséptica y el síndrome de Reiter (Montville y Mattews, 2008).

6. GÉNERO ARCOBACTER

6.1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS Y CLASIFICACIÓN

Siempre ha resultado difícil encuadrar taxonómicamente al género *Arcobacter* debido a sus exigencias de crecimiento y la relativa inactividad en las pruebas bioquímicas convencionales. El género *Arcobacter* fue propuesto por Vandamme (1991) tras un estudio de hibridación ADN-ADN del gen 23S del ARNr para describir dos especies aerotolerantes de campilobacterias: *Campylobacter cryaerophila* (actualmente *Arcobacter cryaerophilus*) y *Campylobacter nitrofigilis* (actualmente *Arcobacter nitrofigilis*), que son capaces de crecer a 15°C.

En 1991 se aceptó la creación de una nueva familia, *Campylobacteraceae*, propuesta por Vandamme y De Ley (1991) para agrupar los géneros *Campylobacter* y *Arcobacter*. Este agrupamiento se hizo basándose en los caracteres fenotípicos y genotípicos que tenían en común y que a su vez los separaba de otros géneros. Más tarde se incluyeron también las especies *A. butzleri* y *A. skirrowii* (Vandamme *et al.*, 1992). Posteriormente, *A. cibarius* aislado de carcasas de pollo (Houf *et al.*, 2005) y *A. halophilus* aislado de agua procedentes de un lago hipersalino del noroeste de las islas de Hawai (Donachie *et al.*, 2005).

A continuación, se describe la taxonomía actual del género *Arcobacter*, que junto con *Campylobacter* y *Sulfurospirillum* se agrupan formando la familia *Campylobacteraceae*, (Vandamme y De Ley, 1991) con sus 17 especies (Calvo *et al.*, 2013). Como se muestra en la tabla 6, actualmente se incluyen 17 especies, 9 de las cuales fueron aisladas de muestras ambientales: *A. nitrofigilis*, de las raíces de *Spartina alternimicrobiota*; *A. halophilus* de lagos supersalinos; *A. mytili* (Collado *et al.*, 2009), *A. molluscorum* (Figueras *et al.*, 2011), *A. ellisii*

(Figueras *et al.*, 2011), *A. bivalviorum* (Levican *et al.*, 2012) y *A. venerupis* (Levican *et al.*, 2012), de moluscos; *A. marinus* aislado de agua del mar (Kim *et al.*, 2010) y de estrellas de mar; y *A. defluvii*, de aguas residuales (Collado *et al.*, 2010). Las otras seis especies se han descrito desde fuentes humanas o animales: *A. butzleri* de heces humanas (Kielbauch *et al.*, 1991), *A. cryaerophilus* (Lehner *et al.*, 1994), *A. skirrowi* (Vandamme *et al.*, 1992) y *A. trophiarum* (De Smet *et al.*, 2011) de heces de animales; *A. cibarius* (Houf *et al.*, 2005) de la carne de pollo y *A. thereius* (Houf *et al.*, 2009) del aborto porcino. En noviembre, se encontraron dos nuevas especies: *A. cloacae* y *A. suis* (Levican *et al.*, 2012) aisladas de alimentos y de aguas residuales (Collado y Figueras, 2012).

Tabla 6. Género *Arcobacter*

Dominio	Bacteria
Phylum BXII	Proteobacteria
Clase V	Epsilonproteobacteria
Orden I	Campylobacterales
Familia I	<i>Campylobacteraceae</i>
Género II	<i>Arcobacter</i>
Especies	<i>A. butzleri</i>
	<i>A. cibarius</i>
	<i>A. cryaerophilus</i>
	<i>A. halophilus</i>
	<i>A. marinus</i>
	<i>A. mytili</i>
	<i>A. nitrofigilis</i>
	<i>A. skirrowi</i>
	<i>A. thereius</i>
	<i>A. defluvii</i>
	<i>A. molluscorum</i>
	<i>A. trophiarum</i>
	<i>A. venerupis</i>
	<i>A. ellisii</i>
<i>A. bivalviorum</i>	
<i>A. cloacae</i>	
<i>A. suis</i>	

6.2. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El género *Arcobacter* está formado por bacilos Gram-negativos no formadores de esporas, cuya morfología suele ser curvada o en forma de S. Los microorganismos de este género suelen tener una longitud de 1 a 3 µm y una anchura de 0,2 a 0,9 µm, aunque en aguas ha podido encontrar microorganismos que tienen un mayor tamaño (Taylor *et al.*, 1999). Las colonias suelen ser pequeñas, translúcidas, de color beige o blanco y, cuando se dejan incubar durante tres días, pueden llegar a tener un diámetro de 2 a 4 mm (Collins *et al.*, 1996). Gracias a su único flagelo polar no envainado que contiene en ambos extremos de la célula, son móviles, desplazándose en forma de sacacorchos (Ho *et al.*, 2006).

Las especies de *Arcobacter* son poco activas metabólicamente (Vandamme *et al.*, 1992) siendo quimioorganotróficos (Collado *et al.*, 2009). No fermentan ni oxidan los carbohidratos, tienen actividad catalasa y oxidasa. Reducen los nitratos y los nitritos (Taylor *et al.*, 1999) a excepción *A. mytili* (Collado *et al.*, 2009) y *A. trophiarum* (De Smet *et al.*, 2011). Producen indol y sulfuro de hidrógeno, incluso pueden excretar azufre al medio (Taylor *et al.*, 1999). La mayoría de cepas no son hemolíticas, aunque *A. skirrowii* puede ser α-hemolítico. Son sensibles al ácido nalidíxico (Lehner *et al.*, 1994). Estos microorganismos pueden crecer en un extenso rango de temperaturas, comprendido entre 15 y 42°C. Aunque son microaerófilos, crecen en aerobiosis a

30°C. El crecimiento óptimo ocurre bajo condiciones de microaerofilia (3-10% O₂) y no requiere hidrógeno para su crecimiento (Calvo *et al.*, 2013).

6.3. EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

Actualmente no se conoce con exactitud cómo el hombre es infectado por *Arcobacter*. Posiblemente puede ser debido al consumo o el contacto con agua contaminada y los alimentos (Lastovica y Skirrow, 2000). Las especies pertenecientes al género *Arcobacter* han sido recuperadas de varios tipos de aguas: ríos, lagos, aguas subterráneas y agua de mar (Collado *et al.*, 2008). De hecho, algunos brotes aparecidos en agua potable, han dado como resultado el aislamiento de bacterias del género *Arcobacter* tanto en los pacientes como en el agua contaminada (Kopilovic *et al.*, 2008). Sin embargo, existen algunos estudios que sugieren que podría ser transmitido a través de los alimentos.

Los alimentos de origen animal también han sido sugeridos como una posible vía de transmisión de *Arcobacter* (Ho *et al.*, 2006). Esta idea está basada en su elevada prevalencia tanto en el tracto intestinal como en heces de animales de granja sanos y en muchos de los productos de carne destinados a venta al público (Van Driessche *et al.*, 2003). Se ha establecido la hipótesis de que la contaminación por *Arcobacter* en los productos cárnicos se produce cuando las heces de los animales infectados entran en contacto con las canales durante el proceso de sacrificio (Van Driessche and Houf, 2007). La mayoría de estudios sobre la prevalencia de *Arcobacter* en los alimentos, han sido realizados en productos derivados de las aves de corral (con la prevalencia más alta) seguida por carne de cerdo, carne de vacuno (Collado *et al.*, 2009 a), y la leche cruda (Scullion *et al.*, 2006). Aunque todavía no existen muchos estudios, los moluscos son otra fuente potencial de infección (Fernández *et al.*, 2001). Collado *et al.* investigaron en 2009 un total de 84 muestras (camarones, mejillones, almejas y ostras) y demostraron que las almejas y los mejillones pueden contener una gran cantidad y una gran diversidad de especies de *Arcobacter*. Esto podría tener una gran repercusión en salud pública puesto que, los moluscos tradicionalmente se consumen crudos o poco cocinados. Los estudios sobre alimentos han demostrado que, en general, *A. butzleri* es la especie predominante, seguida por *A. cryaerophilus* y *A. skirrowii* (Lehner *et al.*, 2005).

6.4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Este género no era considerado un verdadero patógeno hasta hace relativamente poco, sin embargo, en la actualidad, a excepción de *A. nitrofigilis*, se consideran patógenos para el hombre y los animales, destacando entre ellos *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* y menor grado *A. skirrowii* (Collado *et al.*, 2010).

En relación a las infecciones causadas en animales, las distintas especies de *Arcobacter* han sido aisladas del tracto intestinal y en muestras de heces de diferentes animales de granja, pero al parecer sólo tiene la capacidad de causar enfermedad en algunos de ellos. Estas bacterias están frecuentemente asociadas a enfermedades gantrointestinales, como úlceras gástricas en cerdo y/o reproductivas como abortos en ganado equino, bovino y porcino (Donochie *et al.*, 2005). Se les conoce también como responsables de producir mastitis, bacteriemia, infertilidad y problemas crónicos de muerte de fetos no natos (González *et al.*, 2005). En cuanto a los humanos, los problemas con los que se asocia a *Arcobacter* son: diarreas, dolor abdominal, septicemias, fiebre, nauseas e incluso bacteriemias (Yan *et al.*, 2000). Los niños, sobre todo con alguna enfermedad previa, son los más afectados por *Arcobacter* (Lastovica y Skirrow, 2000). Existe algún caso de contaminación por *Arcobacter* de neonatos por vía transplacentaria (On *et al.*, 1995).

Aunque la mayor parte de las especies del género *Arcobacter* no son consideradas como causantes de graves problemas de salud, el notable incremento de casos en los últimos años sugiere que su importancia puede haber sido subestimada, principalmente por la utilización de métodos de detección e identificación inapropiados (Figueras *et al.*, 2008). Uno de los principales problemas es que las condiciones óptimas de recuperación de *Arcobacter* a partir de

muestras clínicas aún no han sido determinadas, por lo que en ocasiones es confundido con el género *Campylobacter* (Abdelbaqi *et al.*, 2007).

Se han descubierto recientemente los mecanismos por los cuales *A. butzleri* induce enteritis, y se ha visto que se debe a una disfunción de la barrera epitelial así como la inducción de la apoptosis epitelial, lo que resulta en un mecanismo de flujo de fuga y diarrea (Bucker *et al.*, 2009). Además también se ha comprobado que inducción de la expresión de la citoquina proinflamatoria interleuquina-8, que se considera un factor de virulencia de *Helicobacter pylori* y de las distintas especies de *Campylobacter*, también lo es para *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* y *A. cibarius* (Ho *et al.*, 2007).

7. IMPORTANCIA A LA RESISTENCIA DE ANTIBIÓTICOS EN MICROBIOTA DE MOLUSCOS

Desde los años 50, ha ido aumentando el número de microorganismos productores de enfermedad en el hombre que son resistentes a uno o varios antibióticos (Balsalobre y Hernández, 2004). Se ha comprobado que hay una relación entre el consumo de antibióticos por animales y el desarrollo de resistencias en microorganismos ligados a infecciones en humanos (Puig *et al.*, 2007). El excesivo uso de determinados antibióticos, un tratamiento incorrecto o una automedicación incorrecta son posibles causas de la pérdida de eficacia o, incluso, la resistencia a esos antibióticos (Gimferrer, 2008).

En los últimos años, a los moluscos se les ha empezado a dar importancia, puesto que en los países desarrollados suelen ser alimentados con despojos de carne cruda que pueden estar contaminados con *Salmonella* spp. y con ciertos piensos que también puedan contenerla. Para evitar esta contaminación, los pescadores suelen utilizar antibióticos, lo que es perjudicial para la salud y puede llegar a ser un problema de Salud Pública (Montville y Mattnews, 2008). Dos ejemplos destacados sobre la importancia a la resistencia de antibióticos en la microbiota de moluscos son, los criaderos de marisco como un reservorio de bacterias resistentes a los antimicrobianos (Miranda *et al.*, 2013) y el aislamiento de genes de resistencia a antibióticos y virulencia en *E. coli* procedente de marisco (Van *et al.*, 2008). El uso de antibióticos en agricultura y acuicultura crea residuos de antibióticos en la carne de los animales produciendo que las diferentes bacterias resistentes de los animales de consumo humano, acaben exponiéndose estos fármacos en los consumidores. Además, si se aplica antibióticos a los cultivos o se riegan con aguas residuales, en los alimentos de origen animal pueden aparecer bacterias resistentes (Cabrera *et al.*, 2007).

Según el informe de la OMS (2014) sobre la vigilancia de la resistencia antimicrobiana, *E. coli* forma parte de la microbiota normal del intestino en seres humanos y animales por lo que es importante tener en cuenta su resistencia a los antibióticos, ya que es la causa más frecuente de infecciones urinarias y la causa más frecuente de sepsis a todas las edades. Además, es una causa de meningitis en recién nacidos y es uno de los principales agentes causantes de infecciones de transmisión alimentaria en todo el mundo.

En cuanto a la distribución del consumo de antibióticos en España en el año 2011 en el sector primario, se observa que el grupo de betalactámicos antibacterianos, lo consume un 62,7% de la población, seguido de un 12,3% de quinolonas y un 9,9% del grupo de los macrólidos (ECDC, 2011). En la siguiente tabla se clasifican los principales antibióticos utilizados en clínica en función del grupo al cual pertenecen:

Tabla 7. Principales antibióticos y su clasificación (Maguiña-Vargas *et al.*, 2006)

Grupo	Antibióticos
Aminoglucósidos	Amikacina, Gentamicina, Kanamicina
Anfenicoles	Cloranfenicol, Tetraciclina

Betalactámicos	Amoxicilina/ác. clavulánico, Ampicilina, Cefalotina Ceftriaxona
Macrólidos	Eritromicina
Quinolonas	Ciprofloxacino, Ác. Nalidíxico

En el 2012 en España encontramos que el porcentaje de *E. coli* resistentes a Aminoglucósidos fue en torno al 10-25%, mientras que en otros países como Francia, Inglaterra y Alemania estaba entorno al 5-10%, (ECDC, 2012).

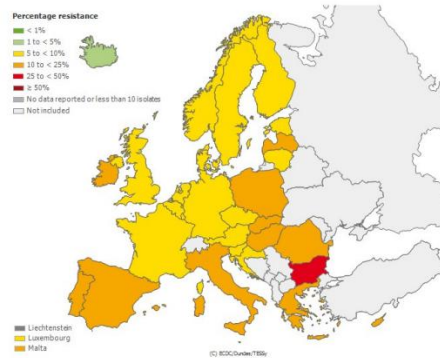


Figura 1. Proporción de Aminoglucósidos resistentes a *E. coli* en la UE en 2012

La resistencia de *E. coli* se desarrolla fácilmente, ya sea a través de mutaciones, lo cual es a menudo el caso de la resistencia a la fluoroquinolona, o por transferencia de elementos genéticos móviles, como es el caso para el amplio grupo de penicilinas (por ejemplo, ampicilina o amoxicilina) y la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación (Lázaro y Oteo, 2006) Las quinolonas son probablemente uno de los grupos de fármacos antibacterianos más ampliamente utilizados para el tratamiento de infecciones del tracto urinario, de los cuales *E. coli* es la más causa común. La resistencia a las quinolonas puede ser indicativa de resistencia a uno de los últimos tratamientos antibióticos disponibles por vía oral. (González *et al.*, 2007).

Los pacientes con infecciones causadas por cepas de *E. coli* resistentes suelen tener unos resultados clínicos pobres. La resistencia a la tercera generación de cefalosporinas significa que el tratamiento para infecciones graves de *E. coli* resistentes necesita una terapia con un tiempo más largo del debido en estas poblaciones. El tener un mayor tiempo de tratamiento conlleva el tener un mayor gasto, entre otras cosas (OMS, 2014). En el 2012 en España, encontramos que el porcentaje de *E. coli* resistente a fluoroquinolonas era entre el 25-50%, mientras que en otros países como Francia, Inglaterra y Alemania estaba entorno al 10-25% (ECDC, 2012).

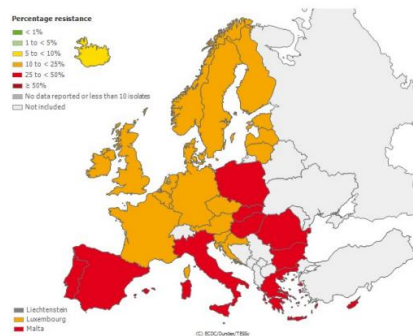


Figura 2. Proporción de fluoroquinolonas resistentes a *E. coli* en la UE en 2012

Hay tres estrategias de intervención que deben ser priorizadas para que el tratamiento sea eficaz. Estas estrategias son: el uso prudente de antibióticos, precauciones de higiene para la

contaminación cruzada entre alimentos y personas e investigación y desarrollo de los antibióticos con un nuevo mecanismo de acción (ECDC, 2005-2014).

8. MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS

Para el análisis de microorganismos patógenos en alimentos los métodos y técnicas tradicionales se requiere un proceso largo para obtener resultados (Jay *et al.*, 2005). La aplicación de técnicas moleculares para la detección de forma rápida e inequívoca de patógenos transmitidos por alimentos está ofreciendo una alternativa válida a los métodos tradicionales. (Rantsiou *et al.*, 2010), destacando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Engberg *et al.*, 2000).

8.1. PCR

La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa fue desarrollada a mediados de los años 80 por Kary Mullis. Esta técnica se puede considerar como una de las más utilizadas para la detección de patógenos (Jiménez, 1998).

La técnica de amplificación de ADN mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica que consiste en la amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN específico y se basa en la capacidad de la ADN polimerasa, ADN dependiente y termoestable, para copiar una doble cadena de ADN utilizando un molde de ADN y unos iniciadores, es decir, una pareja de oligonucleótidos. Gracias a una reproducción un número determinado de ciclos alternando diferentes temperaturas para desnaturalización de las proteínas, la unión a los iniciadores y la extensión de la cadena de ADN que queremos conseguir, permite la ampliación enzimática millones de veces del molde de ADN (Saiki *et al.*, 1988).

Para llevar a cabo la PCR es necesario disponer del ADN de la especie objeto de estudio. También se debe disponer de oligonucleótidos que actúen como cebadores para la ADN polimerasa, además de los 4 tipos de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) que componen el ADN. Por último también es necesario la Taq-polimerasa que ha de ser una polimerasa especial capaz de resistir las elevadas temperaturas a la que vamos a someter. Después, se debe favorecer la síntesis de ADN. Para ello, lo primero que se hace es facilitar la desnaturalización del ADN, elevando la temperatura durante un determinado tiempo. A continuación, permitir el alineamiento de los cebadores, porque el apareamiento debe realizarse con su región complementaria y, por último, facilitar que la polimerasa lleve a cabo la síntesis de ADN utilizando como cebadores los extremos 3' de los primers utilizados. Todo esto constituye un ciclo. Los tubos de reacción se introducen en un termociclador.

Para desarrollar una detección por PCR, se necesita conocer la secuencia del ADN diana, para utilizar los iniciadores adecuados. Teóricamente el rendimiento que puede obtenerse en n ciclos de amplificación es de 2^n veces el número de secuencias diana inicialmente presentes. La PCR es muy sensible por lo que es muy frecuente que aparezcan falsos positivos debido a la posible contaminación, aunque sea mínima, de ácidos nucleicos, que estén presentes en las manos o en los guantes que estén contaminados anteriormente.

En cuanto a los inconvenientes de la PCR son la necesidad de algún conocimiento previo de las secuencias que flanquean dicho segmento (que actúan de iniciadores de la reacción) y las meticulosas precauciones en las condiciones de la reacción para evitar las amplificaciones no deseadas de posibles contaminantes. Por el contrario, las ventajas de la PCR son bastantes ya que es una técnica sencilla, rápida, sensible y versátil ya que en pocos pasos se puede amplificar una región de ADN, obteniendo resultados rápidos y fiables. Además, requiere poca cantidad de material de partida y genera material suficiente para análisis posteriores (Jiménez, 1998). La capacidad de amplificar cantidades muy pequeñas de ADN es de especial utilidad para la detección de bacterias presentes en bajo número en diferentes muestras de alimentos (Waage *et al.*, 1999a), agua (Waage *et al.*, 1999) y clínicas (Stone *et al.*, 1994).

9. OBJETIVOS

La inocuidad de los alimentos es un requisito básico de la calidad de los mismos. La "inocuidad de los alimentos" entraña la ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas que se dan en la naturaleza y cualquier otra sustancia que pueda hacer nocivo el alimento para la salud con carácter agudo o crónico, o unos niveles inocuos y aceptables de los mismos (FAO, 1999). Por lo tanto, la inocuidad de alimentos es una cuestión importante de la Salud Pública.

En un contexto mundial, los principales peligros asociados al consumo de moluscos se derivan de la contaminación microbiológica de las aguas donde se crían, sobre todo cuando los moluscos bivalvos se destinan al consumo en crudo. Dado que son filtradores, los moluscos concentran contaminantes a un nivel muy superior al de su entorno acuático. La contaminación de bacterias y virus en las zonas de cría determina, por tanto, el tratamiento al que deben someterse. Muchos de estos patógenos, pueden provocar gastroenteritis, hepatitis y toxiinfecciones bacterianas, de aquí la importancia de controlar la inocuidad del alimento (Lee *et al.*, 2010)

El objetivo de este trabajo es determinar la calidad higiénico-sanitaria y su relación con la presencia de microorganismos patógenos en moluscos bivalvos vivos presentes en el mercado, cumpliendo una serie de objetivos.

- Realizar un recuento de aerobios mesófilos para valorar el estado sanitario de los moluscos bivalvos vivos
- Detectar la presencia de patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* basándonos en la normativa vigente para moluscos bivalvos vivos
- Estudiar la posible presencia de *Arcobacter* spp., patógeno emergente, en este tipo de muestras
- Detectar *E. coli* en estos productos y realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana de los aislados obtenidos frente a distintos antibióticos
- Comparar los métodos tradicionales de detección y aislamiento por cultivo con métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1. TOMA DE MUESTRAS

Durante un periodo de tiempo de 4 semanas se realizó el muestreo en miércoles para que no hubiera variabilidad en los análisis y asegurarnos de la frescura del producto. Se han adquirido muestras de moluscos en distintos puntos de la ciudad de Valencia: pescadería A, pescadería B y una cooperativa C.

Tabla 8. Alimento, fecha y procedencia de las diferentes muestras

MUESTRA	ALIMENTO	FECHA	LUGAR
1	Almejas	12/02/2014	Cooperativa C
2	Mejillones	12/02/2014	Cooperativa C
3	Mejillones	12/02/2014	Pescadería B
4	Mejillones	19/02/2014	Pescadería A
5	Almejas	19/02/2014	Pescadería A
6	Berberechos	26/02/2014	Pescadería A
7	Mejillones	05/03/2014	Pescadería A

Una vez adquiridas las muestras, se llevan al laboratorio en refrigeración y se mantiene a 4°C hasta la realización del análisis en el laboratorio.

10.2. ANÁLISIS DE LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA EN BIVALVOS

10.2.1. AEROBIOS MESÓFILOS

Para la detección e identificación de microorganismos aerobios mesófilos, se ha seguido la norma ISO 4833-1:2013. Se pesaron 25 g de muestra y se introdujeron en una bolsa de stomacher a la que se añadió 225 mL de caldo de agua de peptona tamponada (APT; Agua de peptona (tamponada) según ISO 6579; Merck; ref: 1.07228.0500). Posteriormente se transfirió 1mL del homogeneizado a un tubo de 9 mL de agua estéril, realizándose diluciones decimales seriadas. Las diluciones elegidas se sembraron en profundidad en medio Plate Count Agar (Scharlau; ref: 01-161-0500) en condiciones de asepsia. Posteriormente se llevaron a incubar durante 72 ± 3 h a 30 ± 1 °C. Después del tiempo destinado a la incubación se realizó el recuento de los microorganismos crecidos, considerando las placas cuyo número de colonias sea como máximo 300 colonias en dos diluciones consecutivas y como mínimo 15 colonias en una de las placas.

Para expresar los resultados, se contaron las placas de dos diluciones y se calcularon los resultados con la siguiente ecuación:

$$\frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

Donde:

$\sum C$: es la suma de las colonias de todas las placas

n_1 : número de placas que se cuentan en la primera dilución

n_2 : número de placas que se cuentan en la segunda dilución

En el esquema del anejo 14.1.1, se puede observar el proceso realizado.

10.2.2. DETECCIÓN DE *E. COLI*

10.2.2.1. RECUENTO DE ENTEROBACTERIAS LACTOSA POSITIVO (COLIFORMES) POR EL MÉTODO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

Para el análisis de *Escherichia coli* se siguió el procedimiento propuesto por Pascual y Calderón (2000).

Se pesaron 25 g de la muestra, se mezclaron con 225 mL de APT en una bolsa de stomacher y se homogeneizaron durante 1 minuto. Después, se pasaron a 3 tubos que contenían verde brillante (Difco; ref: 274000) con campana Durham. Se realizaron 2 diluciones decimales seriadas y se llevaron a incubar a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h. Tras la incubación, se consideraron positivos aquellos tubos que contenían gas. Aquellos que contenían menos de 1/3 gas en la campana Durham, se descartaron. Se realizó el recuento mediante la técnica del Número Más Probable.

10.2.2.2. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *E. COLI*

Aquellos tubos que contenían gas (por lo menos 2/3 de la campana Durham) se sembraron en agar TBX (Tryptone Bile X-glucuronide; Merck; ref: 1.16122.0500) y se incubaron a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h. Las colonias sospechosas, se subcultivaron en TBX en las mismas condiciones que en la anterior y para confirmar se realizó un conjunto de pruebas bioquímicas denominadas IMViC.

El IMViC consta de cuatro pruebas: **Indol:** (Tryptone Peptone; Difco; ref: 0123-17). **Rojo de metilo:** (Base for the Performance of the Methyl Red and Voges-Proskauer Tests; Difco; ref: 2163000) **Voges-Proskauer:** (Base for the Performance of the Methyl Red and Voges-Proskauer Tests; Difco; ref: 2163000) y **Citrato:** (Simmons- Citrat-Agar; Merck; ref: 1.02501.0500)

Se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 2 h y, además, se introdujo un tubo de indol a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ y un tubo de verde brillante para comprobar el crecimiento de *E. coli*.

El perfil del IMViC positivo para *E. coli* es que la prueba del Indol sea positiva, la prueba de Rojo de Metilo sea positiva, la prueba de Voges-Proskauer sea negativa y la prueba del citrato sea también negativa.

Después, en un crioval se introdujo el aislado y se congeló a -80°C hasta su uso para el estudio de sensibilidad de los antimicrobianos.

En el esquema del anejo 14.1.2, se puede observar el proceso realizado.

10.2.3. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS MEDIANTE EL MÉTODO DE ANTIBIOGRAMA DISCO-PLACA

Para el estudio de sensibilidad de *E. coli*, se empleó la técnica del antibiograma disco-placa, basado en la norma CLSI, por ser el método más utilizado y aceptado para el estudio de la sensibilidad a antimicrobianos. La concentración de los antibióticos utilizados (Oxoid) se muestra en la siguiente tabla junto con los halos de inhibición de la según la norma CLSI que los clasifica en Resistentes, Intermedios y Sensibles.

Tabla 9. Antibióticos y diámetro de halo de inhibición (mm)

ANTIMICROBIANO	CARGA DEL DISCO(µg)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)		
		RESISTENTE	INTERMEDIA	SENSIBLE
Gentamicina (CN)	10	≤12	13-14	≥15
Amikacina (AK)	30	≤14	15-16	≥17
Amoxicilina /ác. Clavulánico (AMC)	20	≤13	14-17	≥18
Erytromicina (E)	15	≤13	14-22	≥23
Ampicilina (AMP)	10	≤13	14-16	>17
Cloranfenicol (C)	30	≤12	13-17	≥18
Cefalotina (KF)	30	≤14	15-17	≥18
Ciprofloxacino (CIP)	5	≤15	16-20	≥21
Ceftriaxona (CRO)	30	≤13	14-20	≥21
Tetraciclina (TE)	30	≤14	15-18	≥19
Ác. Nalidíxico (NAL)	30	≤13	14-18	≥19
Kanamicina (K)	30	≤13	14-17	≥18

El estudio de sensibilidad se fundamenta en depositar los discos de papel secante humedecidos con los antibióticos seleccionados en la superficie de agar de una placa que ha sido previamente inoculada con el microorganismo. Una vez hayamos colocado el disco en la superficie del agar, el filtro va a absorber agua y el antibiótico se difunde de forma radial a través del espesor del agar formando un gradiente de concentración.

Se debe utilizar cepas de referencia debido al gran número de variedades y que pueden afectar a los resultados. El CLSI ha establecido unos límites en los diámetros de las zonas de inhibición que son aceptables como control de calidad para la cepa ATCC 25922.

A partir de un cultivo de 18 a 24 horas en PCA, se seleccionaron dos colonias con un asa y se ajustó el inóculo a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland 0,5 en suero fisiológico. Se introdujo una torunda en la suspensión y se sembró una placa con el medio Mueller Hinton II Agar (Difco; ref: 211438). Luego se colocaron los discos de los antibióticos. Las placas se dejaron secar unos minutos antes de invertirlas y, posteriormente se incubaron a 35°C en aerobiosis. Se incubó durante 16-18h.

Posteriormente se procedió a leer el diámetro de las zonas de completa inhibición con un pie de rey o una regla. Una vez medido el diámetro del halo, nuestro aislado de *E. coli* será resistente (R), intermedio (I) o sensible (S) a los antibióticos descritos anteriormente.

10.2.4. RECuento DE LISTERIA monocytogenes

Se ha seguido el método horizontal para el recuento de *Listeria monocytogenes* basado en la norma ISO 11290-2. Las muestras se sometieron a una etapa de pre-enriquecimiento, pesando 25 g de muestra que se introdujeron en una bolsa de stomacher a la que se le añadió 225 mL de APT (Peptonwaser (gepvffert); nach ISO 6579; Merck; ref: 1.07228.0500) y, posteriormente, se homogenizó. A continuación, se realizaron diluciones decimales seriadas a partir del homogenizado. Las diluciones se sembraron en superficie dos placas de Agar PALCAM base (Scharlau; ref: 01-470; suplemento ref: 06-110case), añadiendo 0,1 mL y posteriormente se incubaron a 37 ± 1°C durante 24 ± 2 h (+ 18 h – 24 h si fuera necesario).

Después del periodo de incubación se realizó un recuento en placa y se seleccionaron aquellas placas con menos de 150 colonias características. Para aquellas colonias sospechosas, se realizó el recuento también en el medio Chromogenic Listeria Agar (ISO) base (ALOA; Oxoid; ref: CM 1084). Se incubó a 37 ± 1°C durante 24 ± 2 h (+ 18 h – 24 h si fuera necesario). Las colonias sospechosas fueron de color azul verdoso.

Para la confirmación de las colonias sospechosas se realizó la Tinción Gram y la prueba de la investigación de la hemólisis y, posteriormente, la tira API Listeria (Biomerux; ref: 10 300).

En el esquema del anejo 14.1.3, se puede observar el proceso realizado.

10.2.5. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA

10.2.5.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA MEDIANTE LA NORMA ISO 6579

Se ha seguido el método horizontal para la detección de *Salmonella* spp de la Norma ISO 6579:2002. Se tomaron 25 g de muestra y se introdujeron en una bolsa de stomacher con 225 mL de caldo agua de peptona tamponada (APT) (Difco; ref: 0123-17). Se homogenizó en stomacher y se incubó durante 18-24±2 h a 37 ± 1 °C. Se cogieron alícuotas del homogenizado para la posterior detección por métodos moleculares.

Una vez transcurrido este tiempo, se añadió 0,1mL de la bolsa de stomacher en un tubo con 10 mL de Rappaport Vassiliadis R10 broth (RVS) (Difco; ref: 218581) que se incubó a 42 ± 1°C durante 24 ± 2 h; y 1 mL de la bolsa de stomacher en un tubo con 10 mL de Tetrarionate Broth base (MKTTn) (Scharlau; ref: 02-033; suplemento solución yodo-yodurada con ref: 06-017case), incubándose durante 24 ± 2 h a 37 ± 1°C. Se cogieron alícuotas del caldo de RVS para la posterior detección por métodos moleculares.

Tras la incubación, los tubos de RVS y MKTTn, se sembraron en placa en el medio el medio Agar xilosa-lisina-desoxicolato (XLD) (Scharlau; ref: 01-211) y Hektoen-Enter-Agar (HK) (Merck; ref: 1.11681.0500). Se incubaron a 37± 1°C durante 24±2 h.

En el caso de que hubiera una colonia característica de *Salmonella*, se sembró en un agar nutritivo, en este caso, utilizamos Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Merck; ref: 1.03915.0500) y se incubó a 37± 1°C durante 24±2 h. Una vez pasado el tiempo, se observaron los tubos y si, el resultado era característico de *Salmonella* (medio rojo y ennegrecimiento del tubo), se procedió a la confirmación bioquímica o serológica mediante una tira API 20E (Biomerux; ref: 20 100). Finalmente, se expresaron los resultados.

A continuación, se muestra el esquema en el anejo 14.1.4, el procedimiento seguido.

10.2.5.2. MÉTODO MOLECULAR DE DETECCIÓN: PCR PARA SALMONELLA

Para detectar *Salmonella* por PCR se ha seguido el protocolo descrito por Aabo et al (1993). Se han utilizado los n iniciadores: ST11: 5'-GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA-3' ST15: 5'-GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G-3', los cuales amplifican un fragmento de 429 pares de bases de ADN cromosómico.

Tabla 10. Condiciones utilizadas en la PCR de *Salmonella*

Reactivos	Concentración final
Tampón	1x
dNTPs	0,5mM/cada
MgCl ₂	1,5mM
Iniciadores	0,4µM/cada
Taq polimerasa	0,75U
ADN	5 µL

La PCR se llevó a cabo en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Teral Cycler (MT Research)

Tabla 11. Proceso de amplificación en la PCR de *Salmonella*

Nº ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo	Reacción
1	95	10 min	Desnaturalización
35	95	30 s	Desnaturalización
	60	30 s	Unión de iniciadores
	72	30 s	Extensión

1	72	10 min	Extensión
---	----	--------	-----------

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Agarosa, Roche) en tampón TAE al que se añadió Red Safe al 5%. Los geles se desarrollaron en una cubeta de electroforesis a 95V durante una hora para poder visualizar la reacción mediante un transiluminador modelo Vilber Lournat (Ref: 09 200272) con luz UV.

El tamaño molecular de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (MBI, Fermentas, Burlington). Se usó como control positivo el DNA de la cepa *Salmonella* CECT 715, y una muestra en la que el DNA se reemplazaba por agua libre de nucleasas se incluyó como control negativo en todos los ensayos.

10.2.6. DETECCIÓN ARCOBACTER

10.2.6.1. CULTIVO EN PLACA DE ARCOBACTER

Debido a la inexistencia de una norma ISO para la detección y aislamiento de *Arcobacter* en muestras de alimentos, se desarrolló un protocolo basándose en el descrito por Collado y Figueras (2011). Se tomaron 10 g de muestra en una bolsa estéril de stomacher, se añadieron 90 mL de caldo de *Arcobacter* Broth (Oxoid; ref: CM 0965) y se homogenizó en un homogeneizador stomacher. Del caldo homogenizado, se tomaron alícuotas para el análisis directo por PCR. Posteriormente, se tomó una alícuota de 20 mL del caldo homogeneizado y se añadió a 20 mL de AB-2 [CAT] (*Arcobacter* Broth con doble concentración de antibiótico CAT) (Cefoperazona, anfotericina-B y teicoplanina) y se incubó a 37 ± 1 °C en microaerofilia, durante 48 ± 2 h. Después de la fase de enriquecimiento, se tomaron alícuotas para el análisis directo de la presencia del género *Arcobacter* por medio de la técnica PCR.

Del enriquecimiento, se tomaron 0,1 mL que fueron depositados sobre un filtro de membrana estéril de $0,45 \mu\text{m}$ colocado previamente en condiciones estériles sobre una placa de medio de cultivo ASO (5% de sangre de oveja; Sheep Blood Defibrina Ted; Thermo scientific; ref: SR 0051C) 0'1 mL. El filtro se incubó durante 1 h en condiciones de aerobiosis y, después, el filtro fue retirado. Las placas se incubaron a 37 ± 1 °C en microaerofilia durante 48 ± 2 h.

Tras la incubación de las placas, se seleccionaron de 4 a 8 colonias por placa con morfología típica de *Arcobacter* spp. Posteriormente, se sembraron para obtener un cultivo masivo a partir de cada una de ellas, y tras un periodo de incubación en microaerofilia durante 48 ± 2 h a 37 ± 1 °C, se realizó una tinción Gram, y todas las colonias sospechosas de pertenecer al género *Arcobacter* fueron conservadas en crioviales a -80 °C.

De las alícuotas tomadas durante el proceso, y de los aislados obtenidos por cultivo, se realizó una extracción de DNA usando un kit comercial GenElute Bacterial Genomic DNA kit (Sigma), para detectar *Arcobacter* spp. mediante análisis por PCR.

En el esquema del anejo 14.1.5, se puede observar el proceso realizado.

10.2.6.2. MÉTODO MOLECULAR DE DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN: PCR DE ARCOBACTER

Para la detección de *Arcobacter* por PCR se utilizaron los iniciadores ARCO 1 y ARCO 2. Estos iniciadores amplificarán un fragmento 331 pb del gen 23S ARNr (Bastyns *et al.*, 1995). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen final de 50 μL de mezcla, conteniendo 5 μL de ADN de la muestra y del aislado. Se usó como control positivo el DNA de la cepa *A. butzleri* DSM 8739, y una muestra en la que el DNA se reemplazó por agua libre de nucleasas como control negativo.

Tabla 12. Condiciones utilizadas en la PCR de *Arcobacter*

Reactivos	Concentración final
Tampón	1x
dNTPs	100 μM /cada
MgCl ₂	2mM

Iniciadores	0.5 μM/cada
Taq polimerasa	2.5U

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador modelo Eppendorf AG, siguiendo los ciclos y los tiempos y temperaturas que se describen a continuación:

Tabla 13. Proceso de amplificación en la PCR de *Arcobacter*

Nº de ciclos	Temperaturas (°C)	Tiempo	Fases
1	94	5 min	Desnaturalización
27	94	1 min	Desnaturalización
	61	1 min	Unión de iniciadores
	72	1 min	Extensión
1	72	5 min	Extensión

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (Agarosa, Roche; ref: 0357 3788001) en tampón TAE al con Red Safe al 5%.

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1. MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS

Para valorar el estado sanitario de las muestras de moluscos bivalvos, se realizó un recuento de microorganismos aerobios mesófilos mediante el método horizontal para el recuento de microorganismos (UNE-EN ISO 4833-1:2013). Los valores obtenidos se muestran en la siguiente tabla 14, destacando en la mayoría de las muestras recuentos del orden de 10^4 y sólo en la muestra 3, procedente de mejillones, un valor del orden de 10^6 UFC/g.

Tabla 14. Recuentos de mesófilos aerobios en muestras de moluscos bivalvos vivos

MUESTRAS	MERCADO	TIPO ALIMENTO	AEROBIOS MESÓFILOS UFC/g
1	Cooperativa C	Almejas	$2,1 \cdot 10^4$
2	Cooperativa C	Mejillones	$5,6 \cdot 10^4$
3	Pescadería B	Mejillones	$2,3 \cdot 10^6$
4	Pescadería A	Mejillones	$6,4 \cdot 10^4$

Aunque en la legislación española no se establecen unos límites para el recuento de aerobios mesófilos en este tipo de muestras, cabe destacar que la muestra 3 procedente de mejillones está ligeramente más contaminada respecto al resto de muestras. Esta muestra proviene de la pescadería B en la que sólo se ha realizado un muestreo, por lo que no se puede comparar con otra muestra de la misma pescadería. Cann (1977) estableció un límite para estos microorganismos, asegurando que la microbiota total de moluscos era muy variable y, por tanto, el límite era muy amplio, con valores de 10^3 a 10^8 /cm³ (20°C) para ostras, almejas, berberechos y mejillones. Los valores obtenidos en las muestras estudiadas resultan aceptables dentro de los límites establecidos por Cann, esto puede deberse a que al analizarse los miércoles, las muestras eran muy frescas.

Los distintos mercados estudiados cumplen los límites establecidos por Cann ya que los resultados de las muestras entran entre los límites;

11.2. LISTERIA monocytogenes

A partir de las muestras analizadas se realizó el recuento de *Listeria monocytogenes* basado en la norma ISO 11290-2. De las 4 muestras analizadas, en una de ellas (nº 4), no se observó ninguna colonia típica de *Listeria spp.* por lo que se consideró que este alimento contenía una cantidad inferior a 100 UFC/mL para *Listeria monocytogenes*.

En las muestras 1, 2 y 3, sí se observaron colonias típicas del género *Listeria* y se realizó la tinción Gram. Para las muestras 1 y 2 se procedió a identificar mediante tira API *Listeria* las colonias sospechosas. En la muestra 3 se realizó también un cultivo en agar ALOA de una colonia sospechosa, para observar si había crecimiento típico de *Listeria spp.* Además, se realizó la prueba de la hemólisis y tinción Gram. La utilización de la tira API, no resultó concluyente debido a que el resultado de ésta fue un perfil inaceptable de *L. grayi*. En la figura 8 se puede observar el resultado de la tinción Gram.

En ninguna de las tiras API, se identificó *Listeria spp.*, por lo que se consideró que las muestras 1, 2 y 3 contenían una cantidad de *L. monocytogenes* inferior a 100 UFC/mL, cumpliendo así con los criterios microbiológicos descritos para moluscos bivalvos vivos en la legislación. Estas tres muestras corresponden a almejas y mejillones de tres mercados diferentes. Se puede decir que los tres mercados, cumplen con la legislación, considerando los productos puestos a la venta como aptos para el consumo.

Tabla 15. Recuento de cultivo de *Listeria monocytogenes*

Nº MUESTRA	TIPO ALIMENTO	AISLADO	RECUESTO CULTIVO
1	Almejas	2 colonias (1 placa)	< 100 u.f.c/g
2	Mejillones	2 colonias (1 placa)	< 100 u.f.c/g
3	Mejillones	2 colonias (2 placas)	< 100 u.f.c/g
4	Mejillones	Ninguno	< 100 u.f.c/g



Figura 8. Tinción Gram. Se observa bacilos cortos, Gram-positivos y con extremos redondeados. Se puede presentar aislado, en parejas, cadenas cortas o agrupado en V



Figura 9. Resultado Tira API LISTERIA de la muestra 1.

11.3. *E. COLI* Y COLIFORMES TOTALES

Se analizó la cantidad de coliformes totales mediante el NMP. Los resultados obtenidos son aceptables, ya que cumplen la legislación española para moluscos bivalvos vivos, siendo este límite de 230NMP/100g.

Tabla 16. Recuento de coliformes totales mediante el NMP

MUESTRA	ALIMENTO	NMP			COLIFORMES/ g
		1/10	1/100	1/1000	
1	Almejas	2	0	0	$9 \cdot 10^1$
2	Mejillones	3	2	0	$9,3 \cdot 10^2$
3	Mejillones	0	0	0	0
4	Mejillones	3	1	0	$4,3 \cdot 10^2$

Se analizó también la presencia de *E. coli* en cuatro muestras de moluscos bivalvos vivos a partir de los tubos positivos del recuento del NMP. Únicamente se identificó un aislado, procedente de la muestra 2 como perteneciente a la especie *E. coli*. Este resultado no coincide con González *et al* (2009) y Muñoz *et al* (2008) que sí sobrepasaron los límites de *E. coli* en 25 g de muestra de moluscos bivalvos vivos. En el caso de González *et al* (2009), excedieron los valores permitidos con el 33,33% de las muestras analizadas para *E. coli*. Para coliformes totales no hubo crecimiento. En cambio, en el caso de Muñoz *et al* (2008), sobrepasaron los criterios microbiológicos en un 25% con respecto a *E. coli*.

Comparando con la legislación, los resultados obtenidos nos indicaron que se encontraban dentro de los límites establecidos, considerando en todos los casos las muestras aptas para su consumo.

Tabla 17. Detección e identificación de *E. coli*

MUESTRA	ALIMENTO	COLONIAS SOSPECHOSAS		IMViC			
		TBX	TBX SUBCULTIVADO	I	M	Vi	C
1	Almejas	(-)					
2	Mejillones	3 (+)	3 (+)	3 (+)	3 (+)	3 (-)	2(+), 1(-)
3	Mejillones	(-)					
4	Mejillones	(-)					

11.3.1. SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DEL AISLADO

Se determinaron los halos de inhibición (mm) de los 12 antibióticos ensayados frente al aislado de *E. coli*, procedente de la muestra 2, por el método del antibiograma disco-placa descrito anteriormente (10.2.2.2). Además, se realizó el mismo procedimiento para la cepa de *E. coli* CECT 3423 utilizada como control de calidad. Los resultados obtenidos tanto del aislado como de la cepa se compararon con los estándares del CLSI, tal y como se describe en el apartado 10.2.2.2.

Los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Resultados sensibilidad a antibióticos del aislado de la muestra 2

ANTIMICROBIANO	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)	
	AISLADO <i>E. coli</i>	Lectura halos inhibición
Gentamicina (CN)	11	Resistente
Amikacina (AK)	9	Resistente
Amoxicilina /ác. Clavulánico (AMC)	12,5	Resistente
Erytromicina (E)	19	Intermedio
Ampicilina (AMP)	19	Sensible
Cloranfenicol (C)	31	Sensible
Cefalotina (KF)	7	Resistente
Ciprofloxacino (CIP)	14	Resistente
Ceftriaxona (CRO)	26,5	Sensible
Tetraciclina (TE)	12	Resistente
Ác. Nalidíxico (NAL)	15	Intermedio
Kanamicina (K)	10	Resistente

La cepa estudiada, resultó ser multirresistente a 7 de los 12 antibióticos estudiados, resultando su patrón de resistencia: AMC, AK, CN, KF, CIP, TE, K. En los últimos años se han mencionado la presencia de resistencia a antibióticos en diferentes moluscos, destacando la importancia de la resistencia a antibióticos aparecida en los criaderos de marisco como un reservorio de bacterias resistentes a los diferentes antimicrobianos (Miranda *et al.*, 2013). Van *et al.*, 2008 observaron resistencias con una mayor frecuencia a tetraciclina, ampicilina, ácido nalidíxico y cloranfenicol. En nuestro estudio, la única cepa aislada resultó ser sensible ambos antibióticos, no siendo un resultado representativo debido a la poca información que podemos obtener de un solo aislado.

Cabe destacar la resistencia a dos de los cuatro betalactámicos utilizados, AMC y KF. Aunque resultó ser sensible a ceftriaxona, antibiótico con total prohibición para usos de alimentación animal desde el 1 de Enero del 2006 (OMS, 2008).

Un hecho destacable es la resistencia a ciprofloxacino, una fluoquinolona no autorizada para el uso animal en Europa (Balsalobre y Hernández, 2004), mientras que para el ácido nalidíxico el resultado ha sido intermedio. En bibliografía Hakanen *et al* (1999) sólo aparece documentada la reducción de la sensibilidad al ciprofloxacino cuando el ácido nalidíxico es resistente y no al revés, como es nuestro caso.

11.4. SALMONELLA

11.4.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE SALMONELLA spp.

Se investigó la presencia de *Salmonella* spp. en las cuatro muestras de moluscos bivalvos vivos, siguiendo la norma ISO 6579 para la detección e identificación de esta bacteria.

Tabla 19. Resultados detección e identificación de *Salmonella* mediante la norma ISO 6579

MUESTRA	ALIMENTO	COLONIAS SOSPECHOSAS		TSI	API 20 E
		XLD	HK		
1	Almejas	0	2	2 (-)	
2	Mejillones	0	3	3 (-)	
3	Mejillones	1	0	(-)	
4	Mejillones	0	1	(+)	(-)

En todas las muestras analizadas aparecieron colonias sospechosas de pertenecer al género *Salmonella*. Tras la realización de las pruebas bioquímicas para la confirmación, mediante la prueba del TSI se descartó la mayoría de colonias sospechosas por no tener perfil característico de *Salmonella* (medio rojo y ennegrecimiento del tubo y con gas). Sólo una muestra dio el perfil característico en TSI y se realizó la tira API 20E, siendo negativa para *Salmonella*. Al no aislarse en ningún caso *Salmonella* podemos concluir que se cumple la norma microbiológica la cual nos indica que debe haber ausencia de *Salmonella* en 25 g de moluscos bivalvos vivos. Este resultado no coincide con González *et al.*, 2009; Quiñones *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2008 en los que sí se ha detectado presencia de *Salmonella* en 25 g de muestra de moluscos. En el caso de Quiñones *et al* (2000), detecta en un gran número de muestras de almejas, el 11% del género *Salmonella* spp.

11.4.2. MÉTODO MOLECULAR MEDIANTE PCR PARA LA DETECCIÓN DE SALMONELLA

Para la detección e identificación de *Salmonella* por PCR, se cogieron alícuotas del pre-enriquecimiento y del caldo RVS. Después de realizar el análisis por el método tradicional, siendo en todos los casos negativo, como se indica en el punto anterior, se comprobaron los resultados mediante la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), como se indica en el apartado 10.2.4.2.

En las muestras de moluscos bivalvos vivos analizadas, no apareció ningún resultado positivo de *Salmonella*, como se observa en la figura 11.

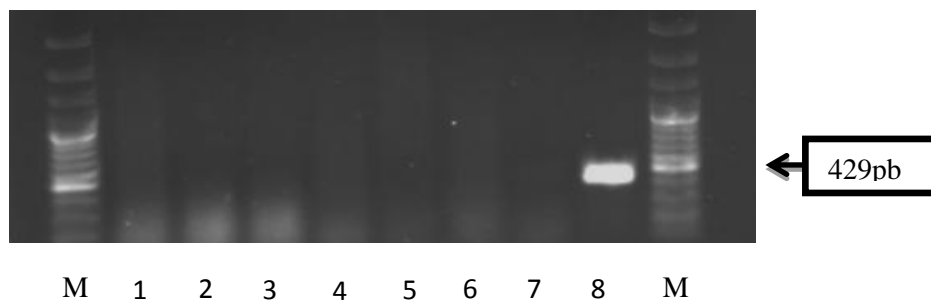


Figura 11. Detección directa de *Salmonella* por PCR tras 24 y 48 horas de enriquecimiento. 1, 8 marcador de 100pb. M: Marcador; 1: 1A₀; 2: 1A₁; 3: 2A₀; 4: 2A₁; 5: 3A₀; 6: 3A₁; 7: 4A₀; 8: 4A₁; 9: control negativo; 10: control positivo *Salmonella* CECT 715; M: Marcador.

Nuestros resultados no coinciden con los de otros autores como Kumar *et al* (2007), el cual detectó *Salmonella* por PCR en 31,6% de las muestras de mejillones, almejas y ostras estudiadas, mientras que por el método tradicional, en estas mismas muestras sólo se pudieron cultivar el 21,3% de ellas, siendo la PCR una técnica de detección rápida y específica en comparación con el método tradicional y recomendando su uso para evitar falsos negativos.

11.5. ARCOBACTER

Se analizaron 7 muestras de moluscos bivalvos con el objetivo de detectar la presencia de bacterias del género *Arcobacter* utilizando técnicas de cultivo tradicional en placa y técnicas de detección molecular, concretamente PCR. Los análisis por cultivo se realizan exclusivamente después del enriquecimiento y finalizan con una identificación por PCR, mientras que los análisis de detección directa por PCR se han realizado antes y después de una etapa de enriquecimiento. La etapa previa de enriquecimiento selectivo consiste en una incubación en un medio que favorecerá la recuperación de las células vivas de *Arcobacter* de las muestras, seguida de un cultivo en medios sólidos selectivos y un análisis de ese caldo por PCR. Finalmente, se realiza la identificación y caracterización de las colonias aisladas, y la detección directa, tanto antes como después de la fase de enriquecimiento.

Dado que no existe ningún procedimiento estandarizado de referencia para el aislamiento y detección de *Arcobacter*, en este estudio, y después de consultar la bibliografía publicada al respecto, en este trabajo se desarrolló un protocolo basado en el descrito por Collado y Figueras (2011).

11.5.1. DETECCIÓN DE ARCOBACTER

11.5.1.1. POR CULTIVO EN PLACA

Del total de las 7 muestras analizadas procedentes de 3 puntos de venta distintos, se obtuvieron después del enriquecimiento de 48 horas, un total de 16 colonias distintas sospechosas de pertenecer al género *Arcobacter* por su morfología y coloración en placa, que pertenecían a 4 muestras distintas (1 colonia de la muestra 1, 3 colonias en la muestra 2, 4 colonias en la muestra 3 y 8 colonias en la muestra 6). Tras realizar la tinción Gram de las colonias sospechosas, únicamente 9 de las 16 colonias estudiadas pudieron ser adscritas a este género en base su morfología y coloración al microscopio, es decir, se trataba de bacilos curvados Gram negativos. Finalmente se obtuvieron 9 aislados procedentes de 1 muestra de berberechos y 2 muestras de mejillones (2A1, 3A1, 3A3, 6A1, 6A3, 6A4, 6A5, 6A6 y 6A7) pertenecientes al género *Arcobacter*, que posteriormente serían confirmados mediante identificación por PCR.

Tabla 20. Resultados muestras *Arcobacter*

MUESTRA	ALIMENTO	COLONIAS SOSPECHOSAS	TINCIÓN	AISLADOS OBTENIDOS POR CULTIVO	RESULTADOS
1	Almejas	1 colonia	1 colonia (-)	(-)	(-)
2	Mejillones	3 colonias	1 colonia (+) 2 colonias (-)	2A1	(+)
3	Mejillones	4 colonias	2 colonias (+)	3A1	(+)
			2 colonias (-)	3A3	
4	Mejillones	(-)	(-)	(-)	(-)
5	Almejas	(-)	(-)	(-)	(-)
6	Berberechos	8 colonias sospechosas	6 colonias (+), 2 colonias (-)	6A1	(+)
				6A3	
				6A4	
				6A5	
				6A6	
				6A7	
7	Mejillones	(-)	(-)	(-)	(-)

La identificación a nivel de género de las colonias aisladas en medio ASO se estableció mediante amplificación por PCR de un fragmento específico del género *Arcobacter* de 331pb del gen 23S ARNr usando los iniciadores ARCO1 y ARCO2. En todos los aislados analizados se observó la banda característica de 331pb.

A continuación, se reflejan los resultados obtenidos en la siguiente tabla:

Tabla 21. Resultados aislados *Arcobacter*

MUESTRA	AISSADOS SOSPECHOSOS	PCR
2	2A1	(+)
3	3A1	(+)
6	6A1	(+)
	6A3	(+)
	6A5	(+)
	6A6	(+)
	6A7	(+)

En la figura 12 puede observarse el producto de amplificación obtenido para algunos de los aislados identificados.

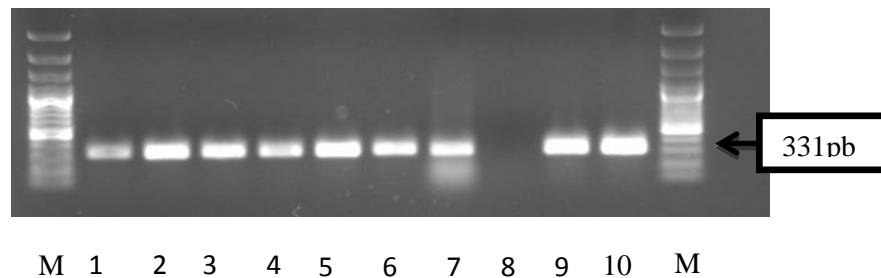


Figura 12. Resultados aislados por PCR de *Arcobacter*; M: Marcador; 1: 2A1; 2: 6A7; 3: 6A5; 4: 6A3; 5: 6A6; 6: 6A1; 7: 3A₁; 8: control negativo; 9: control positivo *A. butzleri* DSM 8739; 10: control positivo *A. butzleri* DSM 8739; M: Marcador.

Por tanto, mediante la técnica de cultivo en placa pudo detectarse *Arcobacter* en 3 de las 7 muestras analizadas, es decir, un 42,9% de las mismas. Aunque se han realizado múltiples estudios sobre la prevalencia de *Arcobacter* en alimentos de origen animal, principalmente leche cruda, carne de ternera, de cerdo y aves de corral (Collado y Figueras, 2011), son pocos los estudios realizados sobre la presencia de este género en moluscos bivalvos. En la bibliografía consultada, los datos obtenidos por otros investigadores son comparables a los obtenidos en este estudio. En un trabajo realizado sobre la prevalencia de *Arcobacter* en carnes y mariscos, la contaminación por *Arcobacter* spp. fue de un 41,1 % de muestras de mejillones analizadas con un método similar al descrito en nuestro trabajo (Collado *et al.*, 2009). En otro estudio publicado recientemente, en el año 2012, se obtienen también valores muy similares en mejillones, del orden del 41% (Levicán *et al.*, 2012).

11.5.1.2. **POR PCR**

A partir de las alícuotas de 1,5ml tomadas antes y después del enriquecimiento se realizó la detección directa por PCR de *Arcobacter*. Este método nos proporciona resultados positivos en un corto periodo de tiempo con los que estudiar la presencia de un posible patógeno en las muestras analizadas. En 5 de las 7 muestras analizadas se obtuvo la banda característica del género *Arcobacter*, es decir, un 71% de las muestras fueron positivas para este microorganismo, tras la fase de enriquecimiento selectivo. Sólo en una de ellas, la muestra 6, fue la posible la detección sin enriquecimiento previo de la muestra. Estas diferencias en los porcentajes de detección obtenidos sin y con enriquecimiento podrían ser debidos a que la combinación de PCR con una etapa de enriquecimiento aumenta el nivel de células viables, mientras que las células muertas y los inhibidores son diluidos (Denis *et al.*, 2001).

A continuación, los resultados obtenidos se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 22. Resultados obtenido por PCR de las muestras

MUESTRA	ALIMENTO	Tiempo de incubación	PCR
1	Almejas	0 h	(-)
		48 h	(-)
2	Mejillones	0 h	(-)
		48 h	(+)
3	Mejillones	0 h	(-)
		48 h	(+)
4	Mejillones	0 h	(-)
		48 h	(+)
5	Almejas	0 h	(-)
		48 h	(+)
6	Berberechos	0 h	(+)
		48 h	(+)
7	Mejillones	0 h	(-)
		48 h	(-)

En la siguiente figura, se puede observar la identificación de *Arcobacter* por PCR

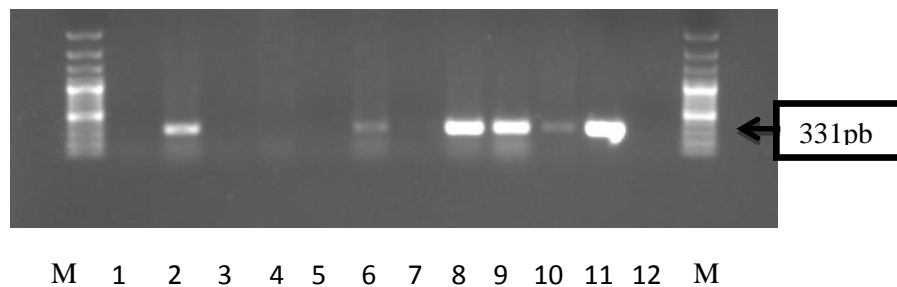


Figura 13. Identificación de *Arcobacter* por PCR M: Marcador; 1: 3A₀; 2: 3A₁; 3: 4A₀; 4: 4A₁; 5: 5A₀; 6: 5A₁; 7: 6A₀; 8: 6A₁; 9: 7A₀; 10: 7A₁; 11: control positivo *A. butzleri* DSM 8739; 12: control negativo; M: Marcador.

En nuestro estudio los resultados confirman el elevado nivel de contaminación en muestras de moluscos marinos destinadas al consumo humano. Al comparar estos resultados con lo obtenidos por otros autores, se observan ciertas discrepancias en cuanto a los porcentajes de detección obtenidos. De hecho, en un trabajo publicado en 2011, en el que se estudiaron distintas muestras de moluscos, los valores que se obtuvieron de las muestras enriquecidas, no superaban un 25% de detección de *Arcobacter* spp. (Patyal *et al.*, 2011). Estas diferencias en cuanto a los niveles de detección de *Arcobacter*, podrían deberse a muchas causas, entre ellas los diferentes protocolos llevados a cabo por los distintos autores, así como las distintas condiciones climatológicas, época del año, lugar geográfico, etc. de los trabajos publicados en bibliografía (Collado *et al.*, 2009).

El elevado porcentaje de detección de *Arcobacter* en muestras de moluscos marinos de consumo humano refuerza las opiniones de otros autores que sugieren la importancia del agua como vehículo de transmisión del mismo (Mansfield y Forsythe, 2000). La presencia de *Arcobacter* en aguas no cloradas, tal y como han mostrado los resultados, sugiere que éstas pueden representar una fuente importante de contaminación (Rice *et al.*, 1999).

11.5.1.3. COMPARACIÓN ENTRE LOS DOS MÉTODOS

A las 48 horas se obtienen mejores resultados por PCR que por cultivo, lo que demuestra mayor sensibilidad de la técnica de PCR (Moreno *et al.*, 2003), ya que en las mismas muestras, después del enriquecimiento, se obtiene un 71% de muestras positivas por PCR frente a tan sólo un 42,9% de muestras positivas por cultivo. Sin embargo, estas diferencias podrían deberse a que la técnica de PCR detecta moléculas de DNA, lo que significa que puede detectar células

muertas (Waage *et al.*, 1999b), o por otro lado es posible que las células, aun estando presentes, se encuentren dañadas o en concentraciones muy bajas y no sean capaces crecer en medios sólidos de cultivo (Lázaro *et al.*, 1999). Todas las muestras positivas por cultivo resultaron ser positivas por PCR, es decir, todos los aislados se obtuvieron de muestras, en las que previamente, tras detección directa por PCR, también se obtuvo la banda característica del género *Arcobacter*. Y a partir de ninguna de las muestras negativas por PCR, se obtuvieron aislados pertenecientes al género *Arcobacter*.

12. CONCLUSIONES

- La calidad alimentaria de las muestras analizadas de moluscos bivalvos se han considerado aceptable
- Basándonos en la norma ISO 11290-2 para el recuento de *Listeria monocytogenes*, las muestras han resultado aceptables ya que cumplen el valor de < 100 ufc/ g. recogido en la legislación española.
- Se ha establecido la ausencia de *Salmonella* spp, tal como se establece en la legislación española en todas las muestras. En ningún caso se detectó *Salmonella* mediante PCR, siendo en este caso los resultados de cultivo y moleculares coherentes.
- Las muestras han resultado ser aceptables para coliformes totales mediante el método del NMP, cumpliendo los límites de los criterios microbiológicos establecidos en la legislación española. Hay que destacar la presencia de *E. coli* en la muestra 2.
- El estudio de sensibilidad a antibióticos de la cepa de *E. coli* aislada ha mostrado su carácter multiresistente, siendo resistente a 7 antibióticos de los 12 estudiados, encontrándose resistencias en todos los grupos de antibióticos testados excepto el grupo de los macrólidos. Esto podría suponer un peligro de seguridad alimentaria.
- *Arcobacter* spp. ha sido detectado por cultivo en un 43% de las muestras analizadas.
- En los análisis realizados para *Arcobacter* por PCR directa sin enriquecimiento de la muestra, solo se obtuvieron resultados positivos en una de las muestras, mientras que tras el enriquecimiento, cinco de las muestras resultaron positivas. Este resultado confirma la necesidad de un enriquecimiento selectivo previo en medio AB con suplemento antibiótico CAT, para la detección del *Arcobacter* spp. en este tipo de muestras.
- Se obtuvieron más muestras positivas por PCR que por cultivo, lo que indica una mayor sensibilidad de los análisis realizados por PCR. Esto demuestra la utilidad de la PCR para la detección rápida e inequívoca de *Arcobacter* spp. en alimentos, siendo la combinación de enriquecimiento durante 48 horas en microaerofilia seguida de una amplificación por PCR, la que ofrece el mayor número de resultados positivos.
- Es este trabajo se confirma el elevado nivel de contaminación por *Arcobacter* spp. en muestras de moluscos marinos destinadas al consumo humano, lo que refuerza la opinión de otros autores que sugieren la importancia del agua como vehículo de transmisión del mismo.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aabo, S.; Rasmussen, O. F.; Rossen, L.; Sorensen, P. D. and Olsen, J. E.** 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell, Probes.* 7: 171-178.
- Abdelbaqi, K.; Menard, A.; Prouzet-Mauleon, V.; Bringaud, F.; Lehours, P. and Megraud, F.** 2007. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacters* sp.pecies and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol* 49, 337-345.
- Adams. M., Moss. M.** 1997. *Microbiología de los alimentos: Introducción.* Editorial ACRIBIA, S.A.
- Allaert, C; Escolà, M.** 2002. *Métodos de análisis microbiológicos de los alimentos.* Ed. Díaz de Santos.
- Balsalobre, B. y Hernández, J.** 2004. Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* entérica aislados de alimentos de origen animal. 4 (1-2): 42- 46.
- Bastyns, K., Cartuyvels, D., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H. and Dewachter, R.** 1995. A variable 23S rDNA region is a useful discriminating target for genus-sp.ecific and sp.ecies-sp.ecific PCR amplification in *Arcobacter* sp.ecies. *Syst Appl Microbiol* 18, 353-356.
- Bergey's.** 1984. *Manual of systematic Bacteriology.*
- Bourdegois. C., Mesele. J., Zucca. J.,** *Microbiología alimentaria.* 1994. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Bucker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M. and Schulzke, J.D.** 2009. *Arcobacter butzleri* Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells *J Infect Dis* 200, 756-764.
- Bula, C.J., J. Bille and M. P. Glauser.** 1995. An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: description of 57 cases involving adults. *Clin. Infect. Dis.* 20: 66-72.
- Cabrera, C. E.; Gómez, R. F. y Edmundo, A.** 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* Vol. 38 N° 2, 2007 (Abril-Junio).
- Calvo, G.; Fernández, H and Laura, M.** 2013 Vol.63 N°2. *Arcobacter*: un patógeno emergente de origen alimentario.
- Cann, D.C.** 1977. Bacteriology of selffish with reference to international trade, in "Handing, processing and marketing of tropical fish". *Tropical Products Institute, London,* 377-394.
- CLSI.** 2010. *Manual de actualización en resistencia bacteriana y normas CLSI M100-S20.* Grebo. Capítulo 3: 6-8.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J. and Figueras, M.J.** 2008. Presence of *Arcobacter* spp. In environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environ Microbiol* 10, 1635-1640.
- Collado L, Guarro J. y Figueras M.** 2009. Prevalence of *Arcobacter* in meat and selffish. *J. Food Prot.* 2009. 72: 1102-1106.
- Collado, L. cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. and Figueres, M.J.** 2009 *Arcobacter mytili* sp. nov., and indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1391-1396.
- Collado L. Levican A. Perez J. and Figueres M.** 2010. *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 2010.61; 2155-2161.
- Collado, L. y Figueres, M.J.** 2011. Taxonomy, epidemiology and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 174-192.
- Collins MD, Wallbanks S, Lane DJ, Shah J, Nietupski R, Smidda J, Dorsch M and Stackenbrandt, E.** (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int J Syst Bacteriol*, 41: 240-246.
- Collins, C. I.; Wesley, I. V. and Murano, E. A.** 1996. Detection of *Arcobacter* ssp. in ground pork by modified plating methods. *Journal of Food Protection.* 59: 448- 452.
- Cormica, M.; Butler, C.; Morris, D.; Corbertt-Feenet, G.; Flynn, J.** 1998 Antibiotic resistance amongst *Salmonella* enteric species isolated in the Republic of Ireland. 116- 118.
- D'Aoust, J.-Y.** 1989. *Salmonella*, p. 327-445. In M. P. Doyle (ed.), *Foodborne Bacterial Pathogens.* Marcel Dekker, Inc., New York.

- D'Aoust, J.-Y.** 1991. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 12:17-40.
- Davis, M., Hancock, D., Beeseer, T.** 1999. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella* enteric serovar typhimurium isolates from humans and cattle in the northwestern United States, 1982-1997; 5:802.
- Denis, M., Refrégier-Petton, J., Laisney, M.J., Ermel, G., Salvat, G.** 2001. *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *J Appl Microbiol* 91, 255–267.
- De Smet, S, Vandamme P, De Zutter L, In SL, Doudiah L, Houf K.** *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 2011. 61: 356-361
- Donachie, S. P., Browman, J. P., On, S. L., Alam, M.** 2005 *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 3), 1271-1277.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P.** 2004. Diferenciación de los principales serotipos *Listeria monocytogenes* por PCR múltiple. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3819-3822.
- Doyle, M. P. and Padye, V. V.** 1989. “*Escherichia coli*” in M. P. Doyle (ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*, New York: Marcel Dekker: 235-81.
- Early, J. C. and Stroud, G. D.** 1982. Sellfish, in “Fish-Handling and Processing”. 126-137. Ed. Aikten, A.; Mackie, I.M., Meritt, J. H.; Widsor, M.L.; Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Torry Research Station, Her Majesty’s Stationery Office, Edinburgh.
- ECDC.** 2011. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/esac-net-database/Pages/consumption-rates-by-country.aspx. (Visto el día 24 de junio del 2014).
- ECDC.** 2012. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx. (Visto el día 20 de junio del 2014).
- ECDC.** 2005-2014. http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/Pages/index.aspx. (Visto el día 18 de junio del 2014).
- EFSA.** 2013. <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130409.htm>. (Visto el día 18 de junio del 2014).
- EFSA.** 2014. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/ecolioutbreak2011.htm>. (Visto el día 19 de junio del 2014).
- Engberg, J., On, S.L., Harrington, C. S. And Gerner-Smidt, P.** 2000. Prevalence of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, and *Sutterella* spp.p. in human fecal samples as estimated by a reevaluation of isolation methods for *Campylobacters*. *J Clin Microbiol* 38, 286-291.
- Evans, D. J., D. G. and Dupont, H. L.** 1979. “Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* determined in human, bovine, chicken and guinea pig erythrocytes in the presence and absence of mannose”, *Infection and Immunity.* 23: 336-46.
- FAO.** 1999. <http://www.fao.org/docrep/meeting/x1845s.htm>. (Visto el día 26 de junio del 2014).
- Farber, J. M.** 1991. *Listeria monocytogenes* in fish products. *J. Food Prot.* 54:922-934.
- Fernández, H., Otth, L., Wilson, M., Rodríguez, R., Proboste, B., Saldivia, C. and Barría, P.** 2001. Occurrence of *Arcobacter* sp. in river water, mussels and commercial chicken livers in southern Chile. *Int J Med Microbiol* 291,140.
- Figueras, M. J., Collado, L. and Guerrero, J.** 2008. A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62, 11-15.
- Figueras M, Collado, Levican A, Perez J, Solsona M & Yustes C.** *Arcobacter molluscum* sp. nov., New species isolated from shellfish. *Int. J. system. Evol. Microbiol.* 2011.34: 105-109.
- Figueras M, Levican A, Collado L, Inza I & Yustes C.** *Arcobacter ellissi* sp. nov. Isolated from mussels. *System. Appl. Microbiol.* 2011. 34: 414-418.
- Gimferrer, N.** 2008. “Uso de antimicrobianos en animales” (Búsqueda realizada el 17-06-2014).
- González, A.** 2005. Técnicas genotípicas aplicadas al estudio de campilobacterias patógenas de interés en seguridad alimentaria. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València.

- González, A., Botella, S., Montes, R.M., Moreno, Y. and Ferrus, M.A.** 2007. Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Sp.ain. *J Food Prot* 70, 341-347.
- González, M., Graü C., Bettina, L., Gil, H. y Vásquez, A.** 2009. Microbiological Quality of the Oyster *Crassostrea rhizophorae* and Extraction Waters, Sucre State, Venezuela.
- Gray, M. L. and Killinger, A. H.** 1966. "*Listeria monocytogenes* and listeric infections", *Bacteriology Reviews* 30: 309-82.
- Hakanen et al** 1999, Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonellas* and validation of nalidixic acid screening test. *Journal of clinical microbiology*.
- Ho HT, Lipman LJ, Gaastra W.** 2006. *Arcobacter*, what is known about a potential foodborne zoonotic agent! *Vet Microbiol* 115:1–13.
- Ho, H.T., Lipman, L.J., Hendriks, H.G., Tooten, P.C., Ultee, T. and Gaastra, W.** 2007. Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 50, 51-58.
- Horsley, R. W.** 1977. A review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analyses. *J. Fish Biol.* 529-553.
- Houf, K., On, S.L., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., Vandamme, P.** 2005. *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *Int. J. syst. Evol. Microbiol*, 55, 713-717.
- Houf K, On S, Coenye T, Debruyne L, De Smet S& Vandamme P.**2009. *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 59: 2599-2604.
- International Commision on Microbiological Specifications for foods (ICMSF)** Microorganismos de los alimentos: Características de los patógenos microbianos. 1998. Editorial ACRIBIA, S.A.
- ISC.** 2007. Brotes de intoxicación alimentaria por biotoxinas marinas debidos al consumo de pescado y marisco en España. 2003-2006. Semanas: 22-23 del 27/05 al 9/06 de 2007, vol. 15 nº 12/133-144.
- ISC.** 2009. Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008. Semana: 38-39 del 20/09 al 03/10 de 2009. Vol. 17 nº 17/193-204.
- ISC.** 2014. Situación de la zoonosis en Europa y en España. Informe de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Semanas 11-12-13-14. Del 10/03 al 06/04 de 2014. Vol. 22 nº 5 / 43-55.
- Jay, J.,** 1996 prevalence of *Listeria spp.* In meat and poultry products. *Food Control.* 7:209-214
- Jay, J, Loessener, M, Golden, D.** 2005. Microbiología moderna de los alimentos. 5ª Edición. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Jiménez, M. A.** 1998. Amplificación de ácidos nucleicos: introducción a la PCR. *Revista Colegio Oficial de Biólogos*, nº 15, julio.
- Kielbauch J, Plikaytis B, Swaminathan B, Cameron D, &Wachmuth I.** 1991. Restriction fragment length polymorphism in the ribosomal genes for species identification and subtyping of aerotolerant *Campylobacter* species. *J. Clin. Microbiol.*26: 1670-1676.
- Kim H, Hwang C, and Cho B.** 2010. *Arcobacter marinus* sp. nov., *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 60:2172-2178.
- Kopilović, B.; Ucakar, V.; Koren, N.; Krek, M. and Kraigher, A.** 2008. Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a costal area in Slovenia in June and July 2008. 13 (34). pii: 18957.
- Kumar, R., Surendran, PK., Thampuran, N.** 2007. Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for detection of *Salmonella* in seafood.
- Lastovica, A. J. and Skirrow, M. B.** 2000. Clinical significance of *Campylobacter* and related species other than *Campylobacter jejuni* and *C. coli*, p. 89-120. In: Nachamkin, I. and Blaser, M. J. (ed.), *Campylobacter* 2nd Edition. ASM Press, Washington, D. C.
- Lázaro, B.; Cárcamo, J.; Audicana, A.; Perales, I. and Fernández-Astorga, A.** 1999. Viality and DNA maintenance in nonculturable spiral *Campylobacter jejuni* cells after long-term exposure to low temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4677-4681.

- Lázaro, E. y Oteo, J.** 2006. Evolución del consumo y de la resistencia a antibióticos en España. IT del Sistema Nacional de Salud. Volumen 30, Nº 1/2006.
- Lee, R.; Lovatelli, A. y Ababouch, L.** 2010. Depuración de bivalves: aspectos fundamentales y prácticos. FAO documento técnico de pesca.
- Lehner A, Brumberger V, and Preac-Mursic V.** 1994. Severe Diarrhea associated with *Arcobacter butzlei*. *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 13: 660-662.
- Levican A, Collado L, Aguilar C, Yustes C, Dièguez A, and Romalde J, Figueres M. J.** 2010. *Arcobacter bivalviorum* sp. nov., and *Arcobacter veneriupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 2012. 35: 133-138.
- Levican A, Collado L & Figueres J.** 2012. *Arcobacter cloacae* sp. nov. And *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Dièguez, Al., Romalde, JI., Figueres, MJ.,** 2012. *Arcobacter Bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov. new species isolated from shellfish. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 133-138.
- Levican, A.; Collado, L.; Yustes, C.; Aguilar, C. and Figueras, M. J.** 2014. Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase the recovery and diversity of *Arcobacter* spp. from shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 80(1):385-91.
- Liston, J.** 1980. Microbiology in fishery science. In *Advances in Fish Science and Technology.* 138-157. Ed. J. J. Connell, Fishing News Book Ltd Farnham, Surrey, England.
- Loessner, J y Busse, M.,** 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1912-1918.
- Maguiña, C; Ugarte, C. A. y Montiel, M.** 2006. Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Med Per.* 23(1).
- Mansfield, L. P. and Forsythe, S. J.** 2000. *Arcobacter butzleri*, *A. skirrowii* and *A. cryaerophilus* - potential emerging human pathogens. *Reviews in Medical Microbiology.* 11: 161-170.
- Marañón, M.; Ochoa, L.; Espigares, E. y Moreno, E.** 2013. Moluscos bivalvos como agentes transmisores de infecciones víricas. *Higiene y Sanidad Ambiental,* 13 (2): 961-967.
- Martínez, R.E. and Villalobos, L.B.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked shellfish. *Revista científica, FCV-LUZ/Vol. XV. Nº2,* 163-167.
- Miranda, C., Rojas, R., Garrido, M., Geisee, J. and González, T.** 2013. Farmed seafood role as a reservoir of antimicrobial resistant bacteria.
- Montville. T. y Matthews. K.** 2009. *Microbiología de los alimentos: Introducción,* 2ª. ed.2009. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Moreno, Y.; Botella, S.; Alonso, J. L.; Ferrús, M. A.; Hernández, M. and Hernández, J.** 2003. Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1181-1186.
- Muñoz, D., Graü C., Bettina, L., Martínez, C and Zerpa, A.** 2008. Bacterial indicators in the Mussels, perna perna y *P. vidiris* and in Bivalve Extraction Waters, from the Northern and Southern Coasts of sucre, State, Venezuela. *FCV-LUZ/ vol. XVIII, Nº5* 595-606.
- Murray, E.G.D., Web, R.A and Swarm M.B.R.** 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undercribed bacillus *Bacterium monocytogenes* sp. *Journal of pathological bacteriology* 29: 407-439.
- Nicolas, J-A., and Vidaud.** 1987. Contribution a l'étude des *Listeria* presents dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine. *Rec. Med. Vet.* 163(3): 283-285.
- Normas microbiológicas de los alimentos.** 2014. [http://www.osakidetza.euskadi.net/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/Normas%20microbiol%C3%B3gicas%20de%20los%20alimentos%20\(Enero%202014\).pdf](http://www.osakidetza.euskadi.net/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/Normas%20microbiol%C3%B3gicas%20de%20los%20alimentos%20(Enero%202014).pdf) (Visto el día 3 de febrero del 2014).
- Normas microbiológicas por alimentos.** 2014. http://bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/d311306-3/*/*/*normmicro.htm. (Visto el día 3 de febrero del 2014).

- O'Connor, D. R.** 2002: Report of the Walkerton Inquiry: The events of May 2000 and related issues. Part 1: A summary. Toronto, Ontario (Canadá), Ontario Ministry of the Attorney General, Queen's Printer for Ontario.
- OMS.** 2008. Informe sobre la salud en el mundo 2008. La atención primaria de salud. Más necesaria que nunca.
- OMS.** 2014. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. Who Library Cataloguing- Publication Data. Section 2. Pág. 17.
- On, S. L. W., Stacey, A. and Smith, J.** 1995. Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteriemia. J. Infect. 31: 225-227.
- Ortega, T.; Caffaro, M.; Herrera, D. y Rivas, A.** 2008. Detección de un brote de hepatitis A en Ceuta a través del sistema de información microbiológica. 22(4):382-4.
- Partyal, A., Rathore, R.S., Mohan, H.V., Dhama, V., Kumar, A.,** 2011. Prevalence of *Arcobacter* spp. in humans, animals and food of animal origin, including seafood from India.
- Pascual, M^a. R.** 1989. Microbiología alimentaria: detección de bacterias con significado higiénico-sanitario.
- Pascual, M^a. R.; Calderón, V.** 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. Ediciones Díaz de Santos.
- Poyle. M.; Beuchat. L., Montville. T.,** Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras. 1997. Editorial ACRIBIA, S.A.
- Pubmed.** <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22401779>. (Visto el día 10 de junio del 2014).
- Puig, Y.; Espinosa, M.; Leyva, V.; Kely, T.; Zagovalos.; Méndez, D.; Soto, P.; Ferrer, Y.** 2007. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. De origen clínico y alimentario. 9 (3): 12- 16.
- Quiñones, E., Vázquez, C., Pedroche, F., Moreno, L. and Rodas, O.R.,** 2000. Presence of the genera *Vibrio* and *Salmonella*, and fecal coliform detection in the Gulf of Mexico clams.
- Rantsiou, K., Lamberti, C., Cocolin, L.** 2010. Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. Int J Food Microbiol 141, 575-579
- Romero, J., González, N, and R.T. Espero.** 2002. Marine *Pseudoalteromonas* sp. composes most of the bacterial population developed in oysters spoiled during storage. J. Food Sci. 67: 2300-2303.
- Saiki, R. K.; Scharf, S.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A.; Higuchi, R.; Gelfand, D. H. and Staffel, S.** 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermoestable DNA polymerase, Science 239: 487-491.
- Schmidt, U., Seeliger, H., Glenn, E., Langer, B. and Leistner, L.** 1988. Listerienfunde in rohen Fleischerzeugnissen. Fleischwirtsch. 68:1313-1316.
- Seeliger, H. P.R.** 1961. Listeriosis, New York: Hafner.
- Silverman, G., Nickerson J.T., Ducan, D., Davis, J., Schachter, J., and Joselow, M.** 1961. Microbial analysis of frozen raw and cooked shrimp. I. General results. Food technol. 15:455-458.
- Stone, G. G.; Oberts, R. B.; Hays, M. O.; McVey, S. and Chengappa, M. M.** 1994. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation- PCR procedure. J. of Clin. Microbiol. July, p. 1742-1749.
- Taylor, C. D., Wirsén, C. O. and Gaill, F.** 1999. Rapid microbial production of filamentous sulfur mats at hydrothermal vents. Appl Environ Microbiol 65, 2253-2255.
- Vandamme P. y De Ley, J. Proposal for a New Family, Campylobacteraceae. Int. J. System. Bacteriol.** 1991. 41: 451-455.
- Van, T., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. and Coloe, P.** 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolates for virulence genes and antibiotic resistance.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and De Ley, J.** 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. Int J Syst Bacteriol 41, 88-103.

Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, L., Vlaes, L., Van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Buitzler, J.P., Gooseens, H. 1992. Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. Nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 344-356.

Van Driessche, E.; Houf, K.; Van Hoof, J.; De Zutter, L. and Vandamme, P. 2003. Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. 229(2):243-8.

Van Driessche, E. and Houf, K. 2007. Characterization of the *Arcobacter* contamination on Belgian pork carcasses and raw retail pork. 118(1):20-6.

Waage, A. S.; Vardund, T.; Lund, V. and Kapperud, G. 1999a. Detection of low numbers of *Salmonella* in environmental water, sewage and samples by nested PCR assay, *J. Appl. Microbiol.* 87: 418-428.

Waage, A. S.; Vardund, T.; Lund, V. and Kapperud, G. 1999b. Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage and food samples by seminested PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1636-1643.

Yan, J.J., Ko, W.C., Huang, A.H., Chen, H.M., Jin, Y.T. and Wu, J.J. 2000. *Arcobacter butzleri* bacteremia in a patient with liver cirrhosis. *J Formos Med Assoc* 99, 166-169.

14. ANEJOS

14.1. PROTOCOLOS DE LOS MÉTODOS

14.1.1. AEROBIOS MESÓFILOS

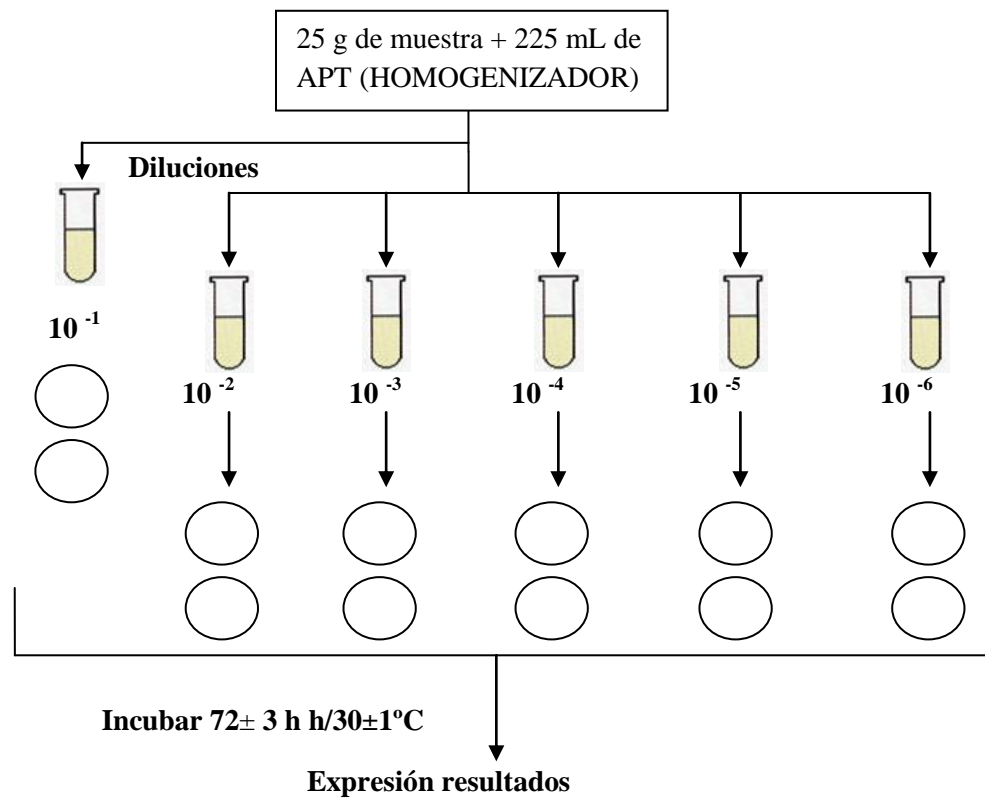


Figura 3. Esquema protocolo aerobios mesófilos

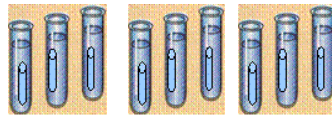
14.1.2 DETECCIÓN DE *E. COLI*

Pre-enriquecimiento:

25 g de muestra + 225 mL de APT

Enriquecimiento:

Verde brillante



(diluciones) → Incubar 37 ± 1°C/48 ± 2h

Sin gas
Negativo

Con gas
Sospechoso

Aislamiento:

Incubar 37 ± 1°C/24 ± 2h

TBX

No colonia azul
Negativo

Con colonia azul
Sospechosa

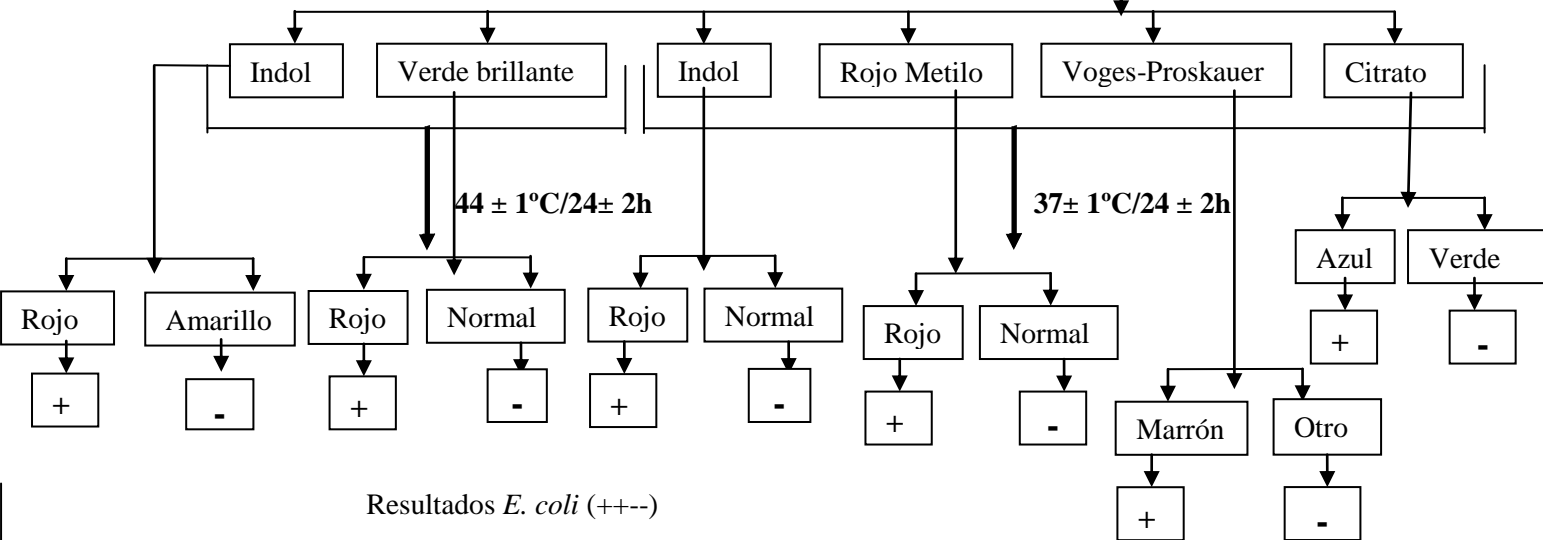
Incubar 37 ± 1°C/24 ± 2h

TBX

No colonia azul
Negativo

Con colonia azul
Prueba bioquímica IMViC

Identificación:



Resultados *E. coli* (++++)

ADN

Congelar a -80°C

Antibiogramas

Figura 4. Esquema protocolo *E. coli*

14.1.3 RECUENTO DE *LISTERIA monocytogenes*

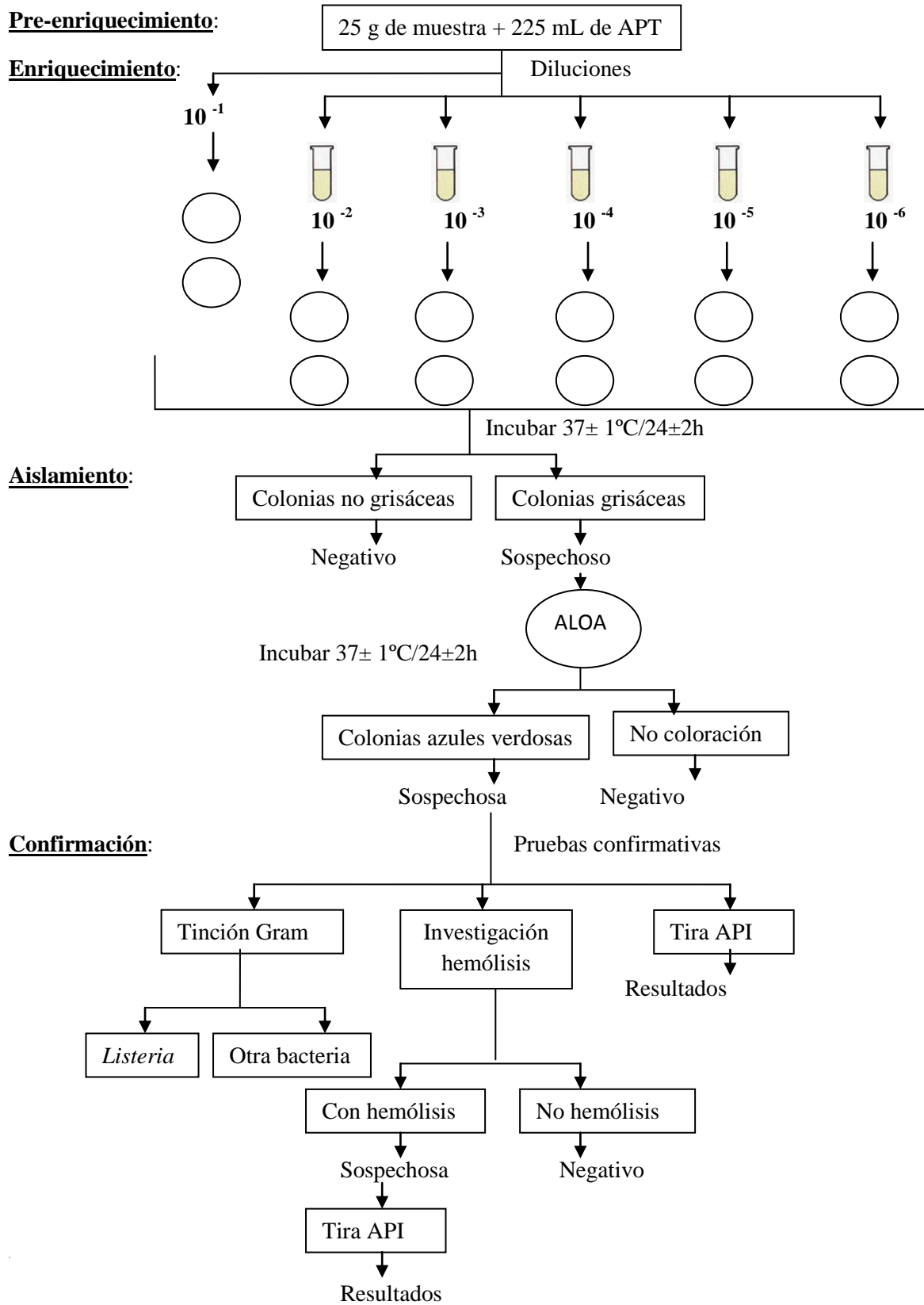


Figura 5. Esquema protocolo *L. monocytogenes*

14.1.4 DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE *SALMONELLA* MEDIANTE LA NORMA ISO 6579

Pre-enriquecimiento:

25 g de muestra + 225 mL de APT (HOMOGENIZADOR)

Enriquecimiento:

Incubar 37°C/24±2h

Tubo RVS 0'1 mL
41± 1 °C/24 h

Tubo MKTTn 1 mL
37± 1 °C/24±2 h

1'5 x 1 eppendorf

Aislamiento:

XLD

HK

1'5 x 3 eppendorf

XLD

HK

Extracción de ADN

PCR

Incubar 37± 1 °C/24±2h

Incubar 37± 1 °C/24±2h

Extracción de ADN

PCR

Colonia sospechosa

No colonia sospechosa

Colonia sospechosa

No colonia sospechosa

Colonia sospechosa

No colonia sospechosa

Colonia sospechosa

No colonia sospechosa

TSI

Negativo

TSI

Negativo

Incubar 37± 1 °C/24±2h

TSI

Negativo

TSI

Negativo

+

-

+

-

+

-

+

-

API 20·E

Identificación

API 20·E

API 20·E

API 20·E

Figura 6. Esquema protocolo *Salmonella*

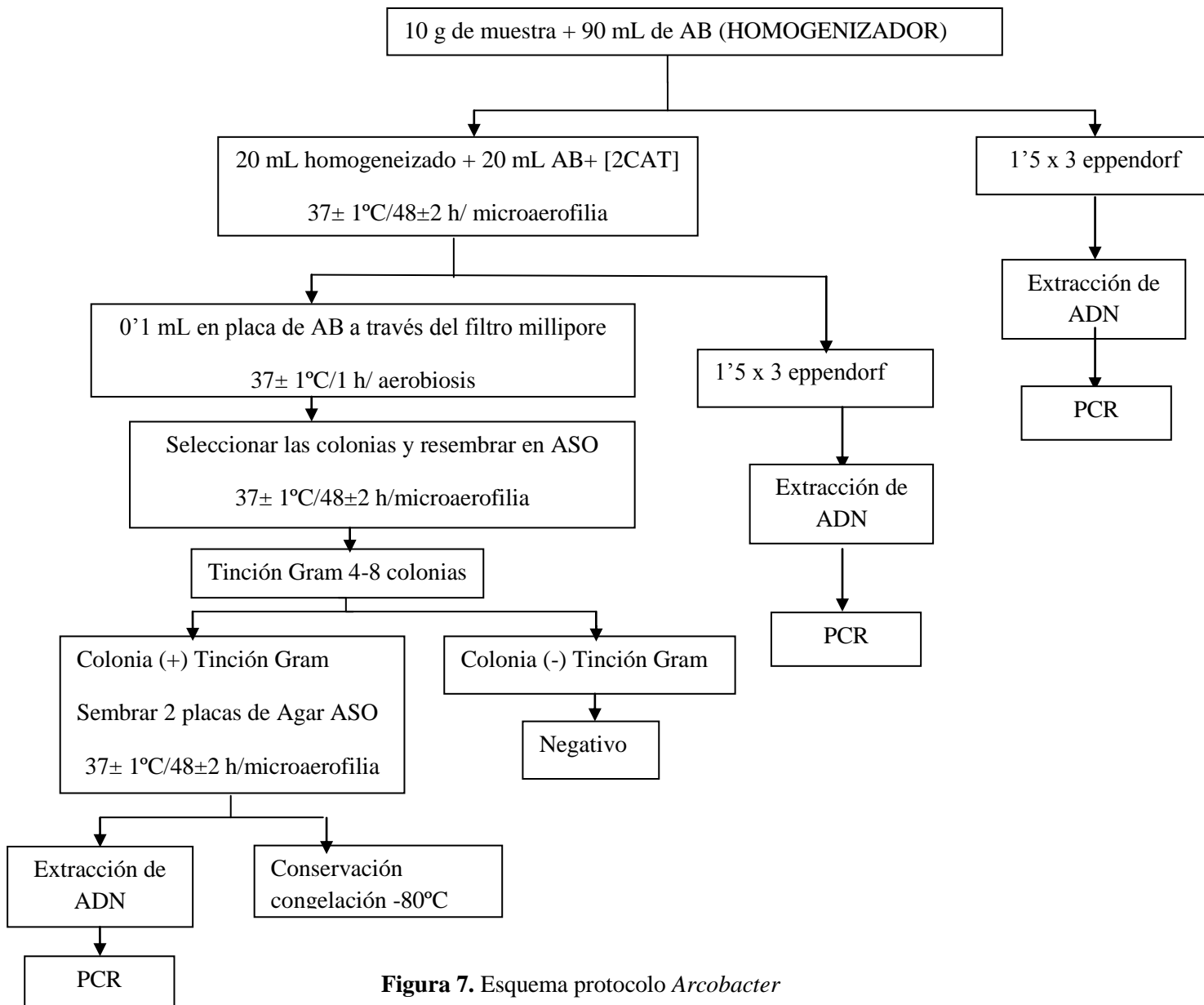
14.1.5 DETECCIÓN ARCOBACTER

Figura 7. Esquema protocolo *Arcobacter*

14.2 ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Nombre completo</u>
AB	Arcobacter Broth
AB-2	Arcobacter Broth doble concentración
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALOA	Chromogenic Listeria Agar (ISO) base
APT	Agua de peptona tamponada
ARCO	Arcobacter
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ASO	Agar sangre Oveja
Aw	Actividad de Agua
c	número de unidades de la muestra que pueden dar valores entre m y M
CAT	Cefoperazona, anfotericina-B y teicoplanina
CE	Comunidad Europea
CLSI	Clinical and laboratory Standard Institute
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
ECDC	Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades
EEUU	Estados Unidos
EFSA	European Food Safety Authority
EN	Norma Europea
et al	“y colaboradores”
Etc	Etcétera
FAO	Food and Agriculture Organization
H	Antígeno flagelares
HK	Hektoen-Entero-Agar
I	Intermedio
ICMSF	International Comision of microbiological specification for foods
IMViC	Prueba bioquímica: Indol, Rojo de metilo, Voges-Proskauer y Citrato
ISC	Instituto de Salud Carlos III
ISO	Organización Internacional de Normalización
K	Antígeno capsulares
M	valor límite del número de bacterias
m	valor umbral del número de bacterias
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MKTTn	Tetrarionate Broth base
mM	Milimolar

n	número de unidades que componen la muestra
NaCl	Cloruro de sodio
NMP	Número más probable
O	Antígeno somático
O ₂	Oxígeno
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Pares de bases
PCA	Plate Count Agar
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
R	Resistente
Rto	Reglamento
RVS	Rappaport Vassiliadis R10 broth
S	Sensible
SIM	Sistema de Información Microbiológica
TAE	Tris, acetato y EDTA
TBX	Tryptone Bile X-glucuronide
TSI	Triple Sugar Iron Agar
U	Unidades
UE	Unión Europea
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNE	Una norma Española
UV	Ultravioleta
V	Voltios
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
VTEC / STEC	Verocitotoxina
XLD	Agar xilosa-lisina-desoxicolato
%	Porcentaje en base 100
μ	Micra
μM	Micromolar

14.3 ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Criterios de seguridad alimentaria aplicables a moluscos bivalvos vivos.
- Tabla 2.** Tipos de *E. coli* patógenos
- Tabla 3.** Taxonomía Género *Listeria*
- Tabla 4.** Obtención de especies en alimentos
- Tabla 5.** Género *Salmonella*
- Tabla 6.** Género *Arcobacter*
- Tabla 7.** Principales antibióticos y su clasificación
- Tabla 8.** Alimento, fecha y procedencia de las diferentes muestras
- Tabla 9.** Antibióticos y diámetro de halo de inhibición (mm)
- Tabla 10.** Condiciones utilizadas en la PCR de *Salmonella*
- Tabla 11.** Proceso de amplificación en la PCR de *Salmonella*
- Tabla 12.** Condiciones utilizadas en la PCR de *Arcobacter*
- Tabla 13.** Proceso de amplificación en la PCR de *Arcobacter*
- Tabla 14.** Recuentos de mesófilos aerobios en muestras de moluscos bivalvos vivos
- Tabla 15.** Recuento de cultivo de *Listeria monocytogenes*
- Tabla 16.** Recuento de coliformes totales mediante el NMP
- Tabla 17.** Detección e identificación de *E. coli*
- Tabla 18.** Resultados sensibilidad a antibióticos del aislado de la muestra 2
- Tabla 19.** Resultados detección e identificación de *Salmonella* mediante la norma ISO 6579
- Tabla 20.** Resultados muestras *Arcobacter*
- Tabla 21.** Resultados aislados *Arcobacter*
- Tabla 22.** Resultados obtenido por PCR de las muestras

14.4ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Proporción de Aminoglucósidos resistentes a *E. coli* en la UE en 2012
- Figura 2.** Proporción de fluoroquinolonas resistentes a *E. coli* en la UE en 2012
- Figura 3.** Esquema protocolo aerobios mesófilos
- Figura 4.** Esquema protocolo *E. coli*
- Figura 5.** Esquema protocolo *L. monocytogenes*
- Figura 6.** Esquema protocolo *Salmonella*
- Figura 7.** Esquema protocolo *Arcobacter*
- Figura 8.** Tinción Gram.
- Figura 9.** Resultado Tira API LISTERIA de la muestra 1.
- Figura 11.** Detección directa de Salmonella por PCR tras 24 y 48 horas de enriquecimiento.
- Figura 12.** Resultados aislados por PCR de *Arcobacter*.
- Figura 13.** Identificación de *Arcobacter* por PCR.