

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



IDENTIFICACION DEL *Vibrio parahaemolyticus* en *Anadara tuberculosa*
(CONCHA PELUDA) COMERCIALIZADO EN EL MUELLE DEL PUERTO DE
LA LIBERTAD

TRABAJO DE GRADUACION
PRESENTADO POR

DEBORA MARIA SANCHEZ DE MILIAN
DENIS FRANCISCO AVALOS PLATERO

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

ABRIL 2021

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

INGENIERO. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCIÓN DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

**ASESORA DE AREA EN CONTROL DE CALIDAD DE PRODUCTOS
FARMACEUTICOS Y COSMETICOS**

Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez

ASESORA DE AREA EN MICROBIOLOGIA

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

DOCENTE ASESOR

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

AGRADECIMIENTOS

A **Dios** todo poderoso por brindarnos Inteligencia, entendimiento y discernimiento para lograr nuestros objetivos y darnos la valentía, perseverancia y fuerza para poder enfrentar cada obstáculo y dificultad que se presentó a lo largo de nuestra carrera.

A **Nuestros padres y hermanos**, por acompañarnos en los momentos más difíciles, dándonos ánimo, consejos y apoyo a lo largo de toda nuestra formación académica y enseñarnos que todo lo que se desea, con esfuerzo se puede lograr.

Al **Tribunal Calificador**: Directora General de Procesos de Graduación, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez, Asesoras de área: Dra. Tania Cuadra y Licda. Zenia Ivonne Arévalo de Márquez, por orientarnos a lo largo de la realización de este trabajo de Graduación.

A nuestra **docente asesora** MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz, por brindarnos su tiempo y conocimientos, por ser una guía y ejemplo de profesionalismo.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y su personal**, por su colaboración y apoyo durante el desarrollo de la parte experimental de este trabajo de graduación.

A nuestros esposos **Saraí de Avalos** y **Henry Milian** por brindarnos su apoyo y comprensión en los momentos de desánimo y siempre tener palabras de aliento que nos animaban a desarrollar este trabajo de graduación.

Agradecemos a la **Universidad de El Salvador**, por habernos abierto las puertas de este prestigioso templo del saber, cuna de buenos profesionales.

Denis y Débora

DEDICATORIA

En primer lugar, este logro es para gloria de mi Padre **Dios**, que me lleno de inteligencia, discernimiento, fortaleza, salud y amor a lo largo de toda mi formación profesional y mi Santa Madre **María** por interceder por cada oración que le encomendaba y hacerme sentir acompañada hasta culminar mi carrera.

A mis Papis, **German Sánchez y Alma de Sánchez** de una manera muy especial por dar su vida entera a mi cuidado, por siempre transmitirme la Fe Cristiana, por desvelarse muchas veces conmigo, por limpiar mis lágrimas cuando me quería dar por vencida y animarme hasta llegar a este punto.

A mi amado Esposo **Henry Milian**, cada logro alcanzado por mí, contribuya a cumplir las metas que como pareja queremos lograr, Dios nos conceda llegar a la ancianidad juntos y orgullosos.

A mis bebés **Valentín (QDDG) y Lucas**, para que mi ejemplo sea motivo para que crezcas siendo un buen cristiano y hombre para nuestra sociedad.

A mis Tíos **Ada Luz Rivas, Morena de García y Rene García** por apoyar y respetar cada una de mis decisiones a lo largo de mi formación profesional y personal.

A mis hermanos menores **Emmanuel y German Sánchez** por apoyarme y ser uno de los motivos que me impulsaron a culminar mi educación superior.

A mis Madrinas **Ligia Rodríguez, Ligia de Guidos y Graciela de Rodríguez** por acompañarme en mis buenos y malos momentos y por brindarme su cariño.

A mis Suegros **Bernabé Torres y Alfonso Milian** por su cariño y apoyo a lo largo de mi carrera.

A mi compañero de tesis y amigo **Denis Avalos** por su paciencia en el desarrollo de nuestra tesis, por su valiosa amistad mostrándonos apoyo en diversos momentos de nuestras vidas.

Débora María Sánchez de Milian

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a **Dios padre, al hijo y al Espíritu Santo** que han estado junto a mi durante toda mi vida y durante todo este proceso de graduación, dándome sabiduría, salud y fortaleza durante todos esos momentos difíciles, gracias a Dios puedo culminar con éxito esta etapa de la vida.

Le doy gracias a mis padres **Fidelina Platero y Demetrio Raymundo Avalos Vela** por estar siempre a mi lado apoyándome y guiándome por el mejor camino, por todos sus consejos, por su amor incondicional como padres, por todo el trabajo duro que han hecho y todos los sacrificios que han realizado con amor y esperanza para que el día de hoy culmine con éxito este proceso de estudio.

Bendigo la vida de mi amada esposa **Marina Saraí Romero de Avalos** que siempre ha estado apoyándome, aconsejándome y brindándome todo su amor, cariño y paciencia durante todos estos años de investigación.

A mi compañera de tesis **Débora María Sánchez de Milian** con quien hemos vivido tantas experiencias en el trayecto de nuestra carrera, por su paciencia en el desarrollo de nuestra tesis y por su valiosa amistad durante todos estos años.

Denis Francisco Avalos Platero

ÍNDICE

RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCIÓN	xx
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVO GENERAL	
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
CAPITULO III	
3.0. MARCO TEORICO	25
3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos	25
3.1.1 Definición:	25
3.1.2 La Libertad.	26
3.2 ESPECIE DE ESTUDIO	26
3.2.1 Clasificación Taxonómica.	26
3.2.2 Hábitos Alimenticios.	27
3.2.3 Desarrollo tecnológico para producción controlada de concha: especie <i>Anadara tuberculosa</i>	28
3.3 Clasificación de <i>Anadara tuberculosa</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> según el RTCA 67.04.50:08.	29
3.4 Generalidades sobre <i>Vibrio sp.</i>	30
3.4.1 Factores de riesgo para la presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en <i>Anadara tuberculosa</i> .	31
3.5 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	34
3.5.1 Cuadro clínico	35
3.5.2 Mecanismos de patogénesis	36
3.5.3 Morfología Macroscópica en medio TCBS:	37
3.5.4 Morfología Microscópica:	37

3.6 Pruebas bioquímicas	38
3.6.1 Prueba de la Oxidasa:	38
3.6.2 Agar TSI (Hierro Tres Azúcares):	39
3.6.3 Prueba de movilidad:	39
3.6.4 Prueba Lisina hierro (LIA):	40
3.6.5 Prueba de Voges-Proskauer:	40
3.6.6 Crecimiento en NaCl:	41
3.6.7 Tinción de Gram:	41
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	44
4.1 TIPOS DE ESTUDIO	44
4.1.1 De campo	44
4.1.2 Transversal	44
4.1.3 Experimental	44
4.2 Investigación bibliográfica	44
4.3 Investigación de campo	45
4.4 Universo	45
4.5 Muestra	45
4.6 Tipo de muestreo	45
4.7 Tamaño de la muestra	46
4.8 Recolección de muestras.	46
4.9 Parte experimental	46
4.9.1 Material, equipo y reactivos.	46
4.9.2 Procedimiento previo a la manipulación de la muestra.	46
4.9.3 Determinación y cuantificación del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> por el método de recuento en placa.	47

4.9.4 Aislamiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en agar TSA para tinción al Gram y pruebas bioquímicas.	48
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS	53
5.1 Evaluar por medio de una guía de inspección la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento de los puestos que comercializan el molusco dentro del muelle del puerto de La Libertad.	53
5.2 Determinar la presencia o ausencia del microorganismo patógeno <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en la especie <i>Anadara tuberculosa</i> .	60
5.3 Comparar los resultados obtenidos con los valores establecidos en el RTCA 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS DEL AÑO 2009.	73
5.4 Elaborar un informe de resultados y presentarlo a la defensoría del consumidor.	76
CAPITULO VI	
6.0. CONCLUSIONES	95
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	98
BIBLIOGRAFIA	
ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		N° de pág.
1	Vista exterior e interior de <i>Anadara tuberculosa</i> mostrando los tubérculos.	27
2	Modelo conceptual FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) para el módulo de la cosecha.	32
3	Modelo conceptual FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) para el módulo de post – recolección.	33
4	Modelo conceptual FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) para el módulo de consumo.	34
5	Colonias de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en placa de TCBS	37
6	Morfología del <i>Vibrio parahaemolyticus</i> vista al microscopio electrónico (a) y al microscopio convencional (b).	38
7	Cumplimiento de prácticas higiénicas en manipuladores (1-6) y producto (7-10), resultados obtenidos durante la época lluviosa.	54
8	Cumplimiento de prácticas higiénicas en manipuladores (1-6) y producto (7-10). Resultados obtenidos durante la época seca	55
9	Procedencia del producto (Concha peluda) que se comercializan dentro del muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa y seca.	57
10	Tipo de embalaje que se utiliza para la entrega del producto (concha peluda) que se comercializa en los puestos	59

muestreados dentro del muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa y seca.

- | | | |
|----|--|----|
| 11 | Crecimiento de <i>Aeromona hydrophila</i> (colonias color naranja) en placas con agar selectivo TCBS en muestreo durante época lluviosa. | 61 |
| 12 | Resultados del Crecimiento de <i>Vibrio alginolyticus</i> (colonias color amarillo) en placas con agar selectivo TCBS, en muestreo durante época lluviosa. | 61 |
| 13 | Microorganismos identificados en muestra recolectadas en época lluviosa. | 62 |
| 14 | Resultado sobre discos de oxidasa para muestras analizadas durante la época lluviosa, se considera positiva por la coloración morada al centro del disco | 63 |
| 15 | Grafica sobre el conteo de colonias presuntivas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , tratamiento de las muestras limpias en época seca procedentes del muelle del puerto de La Libertad. | 65 |
| 16 | Grafica sobre el conteo de colonias presuntivas de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , tratamiento de muestras sin lavar en época seca del año 2020 procedentes del muelle del puerto de La Libertad. | 66 |
| 17 | Microorganismos identificados en las 17 muestra analizadas en época seca. | 68 |
| 18 | Resultado sobre discos de oxidasa para muestras analizadas durante la época seca, se considera positiva por la coloración morada al centro del disco. | 69 |
| 19 | Resultado del crecimiento de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> en placas con agar selectivo TCBS (colonias verdes azulada). | 69 |

20	Vista al microscopio (bacilo corto curvo) de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	70
21	Resultados de pruebas bioquímicas y crecimiento en NaCl indicando presencia de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .	70
22	Resultado del crecimiento del <i>Vibrio vulnificus</i> en placas con agar selectivo TCBS (colonias verdes oscuras).	70
23	Vista al microscopio (bacilos rectos cortos) de <i>Vibrio vulnificus</i>	71
24	Resultados de las pruebas bioquímicas y crecimiento en cloruro de sodio para <i>Vibrio vulnificus</i> .	71
25	Crecimiento de <i>Aeromona hydrophila</i> (colonias color naranja) en placas con agar selectivo TCBS.	71
26	Resultados de pruebas bioquímicas y crecimiento en NaCl para <i>Aeromona hydrophila</i>	72
27	Total de microorganismos identificados a lo largo de toda la investigación.	74

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		N° de pág.
1	Parámetros establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08	30
2	Condiciones límites para desarrollo patológico de <i>Vibrio sp.</i>	33
3	Parámetros de verificación de la guía de inspección.	53
4	Conteo de colonias de las muestras limpias y muestras sin limpiar en agar TCBS 35°C/24h en época lluviosa.	60
5	Identificación de microorganismos por medio de las pruebas bioquímicas para muestras lavadas y muestras sin lavar en época lluviosa.	62
6	Resultados obtenidos en el recuento de colonias para cada muestra analizada, durante la época seca.	64
7	Total de microorganismos identificados por medio de las pruebas bioquímicas para muestras lavadas y sin lavar.	68
8	Microorganismos identificados en época lluviosa y en época seca.	73

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		N° de pág.
1	Formula del agar TSI mostrando los componentes que reaccionan según el microorganismo presente.	39
2	Procedencia de <i>Anadara tuberculosa</i> en el muelle del puerto de la Libertad.	57
3	Tiempo promedio de venta de la especie <i>Anadara tuberculosa</i> en el muelle del puerto de La Libertad.	58
4	Tipo de embalaje utilizado para entrega del producto.	59

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Imagen satelital y croquis de ubicación de los establecimientos muestreados
- 2 Boletín epidemiológico 2018 - 2019 y enfermedades diarreicas en El Salvador por departamento año 2019.
- 3 Formato de la guía de inspección para verificar la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento de los puestos que comercializan el molusco y etiqueta de identificación para muestras.
- 4 Procedimientos previos a la manipulación de la muestra.
- 5 Descripción de materiales, equipo, reactivos y medios de cultivos utilizados en el laboratorio.
- 6 Determinación y cuantificación de *Vibrio parahaemolyticus* por el método de recuento en placa y aislamiento en agar TSA.
- 7 Tinción al Gram y pruebas bioquímicas para identificación de *Vibrio parahaemolyticus*, con sus respectivas interpretaciones.
- 8 Cuadro comparativo de microorganismos considerados en la investigación.
- 9 Identificación de microorganismos por medio de las pruebas bioquímicas para época lluviosa y época seca
- 10 Resultados obtenidos de los análisis microbiológicos realizados durante la época lluviosa.

- 11 Procedencia de las muestras de bivalvo *Anadara tuberculosa* (concha peluda) recolectadas en el muelle del puerto de la libertad.
- 12 Carta del informe de resultados con firma y sello de recibido presentado a la defensoría del consumidor

ABREVIATURAS

CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador
L	Lavadas
LIA	Lisina Hierro Agar
MOV	Movilidad
Mx	Muestras
NaCl	Cloruro de sodio
OXI	Oxidasa
RTCA	Reglamento Técnico Centroamericano
SL	Sin Lavar
TCBS	Agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa
TSA	Agar de Trypticase Soya
TSI	Agar Hierro Triple Azúcar
VP	Voges Proskauer

RESUMEN

Se investigó la presencia o ausencia del *Vibrio parahaemolyticus* en la especie bivalva *Anadara tuberculosa* (concha peluda) durante la época lluviosa y época seca (julio del año 2019 a marzo 2020), las muestras de *Anadara tuberculosa* fueron recolectadas en los establecimientos del muelle del puerto de La Libertad que comercializan la especie de interés.

Como parte de la investigación se desarrolló una guía de inspección para verificar la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento. Las muestras se dividieron en dos tratamientos: conchas lavadas y conchas sin lavar, ambos tratamientos se analizaron microbiológicamente en el laboratorio de alimentos de CENSALUD, esto con la finalidad de tener un parámetro de comparación en cuanto al recuento e identificación de microorganismos para verificar si la limpieza es un factor crítico a la hora de los análisis.

Se utilizó el método de recuento en placa en agar TCBS y aislamiento en agar TSA para tinción al Gram y pruebas bioquímicas, como resultado, en los análisis microbiológicos se logró aislar al *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio alginolyticus*, juntamente se aisló la especie *Aeromona hydrophila*. El *Vibrio parahaemolyticus* no es predominante en la especie *Anadara tuberculosa* ya que solo se pudo aislar en 6 muestras en época seca, obteniendo recuentos superiores a 10^5 UFC/mL, incumpliendo el límite máximo establecido por el RTCA 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS del año 2009.

En conclusión, se considera que este microorganismo está sujeto a los cambios climáticos y se confirma que es autóctono de lugares como los esteros, bahías y manglares, cuyas condiciones de proliferación son específicas.

Se recomienda de manera general realizar buenas prácticas de higiene antes y durante la manipulación del alimento, siempre llevando a cabo un proceso de limpieza sobre las valvas de la concha con abundante agua y con ayuda de un cepillo. También es recomendable invertir en proyectos de acuicultura para garantizar condiciones sanitarias del producto *Anadara tuberculosa* durante todas las etapas de crecimiento hasta su comercialización.

CAPITULO I
INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

El género *Vibrio* comprende 75 especies, de ellas 12 son consideradas patógenas para el ser humano, el *Vibrio parahaemolyticus* es asociado con enfermedades gastrointestinales como gastroenteritis aguda, frecuentemente asociada por el consumo de pescado, moluscos y crustáceos crudos o insuficientemente cocidos; Causando vómito, fiebres y cuadros de diarrea aguda eventualmente de tipo disentérico, en ocasiones bastante severos y con desenlaces fatales.

Se han demostrado casos de gastroenteritis reemergentes en diferentes partes del mundo incluyendo nuestro país, El Salvador, esto vinculado a la ingesta de mariscos crudos, sin embargo, según los datos reportados en el boletín epidemiológico del Ministerio de Salud y la Dirección de Vigilancia Sanitaria de la República de El Salvador, en el país no existe un diagnóstico real sobre el agente etiológico causante de las enfermedades gastrointestinales como las diarreas en general. La Libertad el segundo departamento a nivel nacional más afectado con cuadros clínicos de diarrea aguda.

En la zona costera de nuestro país es predominante el consumo de la especie *Anadara tuberculosa* (curil o concha peluda) y uno de los microorganismos que se han encontrado en este molusco es el *Vibrio parahaemolyticus*, causante de la enfermedad antes mencionada.

La presencia del *Vibrio* en la especie *Anadara tuberculosa* (variable dependiente) es influenciado cuando se alteran los parámetros hidrobiológicos normales del ecosistema marino y no se descarta que la proliferación del microorganismo se deba también a variables independientes, entre estas tenemos: la temperatura, pH y salinidad del agua, las cuales están condicionadas por las diferentes estaciones del año. Entre otros factores que pueden contribuir a la contaminación y proliferación del *Vibrio parahaemolyticus* en la especie *Anadara tuberculosa* podemos mencionar las siguientes: frescura del producto, prácticas higiénicas con las que se recolecta y se comercializa el producto, la temperatura de almacenamiento por parte del comerciante y el consumidor.

Considerando lo antes mencionado para la elaboración de la parte experimental de esta investigación se realizó un muestreo dirigido y puntual, tanto en época

lluviosa como en época seca, se tomaron un total de 34 muestras durante la investigación en los establecimientos que comercializaban *Anadara tuberculosa*, se transportaron en una hielera y se llevó al laboratorio donde se dividieron en 2 tratamientos: conchas lavadas y conchas sin lavar y posteriormente se analizaron microbiológicamente.

Se realizó el análisis microbiológico aplicando la técnica de siembra por estriado en placa con agar TCBS y confirmando la presencia del microorganismo mediante las pruebas bioquímicas, los análisis se desarrollaron en el Laboratorio de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador (CENSALUD), en el periodo comprendido desde julio del 2019 a marzo del 2020.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar el *Vibrio parahaemolyticus* en *Anadara tuberculosa* (concha peluda) comercializado en el muelle del puerto de La Libertad.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Evaluar por medio de una guía de inspección la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento de los puestos que comercializan el molusco dentro del muelle del puerto de La Libertad.
- 2.2.2 Determinar la presencia o ausencia del microorganismo patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en la especie *Anadara tuberculosa*.
- 2.2.3 Comparar los resultados obtenidos con los valores establecidos en el RTCA 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS del año 2009.
- 2.2.4 Elaborar un informe de resultados y presentarlos a la Defensoría del Consumidor.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0. MARCO TEORICO

3.1 Enfermedades transmitidas por alimentos

3.1.1 Definición:

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades transmitidas por alimentos se definen como «El conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (bacterias o parásitos) o no biológicos (plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica, a nivel individual o de grupo de personas». ⁽¹⁷⁾

En El Salvador no existe un diagnóstico real sobre el agente etiológico productor de las enfermedades gastrointestinales, como las diarreas, que pueden ser provocadas por el consumo de alimentos contaminados. ⁽¹⁴⁾

Esta inferencia tiene como base el boletín epidemiológico de la Dirección de Vigilancia Sanitaria, del Ministerio de Salud de nuestro país, pues en él, solo se brindan los datos finales de casos por diarreas agudas y gastroenteritis, sin ahondar y brindar un reporte más extenso sobre las causales de estas enfermedades. Ver anexo N°2

Por tanto, bajo el entendido de que el *Vibrio parahaemolyticus* es un microorganismo patógeno causante de gastroenteritis, es de nuestro interés determinar si el molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* en estudio es portador de esta especie de *Vibrio* y consecuentemente una fuente de contaminación alimentaria, pues en nuestro país es común el consumo de alimentos elaborados con ostras, curiles y curilias, especialmente sin ningún proceso de cocción.

Esta especie de bivalvo se encuentra ampliamente distribuidas en la costa salvadoreña, pero especialmente en el puerto de La Libertad, la Bahía de Jiquilisco y el puerto de La Unión. Según el reporte estadístico publicado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), por intermedio del Centro de Desarrollo de la Pesca y la Acuicultura (CENDEPESCA), se establecen en el país cuatro zonas de extracción y de comercialización de bivalvos, entre estas tenemos la de mayor representatividad, delimitada como la zona 7: puerto de La Libertad, debido a su alta influencia comercial y como receptora de productos bivalvos provenientes de la Bahía de Jiquilisco y el puerto de La Unión. ⁽²⁶⁾

3.1.2 La Libertad.

La zona costera del Departamento de La Libertad posee características propias. Esta zona presenta muchas áreas pedregosas que la hacen propicia para la producción natural de bivalvos, siendo uno de los lugares con actividad extractiva de este molusco en el país, presentándose esta actividad como un rubro económico del cual dependen directa o indirectamente muchas familias lugareñas. El puerto de La Libertad es un lugar turístico para nacionales y extranjeros, especialmente surfistas. ⁽²⁶⁾ Ver anexo N° 1

3.2 ESPECIE DE ESTUDIO: *Anadara tuberculosa*.

3.2.1 Clasificación Taxonómica.

Según Camacho (1999) y Sanclement (2008), la especie *Anadara tuberculosa* se clasifica de la siguiente manera:

- **Reino:** Animalia
- **Phylum:** Mollusca
- **Clase:** Bivalvia
- **Orden:** Arcoida
- **Familia:** Arcidae
- **Nombre científico:** *Anadara tuberculosa*.
- **Nombres comunes:** “piangua” (Costa Rica); “concha negra” (Nicaragua); “Curil, concha negra” (El Salvador); “chucheca” (Panamá); “concha prieta” (Ecuador).

Es la especie de moluscos más conocida y consumida en El Salvador, su concha es equivalva e inequilateral; su contorno es ovalado, con alargamiento moderado, su color es blanco, cubierto por un periostraco piloso que va desde café oscuro hasta negro.

Puede llegar a alcanzar una talla máxima de crecimiento de 8 cm, pero su crecimiento común es hasta los 6 cm, cuenta con un número de 33 a 37 costillas radiales con forma redondeada, los nódulos se encuentran dispersos hacia el margen antero-ventral de la valva, estos nódulos o tubérculos de las costillas son la razón del nombre de la especie.

Según Sanclement (2008), la concha se encuentra formada por 3 capas: la exterior constituida por quitina, una capa intermedia de calcita y una interior laminada. Poseen dos lóbulos de tejido llamada manto, cuya función es segregar

la concha, formando una espaciosa cavidad en torno al cuerpo, sus células precipitan el CaCO_3 (Carbonato de Calcio) de la sangre para hacer crecer la concha. (26)

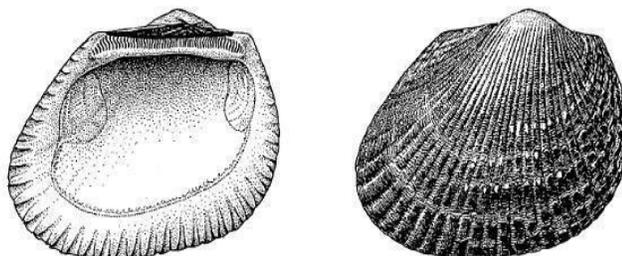


Figura N°1. Vista exterior e interior de *Anadara tuberculosa* mostrando los tubérculos.

Es esencialmente habitante de sustrato suave, se puede encontrar también en sustratos de fango arenoso, pero las densidades de población más altas se encuentran en los lodos blandos intermareales que bordean los bosques de manglar, generalmente asociada a las raíces de *Rhizophora mangle* y *Laguncularia racemosa*; esto es debido a una mayor penetración de agua y oxígeno, disponibilidad de nutrimentos o por ser un buen sustrato para la fijación de etapas tempranas de desarrollo de este bivalvo. La alimentación de la mayoría de los moluscos es esencialmente por filtración de partículas y microorganismos.

En cuanto a la distribución de este organismo el factor más importante es la salinidad, a salinidades altas favorecen el proceso de crecimiento y reproducción y a baja salinidad hay un crecimiento lento. *Anadara tuberculosa* alcanza una longitud promedio de 20 mm durante el primer año de vida, crecimiento que se reduce a un 50% durante el segundo año, iniciando la madurez sexual entre los 23.2-26.2 mm de longitud y alcanzando su tamaño comercial después de 18-24 meses. Con este rápido crecimiento, esta especie puede ser un recurso renovable comercial, pues produce gran cantidad de biomasa en corto tiempo.

3.2.2 Hábitos Alimenticios.

La mayoría de los moluscos entre ellos los géneros de la familia *Arcidae*, se alimentan de pequeños organismos planctónicos y de partículas en suspensión. Las partículas alimenticias, que en algunos casos miden menos de 1 μm , son filtradas de las corrientes de agua que pasan entre filamentos.

Anadara tuberculosa, en su mayoría se alimenta por filtración de organismos, en donde absorbe agua por la boca, retiene el alimento como un cedazo, y luego expulsa el agua; por esta razón se alimenta principalmente de diatomeas bentónicas, detritus y también pueden ingerir algunos organismos zooplanctónicos.

Cuando sube la marea y el lodo del manglar se inunda, la concha abre las valvas y empieza a comer. Al bajar la marea cierra las valvas y espera cuando el agua alcanza nuevamente su nivel más alto para volver a comer.

Anadara tuberculosa posee la capacidad de filtrar hasta 50 litros de agua por día y su periodo de crecimiento hasta alcanzar la talla comercial oscila de dos a más años. ⁽²⁶⁾

3.2.3 Desarrollo tecnológico para producción controlada de concha: especie *Anadara tuberculosa*

En el marco del Proyecto para el Desarrollo de la Acuicultura de Moluscos en la República de El Salvador, se realizaron varios Proyectos Modelos sobre cultivo de moluscos y otras actividades económicas en las comunidades de la Bahía de Jiquilisco, Departamento de Usulután y también en la zona costera del Departamento de La Unión.

Dentro de dichos Proyectos el experto de JICA Satoshi Chikami y su equipo indican que el propósito es proponer un modelo de mejoramiento en el área económica de los pescadores artesanales principalmente por la introducción del cultivo de moluscos basados en el uso sostenible de los recursos naturales y el engorde natural de la concha.

El proyecto propuesto por JICA y CENDEPESCA es bastante artesanal: Para el cultivo de curil se utiliza las semillas del medio natural, que se obtienen de la faena diaria con los individuos que no alcanzan talla comercial, La talla promedio de la semilla para el cultivo es de alrededor de 3.3 cm, las cuales se colocan en el vivero en el bosque de manglar, en parcelas de crecimiento controladas. Se dejan crecer naturalmente por un año hasta la talla de 4.5 cm. o más. Entre las ventajas que tiene el cultivo de curil es que no hay necesidad de alimentar los curiles ni fertilizar el agua / suelo. Es decir, no se necesita ninguna intervención durante el tiempo de engorde. ⁽⁴⁾

Por medio de la ejecución de El Proyecto se detectaron algunos inconvenientes como: la situación actual del recurso es decreciente, el tamaño es pequeño para la especie, los lugares de extracción son cada vez más lejos de las comunidades y se necesita más tiempo hoy que antes para extraer determinada cantidad, por lo que se determinó necesario desarrollar la tecnología de acuicultura de moluscos requiriendo la producción artificial de semillas estable en el laboratorio.

(4)

Por otra parte, se han encontrado recientes notificaciones aseverando que el uso indiscriminado de antibióticos en la acuicultura ha causado que las conchas se encuentren más expuestas a contaminarse con microorganismos como *Vibrio parahaemolyticus*. Se encontró que la bacteria era frecuente entre las ostras (48,8- 100%), mejillones (34-68,1%), abrazaderas (63,9-100%), berberechos (7,5-62%), vieiras (55-60%), camarones (7,1-57,8%), cangrejos (20%), peces (2,9-45,1%).

Vibrio parahaemolyticus generalmente se concentra, multiplica y adhiere en el intestino de los mariscos y moluscos que se alimentan por filtración como almejas, ostras y mejillones. Por tanto, se recomienda el monitoreo continuo del ambiente en acuicultura para detectar la presencia de este patógeno.

3.3 Clasificación de *Anadara tuberculosa* y *Vibrio parahaemolyticus* según el RTCA 67.04.50:08.

El molusco bivalvo *Anadara tuberculosa* se clasifica como un alimento de riesgo tipo A (que comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una alta probabilidad de causar daño a la salud.) delimitado dentro del grupo alimenticio 9.0 del RTCA (Grupo de Alimento: Pescado, derivados y productos marinos).

Para los moluscos bivalvos se identifica específicamente *el Vibrio parahaemolyticus*, clasificado dentro de la categoría 8, indicado en parámetros microbiológicos considerados patógenos, estableciendo un límite máximo permitido de 10^3 UFC/g. Según lo establecido por el RTCA 67.04.50:08. ⁽²⁵⁾

Tabla N°1: Parámetros establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08

9.0 Grupo de Alimento: Pescado, derivados y productos marinos. Esta amplia categoría se subdivide en categorías para el pescado fresco y para diversos productos marinos elaborados. Se incluyen en ella los vertebrados acuáticos y mamíferos acuáticos (p.ej., ballenas), los invertebrados acuáticos (p.ej., medusas), los moluscos (p.ej., almejas y caracoles), los crustáceos (p.ej., camarones, cangrejos y langostas). Los productos marinos se pueden recubrir, p.ej., con glaseados o especias, antes de su comercialización para el consumo (p.ej., filetes de pescado congelados y glaseados). En el SCA esto se indica con una anotación relativa al “uso como glaseado o recubrimiento (tratamiento de superficie)”			
9.1 Subgrupo de alimentos: Pescado y productos marinos frescos, congelados, incluidos moluscos, crustáceos y equinodermos empacados.			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite Máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	4	A	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i> (solo para pescados)	7		10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i> /25 g	10		Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g (solo para producto crudo listo para consumo ejemplo, sushi y ceviche)	10		Ausencia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (solo para moluscos bivalvos)	8		10 ³ UFC/g

3.4 Generalidades sobre *Vibrio sp.* ^{(24), (11)}

Es un microorganismo Gram negativo y pertenece a la familia Vibrionaceae. Es un bacilo anaerobio facultativo que puede ser identificado por su aspecto al microscopio (bacilos curvados).

Es de naturaleza halófila y su temperatura óptima de crecimiento es 37°C. Positivos a la prueba de oxidasa, característica principal que distingue a la familia Vibrionaceae de la Enterobacteriáceas

Las especies de *Vibrio sp* se inactivan con el frío, la desecación y las altas temperaturas de la cocción. Probablemente éste es el microorganismo mejor descrito, en cuanto a su transmisión alimentaria, dentro del género *Vibrio*. Los brotes tienen lugar tras el consumo de pescado o productos de la pesca crudos o insuficientemente cocinados.

La literatura ha evidenciado que los bivalvos pueden ser vectores de bacterias y virus entérico, debido al modo de alimentación que poseen. Anualmente se

reportan miles de casos de vibriosis alrededor del mundo incluyendo países como la India, Bangladesh, Japón, Taiwán, Sudamérica, los Estados Unidos y El Salvador donde el origen de la enfermedad se ha relacionado al consumo de ostiones crudos.

Las especies microbianas del género *Vibrio* son bacterias propias del agua y especialmente de ambientes marinos. En los estuarios, donde hay una mezcla de agua marina con agua dulce y dónde las condiciones de salinidad, temperatura, movimiento del agua y otros factores, son más homogéneos, pueden incluso ser los microorganismos predominantes. Su alta presencia determina que los alimentos más frecuentemente contaminados sean los productos de la pesca.

Las cepas patógenas poseen un factor tóxico que generalmente se presenta 10-18 horas después de ingerir el alimento contaminado. Inicialmente el *Vibrio* se asoció única y exclusivamente al cólera, enfermedad todavía endémica en muchos países en desarrollo.

Entre las diferentes especies, *Vibrio cholerae* y *Vibrio parahaemolyticus* son los que más frecuentemente se encuentran implicadas en brotes de intoxicaciones alimentarias, especialmente en donde las condiciones de desarrollo sean favorables.

3.4.1 Factores de riesgo para la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en *Anadara tuberculosa*.

Los productos marinos son altamente perecederos ya que fácilmente se contaminan con microorganismos patógenos, como los moluscos bivalvos, y debido a que filtran grandes cantidades de agua, bioacumulan sustancias tóxicas y microorganismos presentes en su entorno, como *Vibrio parahaemolyticus*, cuya incidencia sigue constituyendo uno de los problemas de salud pública a nivel mundial debido al creciente consumo de mariscos y pescados crudos, mal cocidos y contaminados. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) encargó una evaluación cuantitativa de riesgos acerca de las consecuencias para la salud pública de la presencia *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos crudos" (FDA-VPRA), uno de cuyos resultados fue la elaboración de un modelo de riesgo.

Un componente fundamental del modelo era la temperatura del agua. Dado que las temperaturas altas del agua son un factor pertinente en varios países con importantes industrias ostrícolas. (7) El modelo FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) incluye todas las fases de la cadena: cosecha, post-recolección y consumo, clasificándolo en módulos. (7)

Para el módulo de la cosecha: La temperatura del agua es el factor principal que determina el número inicial de *Vibrio parahaemolyticus* en las ostras.

Las variaciones de temperatura en las diferentes zonas y estaciones del año permiten que se realice un análisis plurianual, que puede representar las variaciones de temperatura a largo plazo.

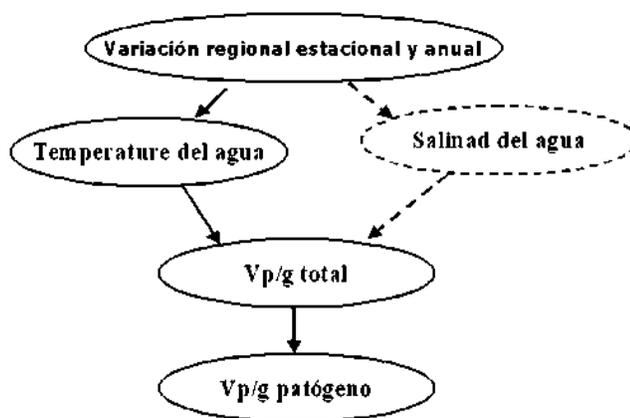


Figura N°2: Modelo conceptual FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) para el módulo de la cosecha. (7)

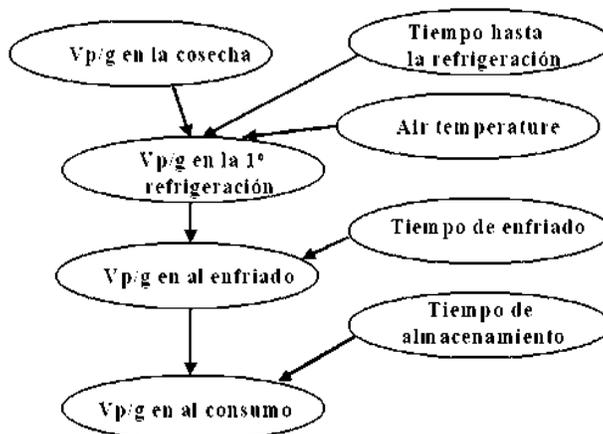
La salinidad del agua puede ser otro factor importante. Alcanzando generalmente mayores densidades de *Vibrio parahaemolyticus* en las épocas de mayor temperatura, siempre y cuando los niveles de salinidad en esas épocas sean los óptimos para su expansión demográfica, esto se logra cuando coinciden los meses más cálidos del año con épocas lluviosas, provocando un descenso de salinidad.

Aguas más templadas y menos salinas generadas por un incremento en las lluvias, proporcionará un medio ambiente más propicio para la expansión de las poblaciones de *Vibrio* en zonas costeras. (7)

Tabla N°2: Condiciones límites para desarrollo patológico de *Vibrio sp.*

Patógeno	Min Aw	Min pH	Máx pH	Min % sal	Máx % sal	Min T°	Máx T°	Requerimientos de oxígeno
<i>Vibrio cholerae</i>	0.95	3.6-6.0	9.6	0	6 -8	8°C	42-46°C	Anaerobio facultativo
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	4.8- 5.0	9.6	3	8-10	5°C	43°C	Anaerobio facultativo

El módulo post-recolección: establece el papel que juegan la elaboración y la manipulación post-recolección en la determinación del número de *Vibrio parahaemolyticus* patógenos en el consumo. La indicación "V.p/g en la recolección" es el resultado del modelo de recolección.

**Figura N°3:** Modelo conceptual FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) para el módulo de post – recolección. (7)

Los datos sobre el tiempo que permanecen las ostras fuera del agua y la temperatura del aire se utilizan para pronosticar el crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en las ostras.

El crecimiento prosigue cuando se enfrían las ostras, pero a ritmo diferente. Los niveles de *Vibrio parahaemolyticus* disminuyen durante el almacenamiento (refrigerado y la congelación) y por tanto el tiempo de almacenamiento es un factor que influye en el número de *Vibrio parahaemolyticus*, (7)

El módulo de consumo indica el resultado del módulo post-recolección denominado como gramos en el consumo. Este número se multiplica por el número de ostras por ración y el peso de las ostras para obtener la dosis ingerida. Dicha dosis ingerida se utiliza en la relación dosis-respuesta para calcular el riesgo de enfermedad asociado al consumo de una comida de ostras.

(7)

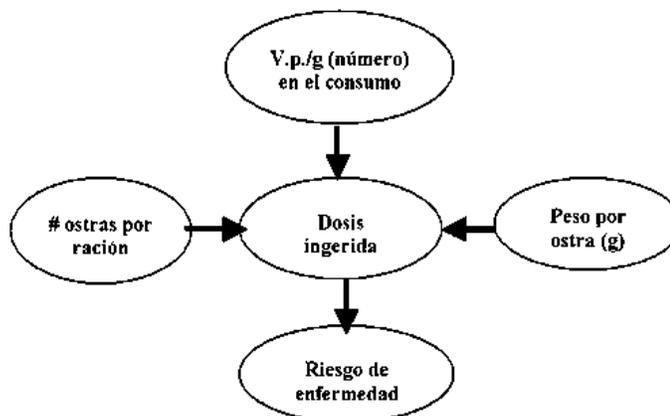


Figura N°4: Modelo conceptual FDA-VPRA (Curva Beta Poisson de dosis-respuesta) para el módulo de consumo. (7)

La especie concreta de ostras puede tener una profunda influencia en el modelo, y se necesita investigar más para ampliar la base de conocimientos sobre la ecología ostra – *Vibrio parahaemolyticus*; En general este modelo busca ser reproducible en cualquier lugar del mundo donde sea necesario determinar la incidencia de este microorganismo en la salud de una población determinada, sin que exista mayor alteración que la especie alimenticia con la que comparte una estrecha relación ecológica con el microorganismo *Vibrio parahaemolyticus*. Conociendo la finalidad de este modelo, el cual es exponer los factores de riesgo para la presencia del *Vibrio parahaemolyticus*, se estará retomando como punto de apoyo en las conclusiones de esta investigación. (11)

3.5 *Vibrio parahaemolyticus*

Es un microorganismo Gramnegativo halófilo, es autóctono para el entorno marino y un agente causante de enfermedades relacionadas con los mariscos.

Vibrio parahaemolyticus ha sido reconocido como una de las principales causas de gastroenteritis bacteriana relacionada con mariscos en todo el mundo y representa casi el 50% de todos los brotes de intoxicación alimentaria en Taiwán, Japón y el sudeste asiático.

En los Estados Unidos, *Vibrio parahaemolyticus* es la principal causa de enteritis bacteriana inducida por mariscos, típicamente relacionada con el consumo de mariscos crudos o poco cocinados. Este patógeno se identificó por primera vez en 1971 en Maryland, Estados Unidos, después de tres brotes de 425 casos de gastroenteritis en total asociado con el consumo de cangrejos cocidos incorrectamente.

Posteriormente, se han producido brotes esporádicos en toda la costa de los Estados Unidos. Según los autores del Control y Prevención de Enfermedades, se estima que la infección por *Vibrio parahaemolyticus* tiene una tasa anual de 4.500 casos por año en los Estados Unidos. ⁽²⁶⁾

Vibrio parahaemolyticus es tanto oxidativo como fermentativo y se produce naturalmente tanto en ambientes marinos como de agua dulce donde interactúa con diversos organismos marinos y estuarinos.

Se sabe que las especies de *Vibrio* se concentran en el intestino de las ostras y otros bivalvos que se alimentan por filtración, lo que aumenta el riesgo de infección para los humanos que ingieren mariscos crudos o poco cocidos.

Estudios previos llevados a cabo en la región de la bahía de Chesapeake han demostrado que *Vibrio parahaemolyticus* rara vez se aísla cuando la temperatura del agua es inferior a 15 ° C. Es una especie de la familia Vibrionaceae, causante de infecciones intestinales a través del consumo de alimentos, se encuentra principalmente en alimentos marinos, por lo que los alimentos que provienen de esta hábitat, son considerados los principales vehículos de transmisión del agente etiológico al ser humano, provocando cuadros de gastroenteritis e inclusive septicemia, se ha reportado como fuente de infecciones a los largo de las costas de todo el mundo cuando la temperatura se eleva sobre los 20°C. ⁽²⁹⁾

3.5.1 Cuadro clínico

Este microorganismo causa gastroenteritis y los síntomas que se presentan son dolor abdominal severo, náuseas, vómito, fiebre, dolor de cabeza y diarrea, la cual persiste hasta ocho días, en casos severos la diarrea es acuosa con moco y sangre, y pueden presentarse cuadros de deshidratación, hipotensión y acidosis. La dosis infectiva debe superar el límite de 10³ UFC/g, el periodo de infección es de 12-24 horas. Se han reportado casos de infecciones extraintestinales, en el ojo, oído, tracto urinario y en heridas superficiales,

además de procesos de septicemia asociado a enfermedades preexistentes como alcoholismo, enfermedad renal, vascular y diabetes. ^{(26) (6)}

3.5.2 Mecanismos de patogénesis

La toxina termoestable directa (TDH) es el factor de virulencia más importante en el mecanismo de producción de la diarrea. La TDH es una proteína con actividad hemolítica sobre una variada gama de eritrocitos (fenómeno de Kanagawa); esta toxina posee varias propiedades entre las que destacan: citotoxicidad, aumento de la permeabilidad vascular y acumulación de líquido en el asa de íleon en el modelo experimental en conejos.

El mecanismo patogénico es la alteración del flujo iónico de las células intestinales, el que desencadena una diarrea secretora.

La toxina TDH es codificada por un gran número de genes TDH, los que han sido secuenciados, evidenciándose una estrecha relación genética entre ellos 97% de similitud. Otro factor importante en la producción de diarrea es la presencia de la toxina hemolisina relacionada (TRH), que es codificada por los genes TRH, genéticamente relacionado a TDH, con 68,6% de similitud genética.

Esta toxina fue inicialmente determinada en cepas provenientes de casos de gastroenteritis que no presentaban el fenómeno hemolítico de Kanagawa. Al igual que TDH, TRH produce acumulación de líquido en el modelo experimental de asa ideal y presenta actividad citotóxica en una variedad de tejidos. Además de los anteriores, *Vibrio parahaemolyticus* requiere de otros factores para causar enfermedad, como una variedad de pili, hemaglutininas (hemaglutinina manosa sensitiva, mannose sensitive hemagglutinin-MSHA), factores de colonización y capacidad de invasión celular. En la población ambiental de *Vibrio parahaemolyticus* se han estudiado las cepas para constatar si contienen el gen TDH y/o TRH, pero han sido detectados con baja frecuencia (0.3 a 3%).

Estos resultados indican que las cepas ambientales, aisladas recientemente en Europa, las cuales pertenecen a las cepas patógenas de *Vibrio* deben ser consideradas como portadoras potenciales de genes de virulencia incluyendo aquellas encontradas en “cepas pandémicas”. Debido a su potencial patogénico, su presencia debe ser puesta bajo vigilancia ya que representan un riesgo para la salud humana. ⁽¹⁵⁾

3.5.3 Morfología Macroscópica en medio TCBS:

El medio TCBS es un medio selectivo de diferenciación para el aislamiento y cultivo de diferentes especies de *Vibrio* a partir de muestras clínicas y de otras clases.

El extracto de levadura y la peptona proporcionan el nitrógeno y las vitaminas. El citrato sódico, el tiosulfato sódico, la bilis de buey y el colato son agentes selectivos que proporcionan un pH alcalino para inhibir los organismos gram positivos y suprimir los organismos coliformes. El pH del medio se modifica para favorecer el crecimiento de especies de *Vibrio* específicas.

La alta concentración de sodio favorece el crecimiento de diferentes especies de *Vibrio* cuya mayoría es halofílica. La sacarosa es un carbohidrato fermentable, y el cloruro sódico estimula el crecimiento.

El tiosulfato sódico es una fuente de azufre y actúa con el citrato férrico como indicador para detectar la producción de ácido sulfhídrico.

El *Vibrio parahaemolyticus* crece en este agar nutritivo incubado a 35°C en atmósfera aerobia y anaerobia y no fermentan la sacarosa, el ion sodio del medio estimula su crecimiento y favorece la rapidez del mismo. En medio TCBS las colonias se observan de color verde a verdes azuladas con borde traslucido. ⁽²⁹⁾



Figura N°5: Colonias de *Vibrio parahaemolyticus* en placa de TCBS. ⁽²⁹⁾

3.5.4 Morfología Microscópica:

La mayoría de las especies de *Vibrio* tienen las siguientes características: bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, curvos, en forma de coma, miden entre 1.4 y 2.6 μm de largo, son catalasa y oxidasa positivos. Ver figura N°6.

Los *Vibrio* son móviles ya sea por un flagelo monótrico o multítricos monopoles cuando crecen en medio líquido. Todas las especies de *Vibrio* requieren de sodio para crecer, y las especies halofílicas requieren que el NaCl sea agregado al medio de cultivo, (si la fórmula comercial no lo incorpora).

Las concentraciones mínimas de NaCl para su desarrollo óptimo varían entre 0.029 y 4.1 %. El *Vibrio* fermenta la glucosa, pero rara vez produce gas, reduce nitrato a nitrito. ⁽³⁷⁾

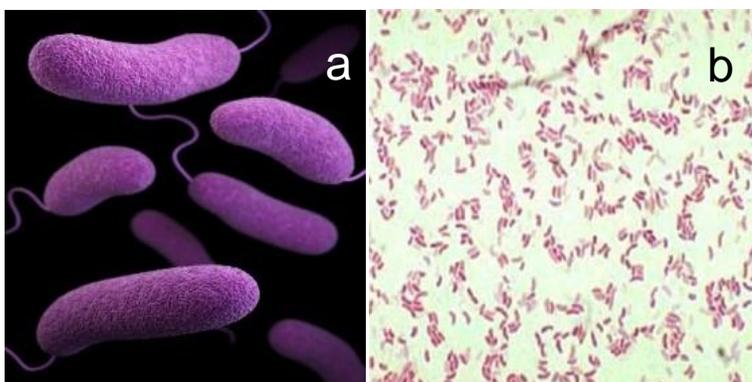


Figura N°6: Morfología del *Vibrio parahaemolyticus* vista al microscopio electrónico (a) y al microscopio convencional (b).

3.6 Pruebas bioquímicas:

Características de la especie y confirmación: ⁽²⁹⁾ El *Vibrio parahaemolyticus* es un bacilo gramnegativo, levemente curvo, aerobio facultativo, halofílico, oxidasa positiva, fermentador de glucosa, pero no de sacarosa, y ureasa variable. Requiere de medios selectivos para su desarrollo, con una concentración de NaCl de 1%. Los principios de cada prueba bioquímica utilizada en la confirmación de este microorganismo se definen a continuación:

3.6.1 Prueba de la Oxidasa:

La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo el cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

Se detecta utilizando el tetrametil-p-fenilendiamina (reactivo de oxidasa) que contiene este compuesto que va a ser oxidado por la enzima. Se prepara una solución al 1% en agua destilada. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y excepcionalmente en alguna microaerófila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. ⁽²⁹⁾

3.6.2 Agar TSI (Hierro Tres Azúcares):

El medio fue diseñado para determinar la habilidad de las bacterias de fermentar hidratos de carbono y producir sulfuro de hidrógeno (H₂S). La fórmula del medio y los cambios que pueden observarse según el comportamiento del microorganismo se muestra en el siguiente cuadro ⁽²⁹⁾:

Cuadro N°1: Formula del agar TSI mostrando los componentes que reaccionan según el microorganismo presente.

Formula (g)		Cambios que pueden observarse en el medio
Digerido pancreático de caseína	10	No interviene en cambios
Digerido péptico de tejido animal	10	No interviene en cambios
Cloruro sódico	5	No interviene en cambios
Glucosa	1	Punción / estría (color amarillo= fermenta) (rojo= no fermenta)
Lactosa	10	Estría: acida (amarilla) / Alcalina (roja) no fermenta lactosa
Sacarosa	10	
Rojo fenol	0.0025	Indicador de pH
Sulfato ferroso	0.2	Indica producción H ₂ S (ennegrecimiento del medio)
Tiosulfato sódico	0.2	No interviene en cambios
Agar	13	No interviene en cambios

3.6.3 Prueba de movilidad:

Esta prueba sirve para determinar si un organismo es móvil o inmóvil. Las bacterias tienen movilidad por medio de sus flagelos que se encuentran principalmente entre los bacilos.

En el caso de los *Vibrios* la prueba es positiva debido a que poseen un flagelo que les da movilidad. Con un asa en aguja se toca una colonia y se introduce al medio por medio de picadura, teniendo cuidado de no mover el asa al sacarla del medio para evitar una falsa lectura. Se incuba a 35° C por 18 a 24 horas. La prueba es positiva si se observa turbidez alrededor de la picadura, si es negativa no hay turbidez. ⁽²⁹⁾

3.6.4 Prueba Lisina hierro (LIA):

El Agar hierro Lisina sirve para detectar ciertas especies de *Vibrio*, las cuales, a diferencia del *Vibrio cholerae*, no descarboxilan la lisina. Los microorganismos fermentadores de glucosa acidifican el medio y provocan el viraje del color púrpura al amarillo. El ambiente ácido favorece la actividad enzimática descarboxilasa y se metaboliza la lisina a cadaverina elevando el pH del medio de cultivo y tomando un color púrpura o violeta.

Los microorganismos fermentadores de la glucosa que no tienen actividad lisina descarboxilaza, producen un viraje total del medio de cultivo formando un color amarillo. A las 24 horas de incubación se observa el fondo del tubo color amarillo y la superficie de color violeta debido al consumo de las peptonas que producen alcalinidad.

La generación de sulfuro de hidrógeno se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hidrógeno. ⁽³³⁾

3.6.5 Prueba de Voges-Proskauer:

El piruvato es un intermediario en el metabolismo de la glucosa. A partir del ácido pirúvico un microorganismo puede seguir varios caminos. Algunos lo rompen para formar como productos finales ácidos láctico, acético o fórmico. Otros metabolizan el piruvato por el camino del butilenglicol para formar como productos finales acetoína (acetilmetilcarbinol) y 2,3-butanodiol (diacetilo). El ensayo de Voges Proskauer (VP) detecta estos productos metabólicos. En presencia de oxígeno y KOH, la acetoína se oxida a diacetilo, que da un complejo rojo. La sensibilidad del ensayo se aumenta por el agregado de α -naftol antes del agregado de KOH.

El primer reactivo agregado a una alícuota incubada es el catalizador alfa-naftol debido a que actúa como un intensificador del color, lo que incrementa la

sensibilidad de la reacción sin pérdida de la especificidad. El alfa-naftol se combina con el producto de la reacción de diacetilo y con el compuesto de tipo guanidina, la arginina, presente en la peptona al comienzo de la reacción; por esto debe ser agregado en primer término. El segundo reactivo es el KOH al 40%, el cual ayuda a la absorción de CO₂ en el medio VP. No debe excederse de la cantidad exacta de 0,2 ml.

Estos dos reactivos, alfa-naftol y KOH al 40%, deben ser agregados en ese orden. El KOH reacciona con la peptona para dar un color salmón-rosa y el posterior agregado de alfa-naftol no altera el color.

Después del agregado del alfa-naftol y del KOH, el tubo debe agitarse con suavidad para exponer el medio al oxígeno atmosférico a fin de oxidar la acetoína presente a diacetilo.

El diacetilo es el reactante esencial que da una reacción de color con el KOH y la peptona. En consecuencia, cuando se mezclan en proporciones correctas diacetilo, peptona y alfa-naftol se desarrolla de manera casi instantánea un color rojo en la superficie del medio; la velocidad de desarrollo del color depende de la cantidad de acetoína en el cultivo de prueba, esta coloración sólo en la superficie sugiere un proceso de oxidación.

La reacción positiva por lo común ocurre en 2-5 minutos, mediante un tenue color rosa; no obstante, exhibe una marcada coloración (rojo oscuro) cuando se lo deja durante 30 minutos. El máximo color se obtiene después de 1 hora. ⁽⁸⁾

3.6.6 Crecimiento en NaCl:

Es una prueba que se usa para diferenciar distintas especies del género *Vibrio*. Se basa en la capacidad de la bacteria de desarrollarse en presencia de cantidades variadas de cloruro de sodio (NaCl).

Es una propiedad que ha sido utilizada para caracterizar varios géneros y especies bacterianas. ⁽²⁹⁾

3.6.7 Tinción de Gram:

Es el método de tinción diferencial más importante usado en bacteriología, llamada así en honor a Dr. Christian Gram.

El método divide las bacterias en dos grandes grupos Gram- negativas y Gram-positivas. Esto es esencial para la clasificación y diferenciación de microorganismos.

La reacción a la tinción de Gram está basada en la diferencia de composición química de la pared celular bacteriana. ⁽³⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPOS DE ESTUDIO

Estudio de campo, Transversal, Experimental.

4.1.1 De campo

Se recolectaron muestras de *Anadara tuberculosa* (concha peluda) comercializada en el muelle del puerto de La Libertad y mediante una guía de inspección se obtuvieron datos relevantes sobre: la procedencia del producto, manipulación a la hora de su venta, condiciones de almacenamiento, etc. Estos datos fueron tomados de los puestos muestreados. Ver anexo N°3

4.1.2 Transversal

La investigación se realizó durante los meses de julio del 2019 a marzo del 2020, contemplando los meses de verano y los meses de invierno.

4.1.3 Experimental

Se realizaron experimentalmente análisis microbiológicos aplicando la metodología de recuento en placa y pruebas bioquímicas, para determinar si el alimento es aceptable para consumo humano, en base al RTCA 67.04.50:08 de alimentos.

4.2 Investigación bibliográfica

La investigación se realizó visitando las siguientes bibliotecas:

- “Dr. Benjamín Orozco” de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Dr. José Matías Delgado.
- Internet.

4.3 Investigación de campo

Se realizó en el muelle del puerto de La Libertad en todos los establecimientos fijos que comercializaban la especie *Anadara tuberculosa* (concha peluda).

Se recolectaron muestras en época lluviosa y seca, se aplicaron las buenas prácticas higiénicas colocándolas en bolsas identificadas con etiqueta por cada puesto.

Se trasladaron las muestras al laboratorio de alimentos de CENSALUD, en una hielera manteniendo las condiciones para su conservación y tratamiento.

Se observó que los establecimientos no cumplen con las buenas prácticas higiénicas dejando los productos expuestos a moscas y otros contaminantes.

Durante el muestreo realizado el 21 de julio del año 2019 se percibió una temperatura ambiental de 33°C y una temperatura de 35°C en época seca el día 23 de febrero del año 2020.

4.4 Universo

Todos los bivalvos crudos de la especie *Anadara tuberculosa* que se comercializan en los establecimientos del muelle del puerto de La Libertad.

4.5 Muestra

Molusco bivalvo de la especie *Anadara tuberculosa*, concha peluda.

4.6 Tipo de muestreo

Dirigido y puntual. Se tomaron un total de 34 muestras para analizar, 17 muestras en época lluviosa y 17 muestras en época seca.

Cada muestra que se tomó fue sometida a dos tratamientos diferentes: conchas lavadas y conchas sin lavar.

4.7 Tamaño de la muestra

Se contó con un total de 34 muestras (17 muestras en cada época) adquiridas en los 17 establecimientos fijos que comercializan la especie *Anadara tuberculosa* en el muelle del puerto de La Libertad.

4.8 Recolección de muestras.

Se desarrolló una guía de inspección en donde se verificó la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento, en donde se observó que los vendedores no poseen cámaras frigoríficas para almacenar los productos marinos, lo recomendado es almacenar los productos a una temperatura menor a 5°C.

Se tomó una muestra en cada establecimiento y posteriormente se colocó en una bolsa plástica de polietileno con su respectiva identificación. Ver anexo N°4 Se almaceno cada muestra en una hielera previamente limpia y sanitizada con alcohol etílico al 70%, se transportaron las muestras al Laboratorio de Microbiología de Alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). ⁽¹³⁾

4.9 Parte experimental ⁽²³⁾

4.9.1 Material, equipo y reactivos. Ver anexo N°5

4.9.2 Procedimiento previo a la manipulación de la muestra.

- Se utilizó la indumentaria adecuada para el desarrollo de los análisis: uso de gorro, mascarilla, guantes y gabacha blanca.
- Se desinfecto el área de trabajo (mesa de laboratorio) con alcohol etílico al 70%, para evitar contaminación de las muestras a analizar.
- Identificación de cada placa de Petri, tubo de ensayo u otro material a utilizar de la siguiente manera: Código de muestra, número de muestra, dilución, medio, tipo de muestra.
- Preparación de medios de cultivo TCBS, TSA, agares y caldos para pruebas bioquímicas: durante la preparación de estos medios se llevaron controles de calidad como, parámetros químicos y físico químicos del agua destilada, fecha de vencimiento de agares y caldos, volúmenes adecuados de preparación, pH de medios, esterilización en autoclave para los medios de cultivos y caldos (excepto TCBS), uso de flujo laminar e incubación.

- Descripción de material, equipo, reactivos, medios de cultivo.

4.9.3 Determinación y cuantificación del *Vibrio parahaemolyticus* por el método de recuento en placa. ⁽⁹⁾ Ver anexo N°6

- Se dividieron las 34 muestras en dos grupos: 17 muestras que se limpiaron y las otras 17 muestras que se dejaron sin limpiar.
- Para las conchas con proceso de limpieza: se lavaron las valvas de las conchas con agua corriente fría y se utilizó un cepillo para retirar la suciedad externa. (Lodo, arena y otros).
- Utilizando un cuchillo estéril por lote de muestra, se abrieron las conchas necesarias para el análisis, extrayendo así el molusco.
- Se pesó asépticamente 25 g del contenido homogenizado de 6 moluscos, directamente en una bolsa de polietileno previamente tarada.
- Se añadieron 225 mL de agua peptonada con 3% de NaCl y se homogenizó durante 2 minutos en el Stomacher a 260 rpm. Esta fue la dilución 1:10 (10^{-1}).
- Se transfirió a un Erlenmeyer estéril de 250 mL y se cubrió con papel aluminio, agitando por 1 minuto.
- Se pipetearon 10 mL de la dilución 1:10 (10^{-1}) y se añadió a un frasco que contenía 90 mL de agua peptonada con 3% de NaCl y se agitó. Esta fue la dilución 1:100 (10^{-2}), se cubrió con papel aluminio y se agitó nuevamente por 1 minuto.
- Se pipetearon 10 mL de la dilución 1:100 (10^{-2}) y se adicionó en otro frasco que contenía 90 mL de agua peptonada con 3% de NaCl y se agitó. Esta fue la dilución 1:1000 (10^{-3}), se cubrió con papel aluminio, y se agitó por 1 minuto.
- Se pipetearon 10 mL de la dilución 1:1000 (10^{-3}) y se adiciono en otro frasco que contenía 90 mL de caldo peptonado con 3% de NaCl y se agitó. Esta fue la dilución 1:10000 (10^{-4}), se cubrió con papel aluminio, y se agitó por 1 minuto
- Se incubaron las cuatro diluciones anteriormente preparadas de 18 a 24 horas a 37°C.

- Se prepararon ocho placas con agar TCBS, dos por cada una de las diluciones preparadas e identificadas por número de dilución.
- Con ayuda de un asa previamente esterilizada, se tomó una muestra de la dilución 1:10 y fue sembrada con la técnica de estriado en las dos placas con medio TCBS preparadas para esa dilución.
- Se repite el paso anterior para las diluciones 1:100, 1:1000 y 1:10000.
- Se incubaron todas las placas a una temperatura de 35°C por 24 horas.
- Se observaron en las placas las colonias características de *Vibrio parahaemolyticus* (colonias redondas, opacas, verdes o azuladas, de 2 a 3 mm de diámetro). Comparando simultáneamente con una cepa de referencia.
- Se contaron únicamente el número de colonias características para *Vibrio parahaemolyticus* de cada placa utilizando contador de colonias.
- Se reportan los resultados como Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por gramo.

4.9.4 Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* en agar TSA para tinción al Gram y pruebas bioquímicas. ⁽³⁾ ⁽⁸⁾ Ver anexo N°7

- Se prepararon dos placas con medio TSA con 3% de NaCl para las 17 muestras.
- De las placas de TCBS anteriormente sembradas, se selecciona la placa con la dilución que presenta mejor aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* y con ayuda de un asa previamente esterilizada, se transfieren dos o más de estas colonias a las placas de TSA con 3% de NaCl, identificando con el mismo número de dilución de donde se tomó la muestra.
- Se incubaron a 37°C por 24 horas.
- De estas placas se tomaron las colonias necesarias para realizar la Tinción al GRAM y las respectivas pruebas bioquímicas.

4.9.4.1 Tinción al GRAM.

- Se seleccionó una colonia aislada con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en forma de anillo y realizamos tinción al GRAM.
- Se observó la morfología microscópica, el cual fue: bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, curvos, en forma de coma.

4.9.4.2 Prueba de oxidasa.

PROCEDIMIENTO:

- Se selecciona con un asa bacteriológica estéril una colonia aislada del medio agar TSA.
- Se aplicó la muestra bacteriana sobre un disco que contiene el reactivo de oxidasa.
- Se observa si ocurre algún cambio en los próximos 30 segundos.

4.9.4.3 Prueba del Indol ⁽¹⁾

PROCEDIMIENTO:

- Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril, se tomó del agar TSA una colonia sospechosa de *Vibrio parahaemolyticus* y se cultivó en un tubo de ensayo que contenía caldo de Triptona con NaCl al 0.5%.
- Se incubó a 35°C durante 24 - 48h.
- Se añadieron 5 gotas del reactivo de Kovacs por la pared del tubo.
- Se observó el resultado.

4.9.4.4 Prueba TSI Agar hierro tres azúcares

PROCEDIMIENTO:

- Se seleccionó una colonia sospechosa del agar TSA y utilizando un asa bacteriológica estéril en forma de punta se inoculó en dirección vertical hasta unos 3-5 cm del fondo del tubo que contiene el medio agar TSI.
- Se estiró la superficie inclinada del agar TSI.

- Se mantuvieron condiciones aerobias dejando el tapón ligeramente desenroscado para prevenir la producción excesiva de Sulfuro de Hidrógeno (H₂S).
- Se incubó a 35° C durante 24 - 48 h
- Transcurrido el tiempo estipulado, se interpretaron los resultados, considerando como alcalino (K) el color rojo que es característico del medio y como ácido (A) al viraje de color, de rojo a amarillo.

4.9.4.5 Prueba de la movilidad ⁽⁷⁾

PROCEDIMIENTO:

- Se seleccionó una colonia sospechosa del agar TSA y con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en forma de punta se inoculó a modo de picadura sobre el Agar Movilidad.
- Se incubó a 25°C por 48 h.

4.9.4.6 Prueba de LIA (Lisina Hierro) ^{(9) (14)}

PROCEDIMIENTO:

- Se tomó del agar TSA una colonia característica de *Vibrio parahaemolyticus*, utilizando un asa con punta y se pinchó el medio con la punta del asa hasta unos 3-5 cm del fondo del tubo con agar LIA.
- Se estrió la superficie inclinada del agar LIA.
- Se tapó el tubo procurando no apretar demasiado el tapón.
- Se incubó a 35° C durante 18 - 24 h en atmósfera normal.

4.9.4.7 Prueba de Voges Proskauer ⁽²⁾

PROCEDIMIENTO:

- Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en forma de anillo, se seleccionó una colonia sospechosa del agar TSA y se inoculó en un tubo que contenía caldo RMVP.
- Se incubó a 35°C durante 24h-48h.

- Se agregaron 0.6mL del reactivo α -naftol 5%.
- Seguidamente se adicionaron 0.2mL del reactivo de KOH 40%.
- Se agitó el tubo y se dejó descansar 10-15 minutos.

4.9.4.8 Crecimiento en NaCl

PROCEDIMIENTO:

- Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en forma de anillo, se tomó una colonia sospechosa del agar TSA y se realizó una suspensión de la bacteria en un tubo que
- Contenía agua peptonada sin NaCl.
- Con esta suspensión se inoculó en diferentes tubos que contenían agua peptonada a diferentes concentraciones: 0,1, 6, 8, 10% de NaCl.
- Se incubó a 37°C por 24 h.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se recolectaron las muestras en el muelle del puerto de La Libertad y por medio de una guía de inspección se verificó la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento de los puestos de venta.

Posterior a ello en el laboratorio de CENSALUD se separaron las muestras en dos tratamientos que fueron: muestras lavadas y muestras sin lavar para cada establecimiento, esto con la finalidad de tener un parámetro de comparación en cuanto al recuento e identificación de microorganismos para verificar si la limpieza es un factor crítico.

Se realizaron los respectivos análisis microbiológicos para determinar la presencia del *Vibrio parahaemolyticus* utilizando placas con agar TCBS para el recuento de las colonias y placas con agar TSA para la identificación del microorganismo mediante las pruebas bioquímicas. La discusión de los resultados se presenta en orden, dando cumplimiento a cada objetivo.

5.1 Evaluar por medio de una guía de inspección la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento de los puestos que comercializan el molusco dentro del muelle del puerto de La Libertad.

Tabla N°3: Parámetros de verificación de la guía de inspección.

		Época lluviosa		Época seca	
Ítem	Parámetros a verificar en los manipuladores y en el producto	Si	No	Si	No
1	El vendedor posee uñas cortas	8	9	10	7
2	El vendedor porta Vestimenta limpia	13	4	14	3
3	Al vendedor se le observan heridas a simple vista	0	17	2	15
4	El vendedor utiliza joyas (anillos, pulseras, reloj, otros)	3	14	4	13
5	El vendedor utiliza guantes para manipular el producto.	0	17	0	17
6	El puesto de venta posee un ambiente limpio	11	6	10	7
7	Existe algún procedimiento de limpieza en el producto previo a la venta	0	17	4	13

Tabla N°3: Continuación

8	El molusco se encuentra almacenado junto con otros productos	1	16	0	17
9	Los moluscos se encuentran almacenados a una temperatura adecuada (con hielo alrededor)	5	12	10	7
10	Los moluscos están protegidos del sol	16	1	4	13

La tabla N°3 refleja los datos tabulados de la guía de inspección aplicada tanto en época lluviosa y en época seca, la cual fue desarrollada a cada vendedor que comercializa el producto de interés (concha peluda).

En esta tabla se plasman únicamente los parámetros de higiene que practica cada uno de los manipuladores, y los medios que utilizan para mantener un almacenamiento óptimo del producto en investigación.

Al tener los resultados de la guía de inspección para ambas épocas, se observó una pequeña variante en los parámetros tomados.

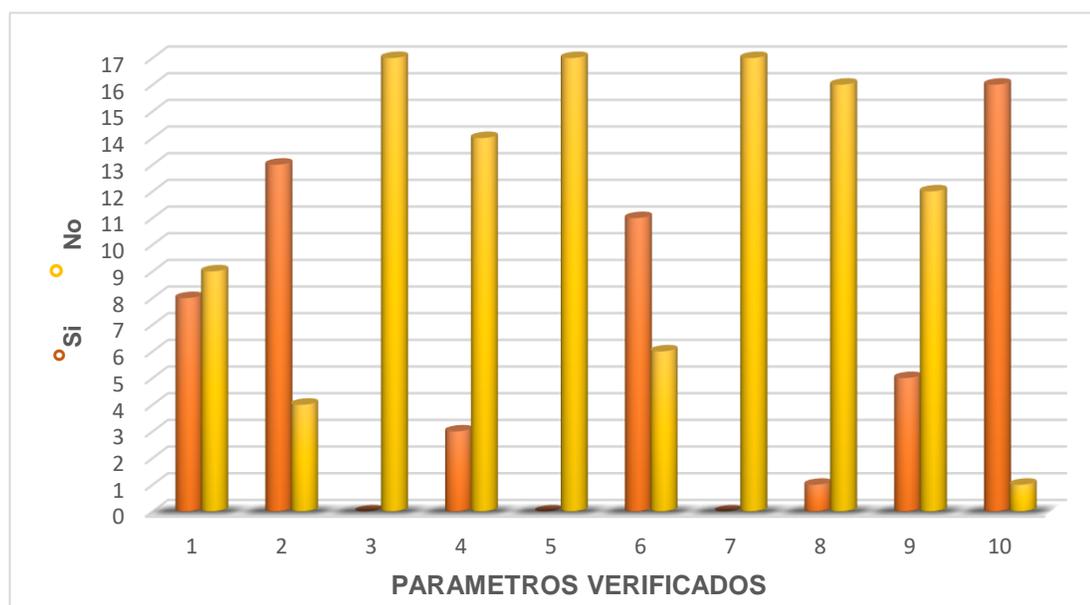


Figura N°7. Cumplimiento de prácticas higiénicas en manipuladores (1-6) y producto (7-10), resultados obtenidos durante la época lluviosa.

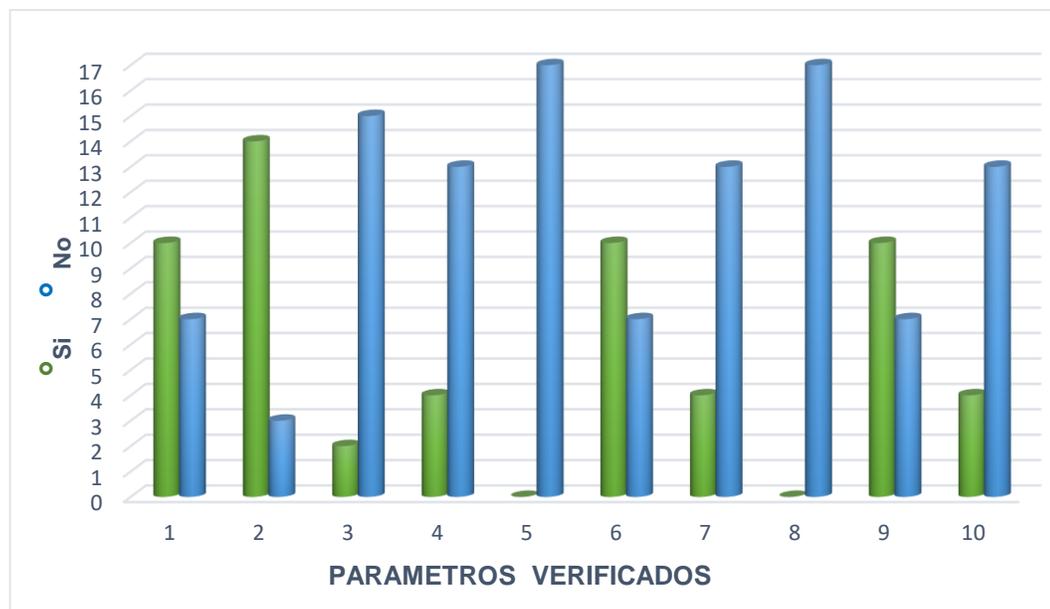


Figura N°8. Cumplimiento de prácticas higiénicas en manipuladores (1-6) y producto (7-10). Resultados obtenidos durante la época seca.

La figura N°7 y N°8 permiten una mejor comparación sobre los resultados obtenidos en la tabla N°3.

Durante la época lluviosa los vendedores mantuvieron un ambiente higiénico más adecuado durante su venta, es decir tenían los puestos de venta más limpios, no presentaban heridas en sus manos, a pesar de estas pequeñas diferencias de higiene, no se puede decir que son suficientes para tener productos inocuos y libres de contaminantes (la temperatura a la que se encuentra el molusco a la hora de la venta no evita el crecimiento del *Vibrio parahaemolyticus*) o contaminación cruzada.

A diferencia de la época lluviosa la figura N°8 muestra un incremento en las faltas de prácticas higiénicas, tanto en su indumentaria a la hora de la venta como en la manipulación del producto.

Los vendedores manifiestan tener conocimiento de las buenas prácticas higiénicas recomendadas por el ministerio de salud, como:

- A. Se les recomienda agregar hielo al producto, antes de ingresarlo a la cámara frigorífica, de esta forma se previene que el producto no se

deshidrate, ya que los mariscos deben almacenarse en un lugar fresco y evitar que el producto esté a temperaturas superiores de 48 grados centígrados o inferiores a 2 grados centígrados.

- B. Se les indica que los productos no deben estar en contacto directo con el piso, sino que deben almacenarlos sobre pallets o tarimas de plástico.
- C. Se le recomienda, como medidas higiénicas, tomar un baño diario, usar desodorante, lavarse el cabello y conservarlo peinado, conservar uñas limpias y recortadas, cambiarse diariamente la ropa interior, usar ropa de colores claros y limpios.

Estas recomendaciones dadas por el ministerio de Salud no son practicadas a cabalidad. Los comerciantes mencionaron que, por el tipo de comercio, las ganancias adquiridas no son suficientes como para poder invertir en insumos como: redecillas para el cabello, guantes e incluso mascarillas que son parte de la indumentaria básicas que debe portar un vendedor que manipula alimentos frescos o preparados.

En cuanto al almacenamiento de los productos, los vendedores separan los productos de venta de acuerdo con su especie, no mantienen los requerimientos mínimos de temperatura, ya que, de acuerdo con la bibliografía consultada, la temperatura recomendada para almacenar los moluscos bivalvos y evitar la proliferación del *Vibrio parahaemolyticus* debe de ser abajo de 5°C o arriba de 43°C.

Existen otros factores que pueden causar contaminación cruzada, entre estos podemos mencionar:

- El uso de huacales de aluminio como contenedores en lugar de utilizar hieleras con cierre hermético.
- Los espacios de cada local no están separados adecuadamente.
- Los productos están expuestos a la intemperie, por lo que están teniendo contacto con moscas y contaminantes.

En el cuadro N°2 se presenta la procedencia del producto (concha peluda), que se comercializa dentro del muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa y seca.

Cuadro N°2: Procedencia de *Anadara tuberculosa* en el muelle del puerto de La Libertad.

Parámetros a verificar en el producto	Bahía de Jiquilisco	Puerto El Triunfo	La Libertad
Procedencia del molusco	10	6	1

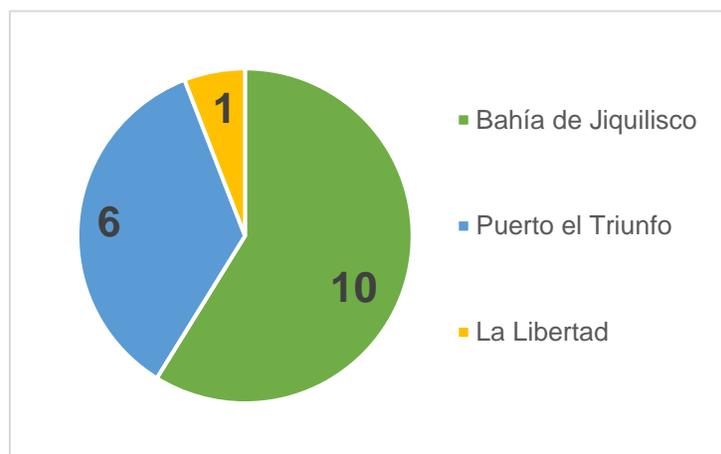


Figura N°9. Procedencia del producto (Concha peluda) que se comercializan dentro del muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa y seca.

En el cuadro N°2 y figura N°9 se observa un resumen de la procedencia del producto de los puestos de venta, en 10 de ellos el producto es procedente de la Bahía de Jiquilisco, 6 del puerto el triunfo y solo en un puesto el producto procede de La Libertad. Ver anexo 11

El Salvador se caracteriza por ser el país a nivel centroamericano donde existe mayor número de personas dedicadas a la extracción de curiles; siendo la Bahía de Jiquilisco la zona del país con una mayor cantidad de curileros.

El número de curileros en la Bahía de Jiquilisco es el más elevado en todo el país con 8,468, haciendo un porcentaje del 65% del total a nivel nacional.

La Bahía de Jiquilisco posee la mayor extensión de agua salobre y bosque salado en El Salvador, formada por numerosos esteros y canales, barras de arena y playas, un conjunto de islas de tamaños variables, un complejo lagunar de agua dulce y bosques estacionalmente saturados conectados con el manglar.

La Bahía de Jiquilisco pertenece a las cuencas hidrográficas del río Grande de San Miguel y Río Lempa, generando una mezcla de aguas dulces y saladas, lo que permite la existencia de una gama de hábitat, encontrándose una alta biodiversidad en este lugar.

Otra característica, debido a la región donde se encuentra la Bahía de Jiquilisco, es la presencia de las estaciones seca y lluviosa, ambas con una duración de seis meses; la Bahía de Jiquilisco presenta también una humedad anual promedio de 70%.

La principal zona de vida dentro del área de la Bahía de Jiquilisco es la de Bosque Húmedo Subtropical, con un promedio de temperatura de 24° C y 22° C en zonas elevadas, con precipitación anual de 1,400 a 2,000 mm.

Se muestra otro parámetro contemplado en la guía de inspección, que permitió verificar el tiempo promedio de la venta total del molusco (Concha peluda) que se comercializa en los puestos muestreados dentro del muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa y seca.

Cuadro N°3: Tiempo promedio de venta de la especie *Anadara tuberculosa* en el muelle del puerto de La Libertad.

Parámetros a verificar en el producto	Tiempo en horas
Tiempo promedio de la venta total del molusco	4 - 8

El cuadro N°3 muestra que el producto es comercializado fresco, es decir tras la recolección y entregado al vendedor, no tarda más de un día laboral (entendiéndose por día laboral: como el tiempo que el vendedor tarda en vender el producto en un solo día, puede ser esto en 4 horas o más, pero no estrictamente 8 horas) en ser totalmente vendido.

Se comprobó la veracidad del tiempo de venta ya que como investigadores fuimos en más de una ocasión a realizar el muestreo, debido a que nos vimos con el inconveniente de no encontrar el producto a muestrear en horas de la

tarde, debido a que los restaurantes de la zona adquieren las conchas a tempranas horas del día en los establecimientos del muelle del puerto de La Libertad, causando que el producto se agote más rápido; esto obliga a realizar el muestreo en horas de la mañana y así tener una mayor posibilidad de poder adquirir el producto.

El producto comercializado (concha peluda) se debe de adquirir lo más fresco posible ya que según el RTCA 67.04.50:08 clasifica a este tipo de alimento como riesgo tipo A, es decir, con una alta probabilidad de causar daño a la salud. ⁽²⁵⁾

Cuadro N°4: Tipo de embalaje utilizado para entrega del producto.

Parámetros a verificar en el producto	Papel periódico con bolsa plástica	Bolsa plástica
Tipo de embalaje que utiliza para la entrega del producto	5	12

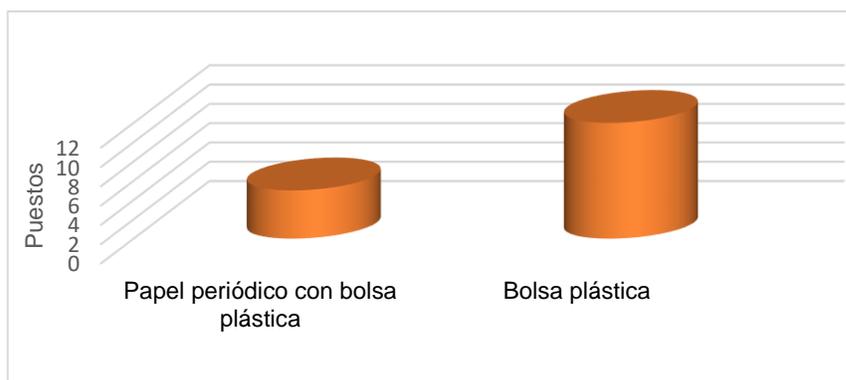


Figura N°10. Tipo de embalaje que se utiliza para la entrega del producto (concha peluda) que se comercializa en los puestos muestreados dentro del muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa y seca.

Considerando siempre la importancia de la frescura del producto, también se evaluó el tipo de embalaje que se utiliza para la entrega de este al comprador y los resultados se muestra en el cuadro N°4.

Los vendedores en su mayoría utilizan una bolsa plástica para entregar el producto al consumidor, otro grupo más pequeño de vendedores prefieren adjuntar papel periódico humedecido ya que, según ellos esto le brinda al producto la humedad suficiente para evitar la muerte de la concha.

Un grupo de vendedores intenta mantener la calidad y frescura, brindando indicaciones al comprador de como manipular las conchas hasta su preparación; y el otro porcentaje de vendedores dejan claro que su único objetivo es la venta.

5.2 Determinar la presencia o ausencia del microorganismo patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en la especie *Anadara tuberculosa*.

Se determina la presencia o ausencia del microorganismo patógeno *Vibrio parahaemolyticus* en la especie *Anadara tuberculosa*, en época lluviosa para los dos diferentes tratamientos a evaluar (conchas lavadas y conchas sin lavar) durante el periodo comprendido de la tercera semana del mes de julio del año 2019. Ver anexo N°9

Tabla N°4 Conteo de colonias de las muestras limpias y muestras sin limpiar en agar TCBS 35°C/24h en época lluviosa.

Código de muestras	Muestras Limpias	Muestras sin limpiar	Numero de colonias
	Dilución	Dilución	
MB01	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB02	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB03	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB04	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB05	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB06	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB07	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB08	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB09	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB10	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB11	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB12	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB13	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB14	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB15	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB16	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB17	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
*MB=Muestra de bivalvo			
*DNPC= Demasiado numeroso para contar			

En el muestreo en época lluviosa del año 2019 se obtuvieron colonias de color anaranjado en su mayoría y algunas amarillas, difíciles de contar en todas las diluciones en el medio TCBS a 35°C con incubación de 24h.

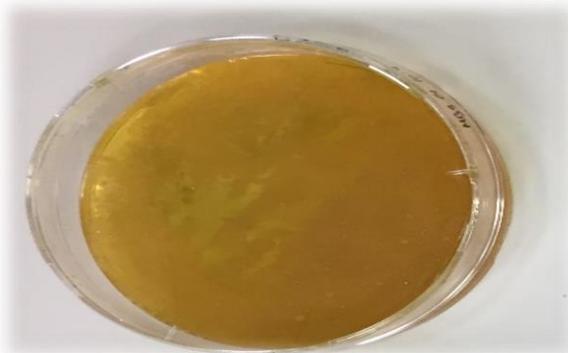


Figura N°11: Crecimiento de *Aeromonas hydrophila* (colonias color naranja) en placas con agar selectivo TCBS en muestreo durante época lluviosa.

La temperatura de almacenamiento de la concha influyo en el crecimiento desmedido de colonias de microorganismos, pues en ningún momento se sometió a temperaturas inferiores a los 5°C para poder interrumpir la cadena de duplicación del microorganismo.



Figura N°12: Resultados del Crecimiento de *Vibrio alginolyticus* (colonias color amarillo) en placas con agar selectivo TCBS, en muestreo durante época lluviosa.

El tiempo de incubación en el medio de enriquecimiento fue demasiado largo, no siendo congruente con el objetivo de detectar el número de microorganismos presentes al momento de iniciar el análisis, es decir, que el fin principal es detectar la carga microbiana presente en las conchas al momento del consumo, pues no buscamos generar un crecimiento exponencial de colonias, aunque si las suficientes para poder aislar el microorganismo de interés.

Es importante mencionar que la carga microbiana de las conchas pudo haber sido alterada por la manipulación de los comerciantes y por el ambiente en el que se encuentran a la hora de su venta, es por eso que se utiliza agua peptonada al 3% de NaCl para crear un ambiente donde solo crezcan microorganismos tolerantes a la sal.

En la tabla N°6, se presenta un resumen por microorganismo.

Tabla N°5: Microorganismos identificados por medio de las pruebas bioquímicas muestras lavadas y muestras sin lavar en época lluviosa.

Época lluviosa			
Microorganismos	Muestras		Procedencia
	Lavadas	Sin Lavar	
<i>Aeromona hydrophila</i>	8	7	La Libertad, Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. vulnificus</i>	4	4	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. alginolyticus</i>	5	5	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
No identificado	0	1	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo

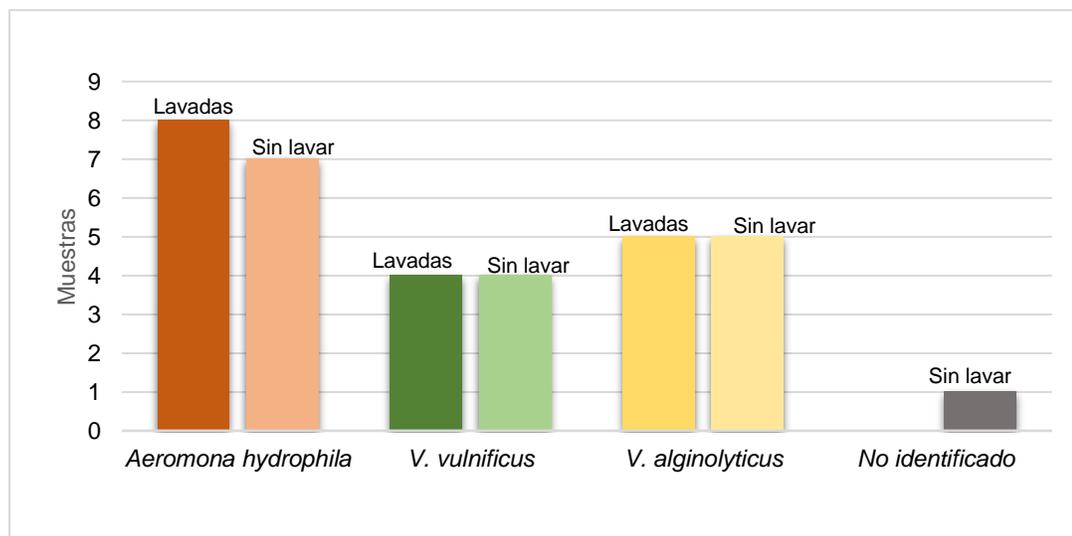


Figura N°13. Microorganismos identificados en muestra recolectadas en época lluviosa.

En época lluviosa los resultados de los análisis presentan ausencia de *Vibrio parahaemolyticus* en el 100% de las muestras analizadas; sin embargo, se sospecha la presencia de otros tipos de *Vibrios* que, aunque no son

considerados en el RTCA 67.04.50:08 del año 2009 ⁽²⁵⁾, pueden causar enfermedades transmitidas por alimentos, siendo la principal fuente de contaminación, el agua (manglares).

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas de los dos tratamientos planteados son los siguientes:

- Prueba de oxidasa positiva para los tratamientos.



Figura N°14: Resultado sobre discos de oxidasa para muestras analizadas durante la época lluviosa, se considera positiva por la coloración morada al centro del disco.

- *Aeromona hydrophila* en 8 muestras lavadas y 7 muestras sin lavar. Ver figura N°41
- *Vibrio alginolyticus* 5 muestras lavadas y 5 muestras sin lavar. Ver figura N°42
- *Vibrio vulnificus* en 4 muestras lavadas y 4 muestras sin lavar Ver figura N°43
- Una muestra sin lavar no se logró identificar (MBS06), esto debido a la presencia de sulfuro de hidrogeno en la prueba bioquímica de TSI, siendo una reacción no esperada para este análisis.

Según los resultados obtenidos se observa una alta prevalencia de *Aeromona hydrophila* ya que no es microorganismo exigente en cuanto a su proliferación de acuerdo con las condiciones ambientales en las que se desarrolla (ríos, mares, lodos y suelos) Ver anexo N° 10

El *Vibrio alginolyticus* es el más halófilico de todos ya que es capaz de tolerar concentraciones de hasta el 10% de NaCl y concentraciones mínimas del 1%.

Se aísla con frecuencia en aguas costeras templadas y tropicales, especialmente cuando la temperatura del agua es superior a los 17°C.

El *Vibrio vulnificus* se encuentra presente en aguas con bajas concentraciones de sal desde el 1% y en sedimentos; la época de lluvia y temperatura de 23°C con un pH ideal de 7.8 son las condiciones idóneas para su proliferación, este microorganismo tiene una asociación simbiótica con su hospedero en este caso la *Anadara tuberculosa*.

Anteriormente detallamos que tanto el *Vibrio alginolyticus* y *Vibrio vulnificus* poseen la capacidad de proliferación a temperaturas inferiores a los 25°C en presencia de lluvias, es decir, son altamente dependientes a condiciones climáticas específicas, en cambio la *Aeromonas hydrophila* no es un microorganismo exigente de condiciones ambientales definidas para su crecimiento y proliferación.

Posteriormente, se realizaron las mismas determinaciones, para el muestreo llevado a cabo en época seca, en agar TCBS 35°C/24h durante la última semana del mes de febrero del año 2020 procedentes del muelle del puerto de La Libertad.

Tabla N°6: Resultados obtenidos en el recuento de colonias para cada muestra analizada, durante la época seca.

Código de muestras	Muestras Limpias			Muestras Sin limpiar		
	Dilución	N° de colonias sospechosa	Recuento en UFC/ml 35°C/24h	Dilución	N° de colonias sospechosa	Recuento en UFC/ml 35°C/24h
MB01	10 ⁻⁴	29	2.9x10 ⁶	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC
MB02	10 ⁻⁴	2	2.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	13	1.3x10 ⁶
MB03	10 ⁻⁴	4	4.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	7	7.0x10 ⁵
MB04	10 ⁻³	22	2.2x10 ⁵	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC
MB05	10 ⁻⁴	3	3.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	6	6.0x10 ⁵
MB06	10 ⁻⁴	28	2.8x10 ⁶	10 ⁻⁴	17	1.7x10 ⁶
MB07	10 ⁻³	23	2.3x10 ⁵	10 ⁻⁴	4	4.0x10 ⁵
MB08	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC	10 ⁻⁴	34	3.4x10 ⁶
MB09	10 ⁻⁴	9	9.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	15	1.5x10 ⁶
MB10	10 ⁻⁴	9	9.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	21	2.1x10 ⁶

Tabla N°6 Continuación

MB11	10 ⁻⁴	5	5x10 ⁵	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC
MB12	10 ⁻⁴	17	1.7x10 ⁶	10 ⁻⁴	10	1.0x10 ⁶
MB13	10 ⁻⁴	2	2.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	4	4.0x10 ⁵
MB14	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC	10 ⁻⁴	2	2.0x10 ⁵
MB15	10 ⁻⁴	8	8.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	31	3.1x10 ⁶
MB16	10 ⁻⁴	15	1.5x10 ⁶	10 ⁻⁴	12	1.2x10 ⁶
MB17	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC	10 ⁻⁴	157	1.6x10 ⁷

*MB=Muestra de bivalvo

*DNPC= Demasiado numeroso para contar

*UFC/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro

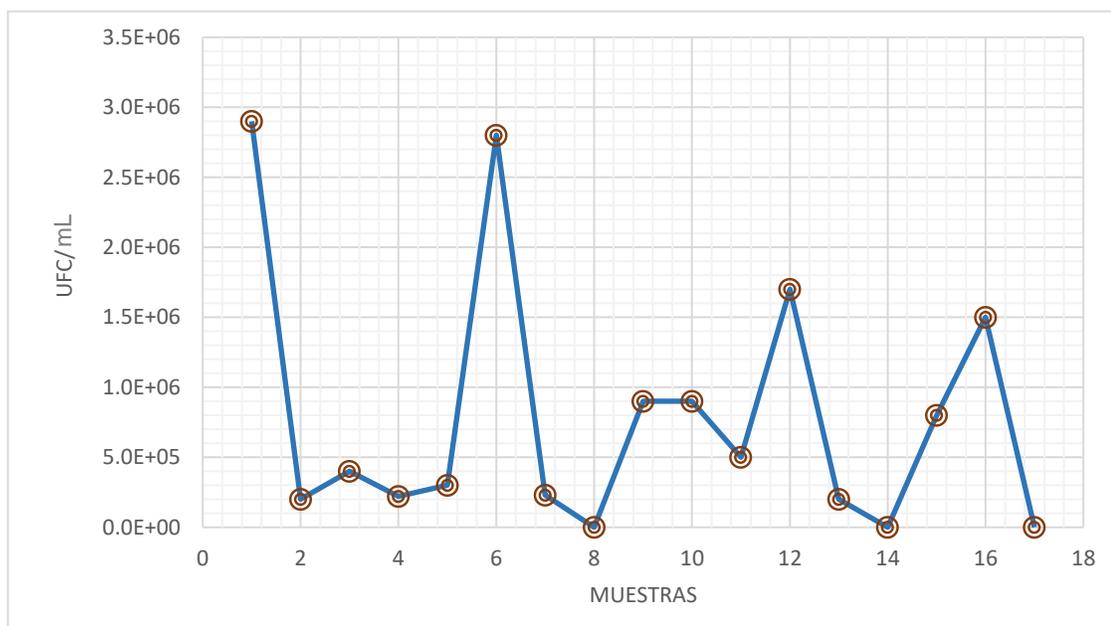


Figura N°15: Grafica sobre el conteo de colonias presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus*, tratamiento de las muestras limpias en época seca procedentes del muelle del puerto de La Libertad.

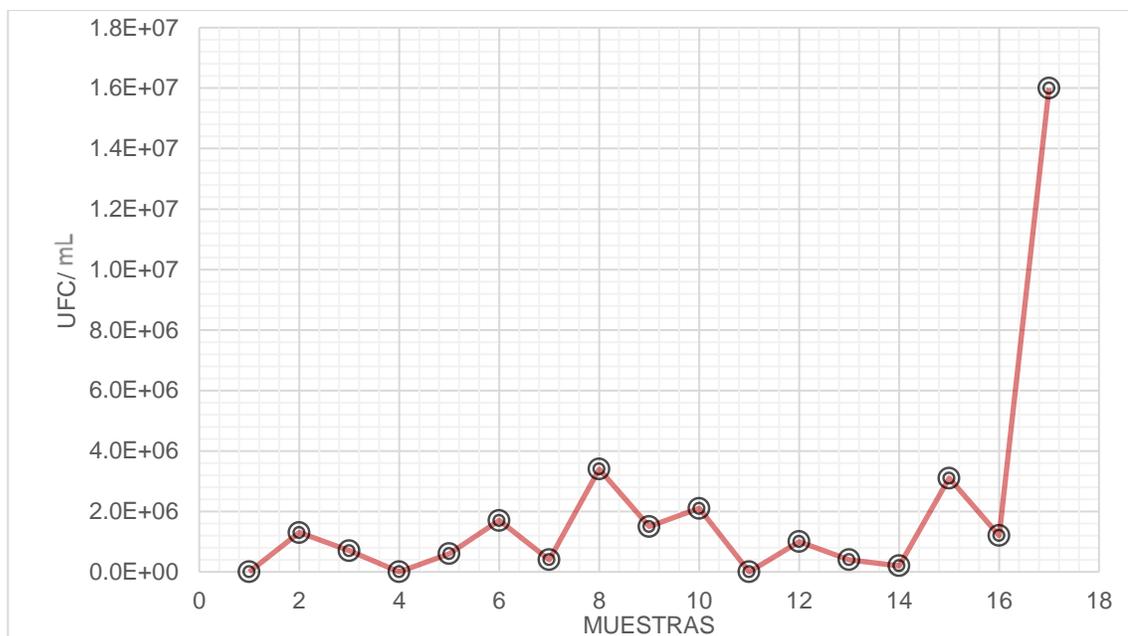


Figura N°16: Grafica sobre el conteo de colonias presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus*, tratamiento de muestras sin lavar en época seca del año 2020 procedentes del muelle del puerto de La Libertad.

La tabla N°7, Figuras N°15 y N°16 muestran los resultados finales del conteo de colonias expresados en UFC/mL, para el segundo muestreo realizado en época seca en el año 2020.

Las colonias obtenidas en el agar TCBS a 35°C / 24h, fueron en su mayoría de color naranja y algunas amarillas, y en menor cantidad se logró aislar colonias verdes con características presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus*.

Para el recuento de las colonias únicamente se tomaron en cuenta las colonias que presentaron características presuntivas para *Vibrio parahaemolyticus* (colonias redondas, opacas, verde azuladas, de 2 a 3 mm de diámetro) las cuales fueron cuantificadas y se muestran en la tabla anterior. Ver anexo N°9

Se realizó el recuento en la mayoría de las diluciones 10^{-4} , siendo las diluciones donde mejor se aislaron las colonias, pero en dos tratamientos se utilizó la dilución 10^{-3} (MBL04 y MBL07) debido a que en la dilución 10^{-4} no hubo un crecimiento significativo para poder realizar el conteo.

En cuanto a las placas donde se identificó *Vibrio parahaemolyticus* (MB05, MB10 y MB15) se observó un mayor crecimiento en los tratamientos de las muestras sin lavar, esto nos comprueba que al realizar un procedimiento de limpieza solo con agua y un cepillo se reduce la carga microbiana significativamente.

El RTCA 67.04.50:08 del año 2009, ubica al microorganismo (*Vibrio parahaemolyticus*) como riesgo de categoría 8, al cual se le aplica un plan de 3 clases con $n=5$ y $c=1$, de las 34 muestras analizadas solo 6 podían presentar el límite indicado (1×10^3 UFC/mL), con los resultados del conteo de las colonias se observa que no cumple con el parámetro establecido ya que se obtuvieron valores a partir de 10^5 UFC/mL.

Las muestras que están en la tabla con la abreviación DNPC (Demasiado numeroso para contar) están indicando un crecimiento excesivo de colonias amarillas en el agar TCBS.

El tiempo de incubación planteado era de 24 horas, el cual fue modificado a 90 minutos para controlar y evitar un crecimiento excesivo de colonias, este cambio de tiempo de incubación se realizó en base a la experiencia del primer muestreo (época lluviosa) donde no se logró aislar ningún tipo de colonia, impidiendo el recuento; el cambio de este criterio fue tomado de acuerdo a la información disponible en la Revista digital Universitaria de la UNAM, en el que especifica que el rango de generación celular estimado es de 10 a 15 minutos para el *Vibrio parahaemolyticus*.⁽³⁸⁾

Esta decisión también fue considerada con el propósito de evitar el uso excesivo de medios de cultivos, reactivos y por tener limitada la cantidad de cristalería disponible para los análisis.

Los resultados sobre la identificación de microorganismos presentes en las muestras lavadas y muestras sin lavar recolectadas durante la época seca por medio de las pruebas bioquímicas se detallan en la tabla N°9

Resumen del total de microorganismos identificados en las 17 muestras lavadas y muestras sin lavar que fueron recolectadas en época seca.

Tabla N°7: Total de microorganismos identificados por medio de las pruebas bioquímicas para muestras lavadas y sin lavar.

Época Seca			
Microorganismos	Muestras		Procedencia
	Lavadas	Sin Lavar	
<i>Aeromona hydrophila</i>	3	3	La Libertad, Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. Vulnificus</i>	9	11	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	3	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
No identificado	2	0	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo

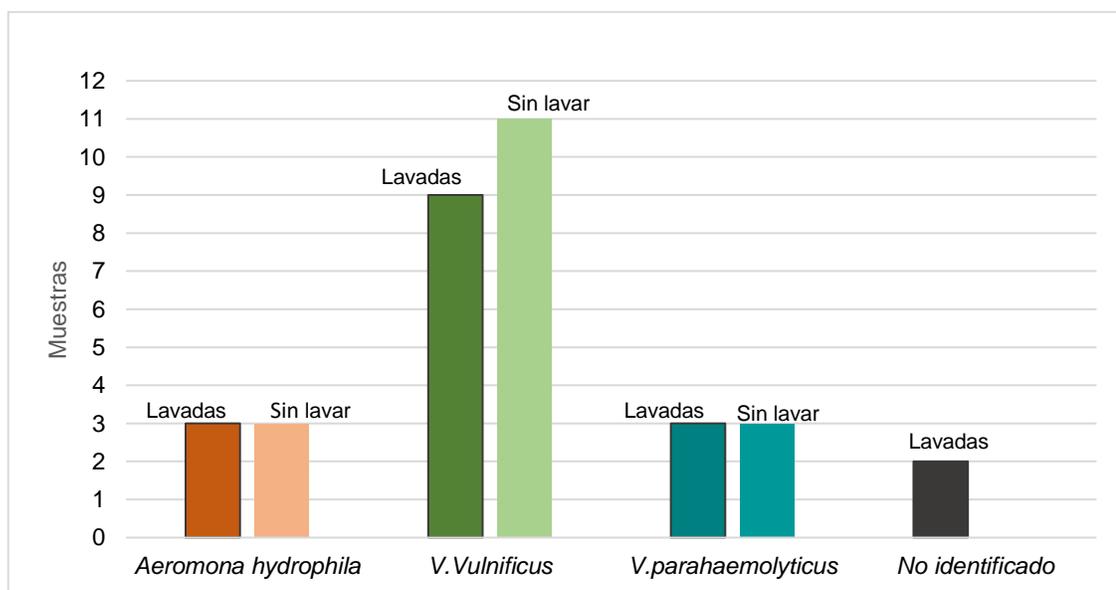


Figura N°17: Microorganismos identificados en las 17 muestra analizadas en época seca.

Para el segundo muestreo realizado en época seca en febrero del año 2020, se muestran algunas imágenes de los resultados obtenidos en la determinación de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de músculo crudo (*Anadara tuberculosa*). Empezando con la prueba bioquímica oxidasa, la cual fue positiva para todas las muestras.

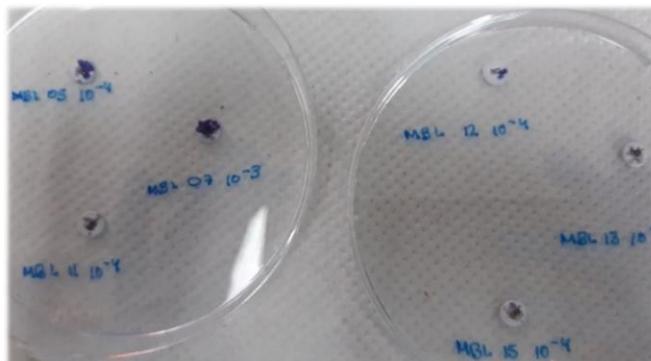


Figura N°18: Resultado sobre discos de oxidasa para muestras analizadas durante la época seca, se considera positiva por la coloración morada al centro del disco.

Mediante las demás pruebas descritas para la identificación, se logró confirmar la presencia de *Vibrio parahaemolyticus* en 6 muestras, debido al crecimiento de colonias de color verde azulado en el medio TCBS y al observar bacilos curvos al microscopio

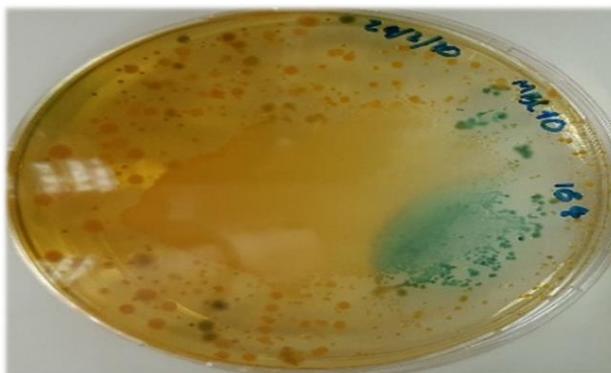


Figura N°19: Resultado del crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus* en placas con agar selectivo TCBS (colonias verdes azulada).



Figura N°20: Vista al microscopio (bacilo corto curvo) de *Vibrio parahaemolyticus*.

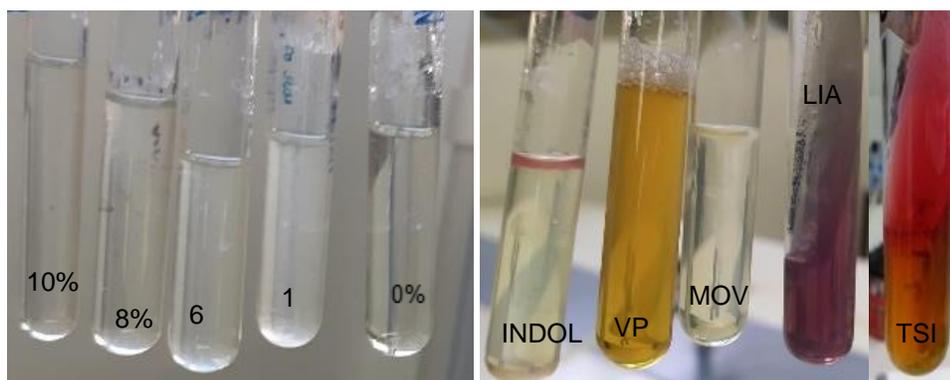


Figura N°21: Resultados de pruebas bioquímicas y crecimiento en NaCl indicando presencia de *Vibrio parahaemolyticus*.

El segundo microorganismo identificado en 20 muestras fue el *Vibrio vulnificus*, confirmado por su coloración verde en las placas TCBS, también por el bajo crecimiento en la prueba de NaCl y bacilos cortos al observar bajo el microscopio



Figura N°22: Resultado del crecimiento del *Vibrio vulnificus* en placas con agar selectivo TCBS (colonias verdes oscuras).



Figura N°23: Vista al microscopio (bacilos rectos cortos) de *Vibrio vulnificus*.

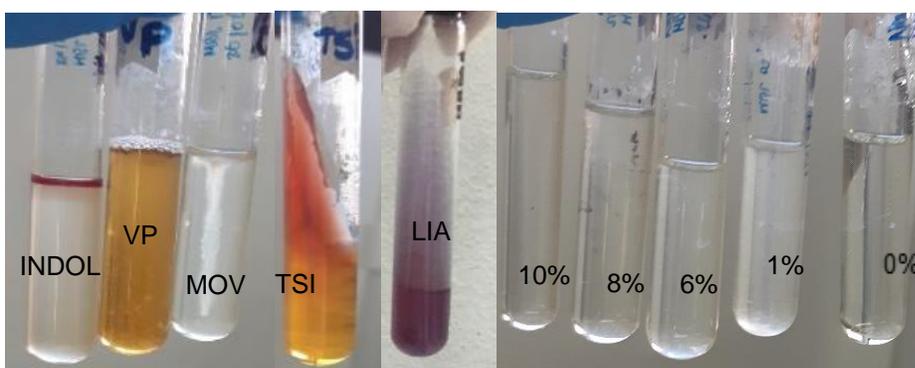


Figura N°24: Resultados de las pruebas bioquímicas y crecimiento en cloruro de sodio para *Vibrio vulnificus*.

Y el último microorganismo que se identificó fue la *Aeromona hydrophila* en 6 muestras siendo las únicas que presentaron colonias de color naranja.



Figura N°25: Crecimiento de *Aeromona hydrophila* (colonias color naranja) en placas con agar selectivo TCBS.

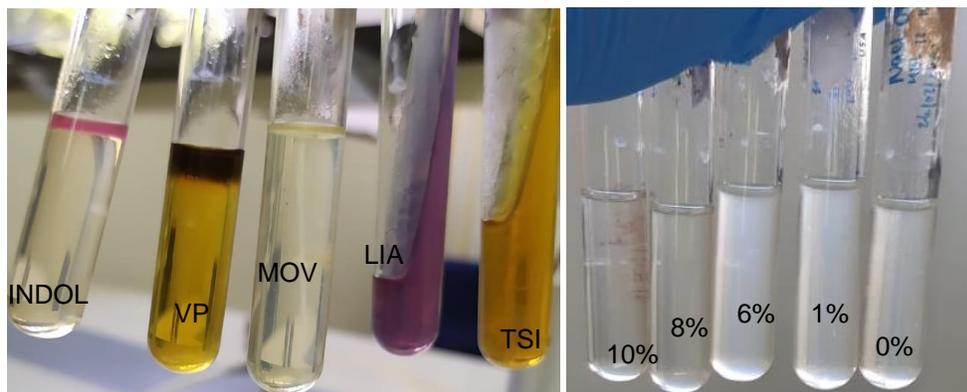


Figura N°26: Resultados de pruebas bioquímicas y crecimiento en NaCl para *Aeromonas hydrophila*

También obtuvimos 2 muestras (MBL02 Y MBL07) en las cuales no se logró identificar el microorganismo, esto debido a la presencia de sulfuro de hidrogeno en la prueba bioquímica de TSI, siendo una reacción no esperada para los microorganismos que se consideraron en la tabla comparativa de resultados de pruebas bioquímicas que se elaboró, y que fue tomada en cuenta en esta investigación como refuerzo, además de los resultados esperados del *Vibrio parahaemolyticus* (quien es el principal objetivo de investigación y de identificación) ningún resultado nos indica la presencia de este gas (H_2S), por tal razón se desconoce el tipo de microorganismo aislado. Ver anexo N°8

Es conocido que el *Vibrio parahaemolyticus* es un huésped natural en las conchas, cuyo hábitat natural está en las aguas marinas costeras, especialmente en los estuarios, los que representan su reservorio, acumulando *vibrio* durante el proceso de filtración y alimentación, alcanzando en su interior concentraciones hasta cien veces superiores a las del agua. El patógeno se asocia a la presencia de plancton y moluscos bivalvos para sobrevivir en el agua.

Se sabe que la distribución de *Vibrio parahaemolyticus* en los ambientes marinos se relaciona a las temperaturas del agua. Así, diversos estudios han demostrado que el organismo rara vez se detecta en agua de mar hasta que la temperatura del agua sube de $15^{\circ}C$ a más. Por tanto, es más probable detectar *Vibrio parahaemolyticus* en las conchas recolectadas en el verano que en el invierno.

Se identificó el *Vibrio parahaemolyticus* solo en 6 muestras, cuando se esperaba la presencia de dicho microorganismo en más del 50% de las muestras recolectadas durante la época seca, por lo que se relaciona la escasa presencia de este microorganismo con la alteración del ambiente natural.

En el análisis de las muestras se identificó la presencia del *Vibrio vulnificus*, los responsables de que este microorganismo de origen marino se incremente en un momento dado es la temperatura, el pH, la salinidad y el aumento de la materia orgánica; este microorganismo se encuentra diseminado en los océanos y estuarios a nivel mundial durante la época de lluvia o cuando la temperatura del agua es elevada (mayor a 23°C), en la mayoría de los casos es mejor aislado entre los meses de mayo y octubre.

Se puede decir que el *Vibrio vulnificus* no es tan exigente en los requerimientos ambientales para su crecimiento y diseminación en comparación con el *Vibrio parahaemolyticus*, por tal razón es notable un mayor crecimiento para esta época, también hay que tomar en cuenta que en las placas de TCBS, que es un medio selectivo da lugar a la competitividad entre las diferentes especies del género *Vibrio*, desarrollándose más el que mejor aprovecha los nutrientes del medio.

5.3 Comparar los resultados obtenidos con los valores establecidos en el RTCA 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS DEL AÑO 2009.

Tabla N°8: Microorganismos identificados en época lluviosa y en época seca.

Época lluviosa y época seca			
Microorganismo	Total de muestras		Procedencia
	Lavadas	Sin lavar	
<i>Aeromona hydrophila</i>	11	10	La Libertad, Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. vulnificus</i>	13	15	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. alginolyticus</i>	5	5	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	3	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>No identificado</i>	2	1	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo

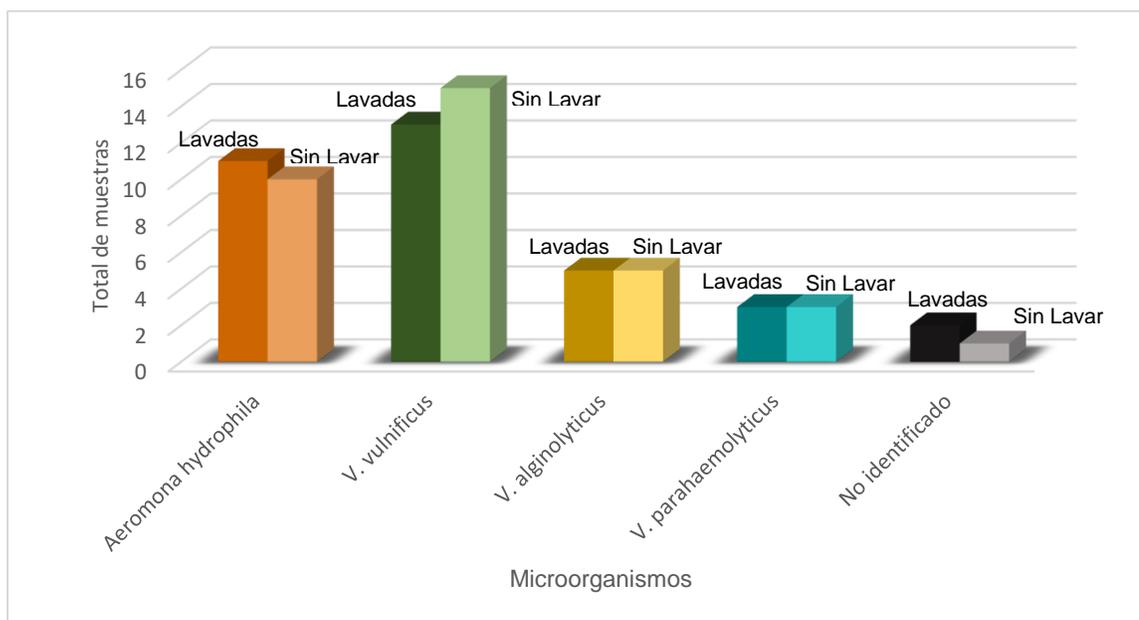


Figura N°27: Total de microorganismos identificados a lo largo de toda la investigación.

Se analizaron un total de 34 muestras (17 muestras para cada época) adquiridas en los 17 puestos fijos que comercializan la especie *Anadara tuberculosa* en el muelle del puerto de La Libertad, cada muestra se dividió en dos tratamientos analizados a lo largo de la investigación.

Como resultado final de las muestras (unificando los dos tratamientos) se logró aislar al *Vibrio Vulnificus* en 28 muestras y como segundo microorganismo relevante la *Aeromonas hydrophila* en 21 muestras, se puede ver con estos resultados que el *Vibrio parahaemolyticus* no es un microorganismo predominante en la especie *Anadara tuberculosa* ya que solo se aisló en 6 muestras durante toda la investigación.

Cada microorganismo encontrado en los análisis realizados, si bien no están contemplados en el RTCA 67.04.50:08 del año 2009 de alimentos para la especie bivalva, es de suma importancia conocer un poco sobre las diversas enfermedades que pueden estar generando el consumo de alimentos contaminados; por tal razón se menciona puntualmente un poco sobre cada microorganismo y sus efectos a la salud al consumirlos:

- El *Vibrio vulnificus* es una bacteria común en el agua de los estuarios de climas tropicales, puede estar presente en alimentos de origen marino como los bivalvos y pescados, causa tres cuadros clínicos en humanos: septicemia, gastroenteritis e infección en heridas.

Por otro lado, las personas saludables tienen un riesgo menor de infección por el *Vibrio vulnificus* la mayoría de las enfermedades de *Vibrio vulnificus* ocurren durante los meses de verano. ⁽³⁴⁾

- La especie *Aeromonas hydrophila* se clasificó en la familia Vibrionaceae; sin embargo, se reclasificó posteriormente en la familia Aeromonadaceae, que son bacilos gramnegativos móviles, la *Aeromonas hydrophila* es una bacteria que está en agua dulce o salada, como lagos, ríos, embalses y estuarios, y es más frecuente en climas cálidos; también puede contaminar el suelo húmedo, resiste el calor, el frío y el cloro.

Algunas cepas de *Aeromona hydrophila* (la más frecuente) producen una toxina llamada aerolisina, que causa daño tisular.

La infección se produce cuando las bacterias que producen la toxina aerolisina entran en un área de la piel lesionada. Las infecciones humanas causadas por *Aeromonas hydrophila* son raras e incluyen enfermedades gastrointestinales, infecciones de la piel y de los tejidos blandos. ⁽³¹⁾

- El *Vibrio alginolyticus* es un organismo del mar y estuarios, su distribución es mundial por lo general en costas de países templados, se encuentra en cualquier organismo marino como: peces, almejas, ostiones, corales, entre otros.

Los signos y síntomas en el hombre se deben a la ingesta de productos marinos crudos o insuficientemente cocidos, producen un cuadro gastrointestinal asociado a la ingestión de productos marinos contaminados. ⁽³⁹⁾

Los *Vibrios* de acuerdo con su especie y familia tienen diferentes exigencias para su crecimiento y su desinanciación, por ejemplo, en nuestra investigación encontramos que el *Vibrio vulnificus* se encuentra desinanciado durante todo el año y para el caso del *Vibrio parahaemolyticus* únicamente lo logramos identificar en

época seca, esto posiblemente por la metodología en la que hay que considerar dos factores: composición del agua peptonada y tiempo de enriquecimiento.

Por otra parte, los resultados nos ayudan a confirmar, con base a la teoría consultada, que el *Vibrio parahaemolyticus* es un microorganismo sujeto a cambios climáticos, pero no garantizamos que este sea estacional propio de la época seca. Si es autóctono de lugares como los esteros, bahías y manglares, cuyas condiciones de proliferación son bien específicas.

En cuanto al recuento de colonias de *Vibrio parahaemolyticus* ninguna cumple con el límite máximo permitido de 10^3 UFC/mL establecido por el RTCA 67.04.50:08 de alimentos del año 2009 obteniendo valores superiores a 10^5 UFC/mL.

Para las últimas actualizaciones del RTCA de alimentos, el *Vibrio parahaemolyticus* ya no figura como un microorganismo patógeno de interés en la especie bivalva (*Anadara tuberculosa*) no solicitando ni su identificación y ni su recuento, esto puede deberse al decremento de la presencia de este microorganismo en la concha peluda.

5.4 Elaborar un informe de resultados y presentarlo a la defensoría del consumidor.

Se elaboró un informe dirigido a la defensoría del consumidor en el cual se presentan los resultados que se obtuvieron de la identificación del *Vibrio parahaemolyticus* en la especie *Anadara tuberculosa*, mostrando la información más relevante; Con el fin de hacer de su conocimiento la baja prevalencia de este microorganismo y la presencia de otros en el alimento y sus posibles riesgos para la salud de los consumidores.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



San Salvador, marzo, 2021
Lic. Ricardo Salazar
Presidente de la Defensoría del Consumidor
Presente.

Reciba un cordial saludo deseándole éxito en su labor diaria.

El motivo de la presente es para presentar a usted los resultados del análisis microbiológico realizado a 34 muestras de molusco bivalvo crudo de la especie *Anadara tuberculosa* obtenidas de los 17 establecimientos fijos que comercializan la especie en el Muelle del Puerto de la Libertad, para darle cumplimiento a uno de nuestros objetivos específicos de nuestro trabajo de graduación titulado **“IDENTIFICACION DEL *Vibrio parahaemolyticus* en *Anadara tuberculosa* (CONCHA PELUDA) COMERCIALIZADO EN EL MUELLE DEL PUERTO DE LA LIBERTAD”**.

Cabe mencionar que anexo a los resultados, se incluyen los parámetros microbiológicos para moluscos crudos según el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS del año 2009, (Criterios microbiológicos para registro de alimentos y vigilancia, grupo de alimento 9: Pescados, derivados y productos marinos, Subgrupo del alimento 9.1: pescado, productos marinos y de agua dulce, crudos, refrigerados o congelados, incluidos moluscos, crustáceos y equinodermos, empacados)

Agradeciendo de antemano su atención.
Atentamente

F. _____
Débora María Sánchez de Milian

F. _____
Denis Francisco Avalos Platero

Estudiantes Egresados de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.

RESUMEN

El género *Vibrio* comprende 75 especies, de ellas 12 son consideradas patógenas para el ser humano, el *Vibrio parahaemolyticus* es asociado con enfermedades gastrointestinales como gastroenteritis aguda, frecuentemente por el consumo de pescado, moluscos y crustáceos crudos o insuficientemente cocidos. El consumo de la especie *Anadara tuberculosa* (Concha peluda) en todo el territorio nacional presenta una alta demanda, mayormente en zonas turísticas, así como lo es el puerto de La Libertad, por tal razón la presente investigación tiene como finalidad identificar el *Vibrio parahaemolyticus* en la especie *Anadara tuberculosa* (concha peluda). Para nuestra investigación se tomó el muelle del puerto de la Libertad como punto de referencia donde se comercializa la especie de interés, recolectando las muestras de (*Anadara tuberculosa*) en 17 establecimientos ubicados sobre el muelle, siendo un total de 34 muestras (17 muestras recolectadas en época lluviosa y otras 17 muestras recolectadas en época seca) en cada establecimiento se desarrolló una guía de inspección para evaluar la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento del molusco, las muestras recolectadas se

dividieron en dos tratamientos: conchas lavadas y sin lavar.

El análisis microbiológico consistió en aislar el *Vibrio parahaemolyticus* de las muestras de *Anadara tuberculosa* (concha peluda) realizando diluciones y siembras en placas con el agar TCBS mediante la técnica de estriado y se confirmó la presencia del microorganismo mediante las pruebas bioquímicas, los análisis se desarrollaron en el Laboratorio de alimentos del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud de la Universidad de El Salvador (CENSALUD), en el periodo comprendido desde julio del 2019 a marzo del 2020.

INTRODUCCIÓN

Clasificación Taxonómica. Según Camacho (1999) y Sanclement (2008), la especie *Anadara tuberculosa* se clasifica de la siguiente manera:

- **Reino:** Animalia
- **Phylum:** Mollusca
- **Clase:** Bivalvia
- **Orden:** Arcoida 18
- **Familia:** Arcidae
- **Nombre científico:** *Anadara tuberculosa*.
- **Nombres comunes:** “piangua” (Costa Rica); “concha negra” (Nicaragua); “Curil, concha negra” (El Salvador); “chucheca” (Panamá); “concha prieta” (Ecuador).

Es la especie de moluscos más conocida y consumida en El Salvador, su concha es equivalva e inequilateral; su contorno es ovalado, con alargamiento moderado, su color es blanco, cubierto por un periostraco piloso que va desde café oscuro hasta negro, es esencialmente habitante de sustrato suave, se puede encontrar también en sustratos de fango arenoso, pero las densidades de población más altas se encuentran en los lodos blandos intermareales que bordean los bosques de manglar, la alimentación de la mayoría de los moluscos es esencialmente por filtración de partículas y microorganismos. Según lo establecido por el RTCA los alimentos se clasifican de acuerdo a la probabilidad de causar daño a la salud de las personas, la gravedad de dicho efecto y de acuerdo a la clase de peligro y a la relación de las condiciones de manipulación y consumo, la *Anadara tuberculosa* se clasifica en una categoría de alimento de riesgo tipo A ya que es un alimento que se consume fresco. Y según las categorías de riesgo asociadas al alimento y al microorganismo se recomienda que a la *Anadara tuberculosa* se le debe de identificar y cuantificar el microorganismo *Vibrio parahaemolyticus*, considerado de riesgo en categoría 8 con una presencia y limitado máximo permitido de 10^3 UFC/ml. *Vibrio*

parahaemolyticus es una bacteria Gramnegativa halófila, es autóctona para el entorno marino y un agente causante de enfermedades relacionadas con el consumo de mariscos crudos o poco cocidos. *Vibrio parahaemolyticus* es tanto oxidativo como fermentativo y se produce naturalmente tanto en ambientes marinos como de agua dulce donde interactúa con diversos organismos marinos y estuarinos. Se sabe que las especies de *Vibrio* se concentran en el intestino de las ostras y otros bivalvos que se alimentan por filtración, lo que aumenta el riesgo de infección para los humanos que ingieren. Este microorganismo causa gastroenteritis y los síntomas que se presentan son dolor abdominal severo, náuseas, vómito, fiebre, dolor de cabeza y diarrea, la cual persiste hasta ocho días, en casos severos la diarrea es acuosa con moco y sangre, y pueden presentarse cuadros de deshidratación, hipotensión y acidosis. La dosis infectiva es de 10^3 UFC/ml, el periodo de infección es de 12-24 horas.

METODOLOGIA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL *Vibrio parahaemolyticus*. ⁽³⁾

Se dividieron las muestras en dos tratamientos: muestras lavadas y sin lavar. Se pesó asépticamente 25 g del

contenido homogenizado de aproximadamente 6 moluscos, directamente en una bolsa de polietileno previamente tarada. Se añadieron 225 mL de agua peptonada con 3% de NaCl y se homogenizó durante 2 minutos en el Stomacher a 260 rpm, esta fue la dilución 1:10 (10^{-1}). A partir de esta dilución madre se realizaron tres diluciones más hasta preparar el factor de dilución 10^{-4} . Se incubaron las cuatro diluciones anteriormente preparadas de 18 a 24 horas a 37°C. Posteriormente se sembró en placas con agar TCBS, con ayuda de un asa

previamente esterilizada, se incubaron todas las placas a una temperatura de 35°C por 24 horas. Se contaron únicamente las colonias características de *Vibrio parahaemolyticus* (colonias redondas, opacas, verdes o azuladas, de 2 a 3 mm de diámetro). Reportando como UFC/ml.

Se transfieren colonias características de *Vibrio parahaemolyticus* a placas de TSA con 3% de NaCl incubando a 37°C por 24 horas, de las placas se tomaron muestras para realizar tinción al Gram y pruebas bioquímicas.

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Tabla N°1: Parámetros de verificación de la guía de inspección.

Ítem	Parámetros a verificar en los manipuladores y en el producto	Época lluviosa		Época seca	
		Si	No	Si	No
1	El vendedor posee uñas cortas	8	9	10	7
2	El vendedor porta Vestimenta limpia	13	4	14	3
3	Al vendedor se le observan heridas a simple vista	0	17	2	15
4	El vendedor utiliza joyas (anillos, pulseras, reloj, otros)	3	14	4	13
5	El vendedor utiliza guantes para manipular el producto.	0	17	0	17
6	El puesto de venta posee un ambiente limpio	11	6	10	7
7	Existe algún procedimiento de limpieza en el producto previo a la venta	0	17	4	13
8	El molusco se encuentra almacenado junto con otros productos	1	16	0	17
9	Los moluscos se encuentran almacenados a una temperatura adecuada (con hielo alrededor)	5	12	10	7
10	Los moluscos están protegidos del sol	16	1	4	13

Cuadro N°1: Procedencia de *Anadara tuberculosa* comercializada en el muelle del puerto de La Libertad.

Parámetros a verificar en el producto	Bahía de Jiquilisco	puerto El Triunfo	La Libertad
Procedencia del molusco	10	6	1

Cuadro N°2: Tiempo promedio de venta de la especie *Anadara tuberculosa* en el muelle del puerto de La Libertad.

Parámetros a verificar en el producto	Tiempo en horas
Tiempo promedio de la venta total del molusco	4 - 8

Cuadro N°3: Tipo de embalaje utilizado para entrega del producto.

Parámetros a verificar en el producto	Papel periódico con bolsa plástica	Bolsa plástica
Tipo de embalaje que utiliza para la entrega del producto	5	12

Tabla N°2: Conteo de colonias de las muestras limpias y muestras sin limpiar en agar TCBS 35°C/24h en época lluviosa.

Código de muestras	Muestras Limpias	Muestras sin limpiar	Numero de colonias
	Dilución	Dilución	
MB01	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB02	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB03	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB04	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB05	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB06	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB07	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB08	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB09	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB10	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB11	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB12	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB13	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB14	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB15	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB16	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC
MB17	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	DNPC

*MB=Muestra de bivalvo

*DNPC= Demasiado numeroso para contar

Tabla N°3: Microorganismos identificados por medio de las pruebas bioquímicas muestras lavadas y muestras sin lavar en época lluviosa.

Época lluviosa			
Microorganismos	Muestras		Procedencia
	Lavadas	Sin Lavar	
<i>Aeromona hydrophila</i>	8	7	La Libertad, Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. vulnificus</i>	4	4	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. alginolyticus</i>	5	5	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
No identificado	0	1	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo

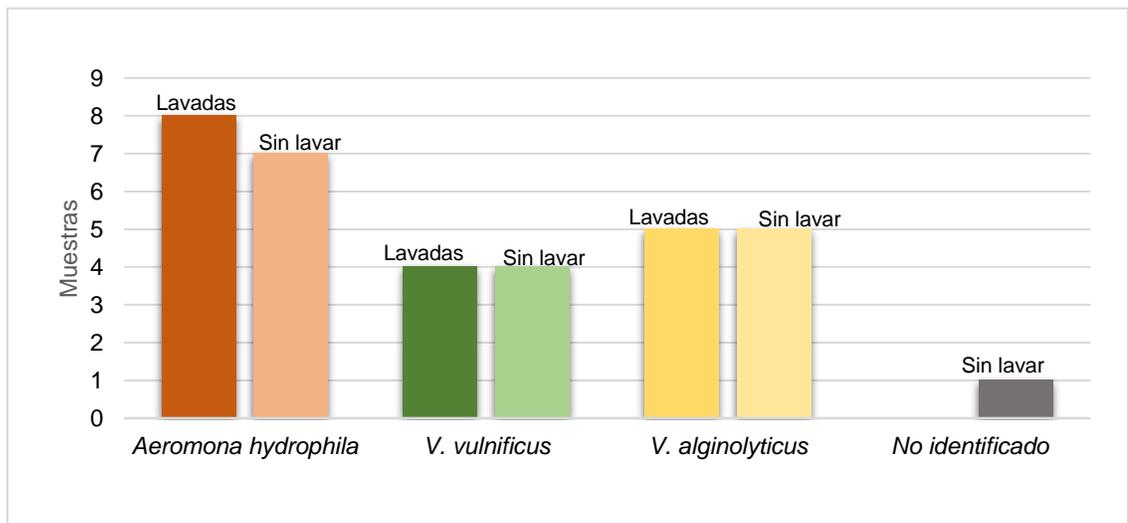


Figura N°1: Microorganismos identificados en muestra recolectadas en época lluviosa.

Tabla N°4: Resultados obtenidos en el recuento de colonias para cada muestra analizada, durante la época seca.

Código de muestras	Muestras Limpias			Muestras Sin limpiar		
	Dilución	N° de colonias sospechosa	Recuento en UFC/ml 35°C/24h	Dilución	N° de colonias sospechosa	Recuento en UFC/ml 35°C/24h
MB01	10 ⁻⁴	29	2.9x10 ⁶	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC
MB02	10 ⁻⁴	2	2.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	13	1.3x10 ⁶
MB03	10 ⁻⁴	4	4.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	7	7.0x10 ⁵
MB04	10 ⁻⁴	22	2.2x10 ⁵	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC
MB05	10 ⁻⁴	3	3.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	6	6.0x10 ⁵
MB06	10 ⁻⁴	28	2.8x10 ⁶	10 ⁻⁴	17	1.7x10 ⁶

Tabla N° 4: Continuación

MB07	10 ⁻⁴	23	2.3x10 ⁵	10 ⁻⁴	4	4.0x10 ⁵
MB08	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC	10 ⁻⁴	34	3.4x10 ⁶
MB09	10 ⁻⁴	9	9.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	15	1.5x10 ⁶
MB10	10 ⁻⁴	9	9.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	21	2.1x10 ⁶
MB11	10 ⁻⁴	5	5x10 ⁵	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC
MB12	10 ⁻⁴	17	1.7x10 ⁶	10 ⁻⁴	10	1.0x10 ⁶
MB13	10 ⁻⁴	2	2.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	4	4.0x10 ⁵
MB14	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC	10 ⁻⁴	2	2.0x10 ⁵
MB15	10 ⁻⁴	8	8.0x10 ⁵	10 ⁻⁴	31	3.1x10 ⁶
MB16	10 ⁻⁴	15	1.5x10 ⁶	10 ⁻⁴	12	1.2x10 ⁶
MB17	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC	10 ⁻⁴	157	1.6x10 ⁷
MB11	10 ⁻⁴	5	5x10 ⁵	10 ⁻⁴	DNPC	DNPC

*MB=Muestra de bivalvo

*DNPC= Demasiado numeroso para contar

*UFC/mL= Unidades formadoras de colonias por mililitro

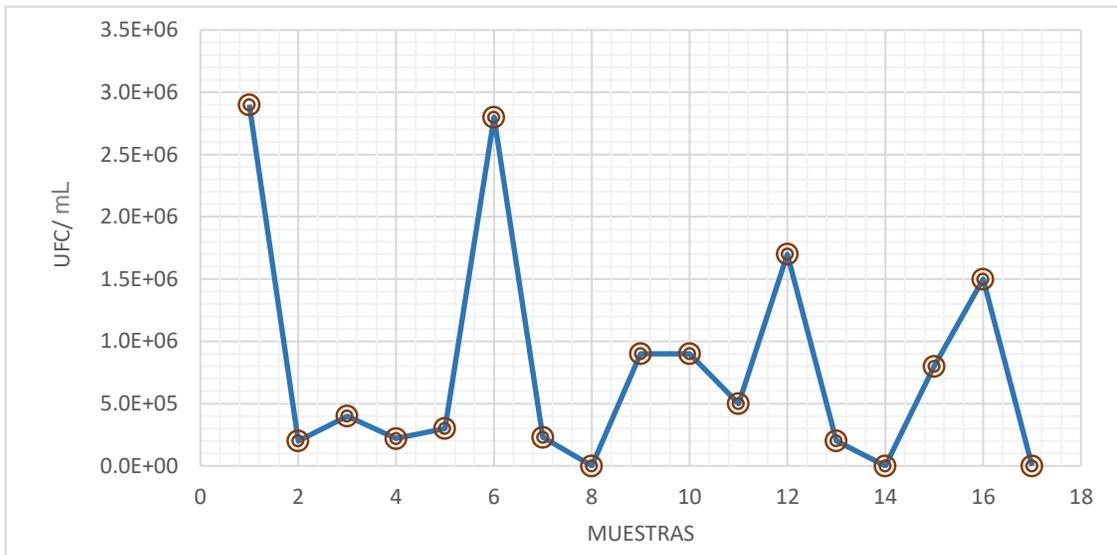


Figura N°2: Grafica sobre el conteo de colonias presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de bivalvos limpios en época seca del año 2020 procedentes del muelle del puerto de La Libertad.

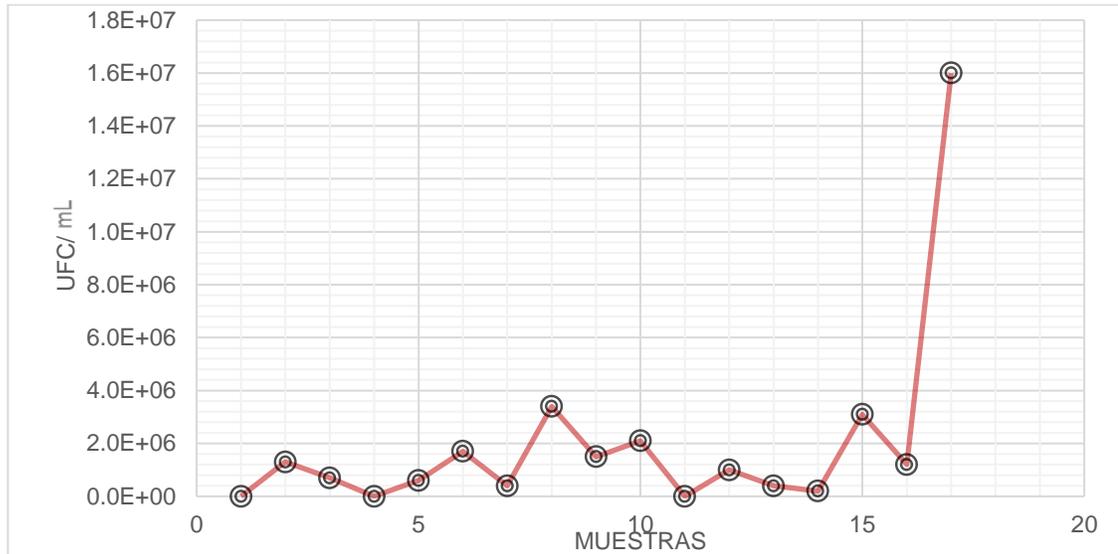


Figura N°3: Grafica sobre el conteo de colonias presuntivas de *Vibrio parahaemolyticus* en muestras de bivalvos sin limpiar en época seca del año 2020 procedentes del muelle del puerto de La Libertad.

Tabla N°5: Total de microorganismos identificados por medio de las pruebas bioquímicas para muestras limpias y sin limpiar.

Época Seca			
Microorganismos	Muestras		Procedencia
	Lavadas	Sin Lavar	
<i>Aeromona hydrophila</i>	3	3	La Libertad, Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. Vulnificus</i>	9	11	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	3	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
No identificado	2	0	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo

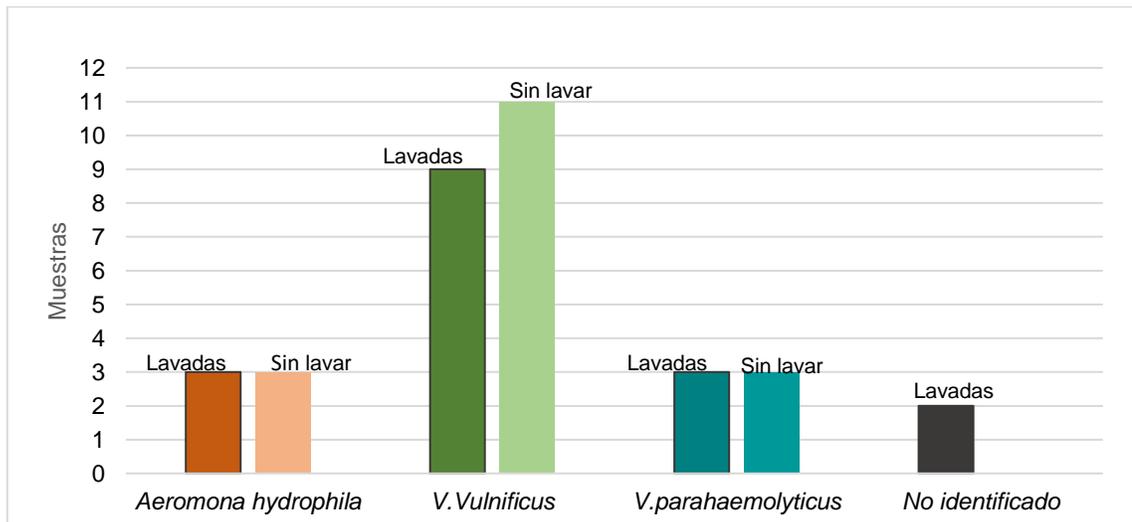


Figura N°4: Microorganismos identificados en las 17 muestra analizadas en época seca.

Tabla N°6: Microorganismos identificados durante toda la investigación.

Época lluviosa y época seca			
Microorganismo	Muestras		Procedencia
	Lavadas	Sin lavar	
<i>Aeromonas hydrophila</i>	11	10	La Libertad, Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. vulnificus</i>	13	15	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. alginolyticus</i>	5	5	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>V. parahaemolyticus</i>	3	3	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo
<i>No identificado</i>	2	1	Bahía de Jiquilisco y puerto El Triunfo

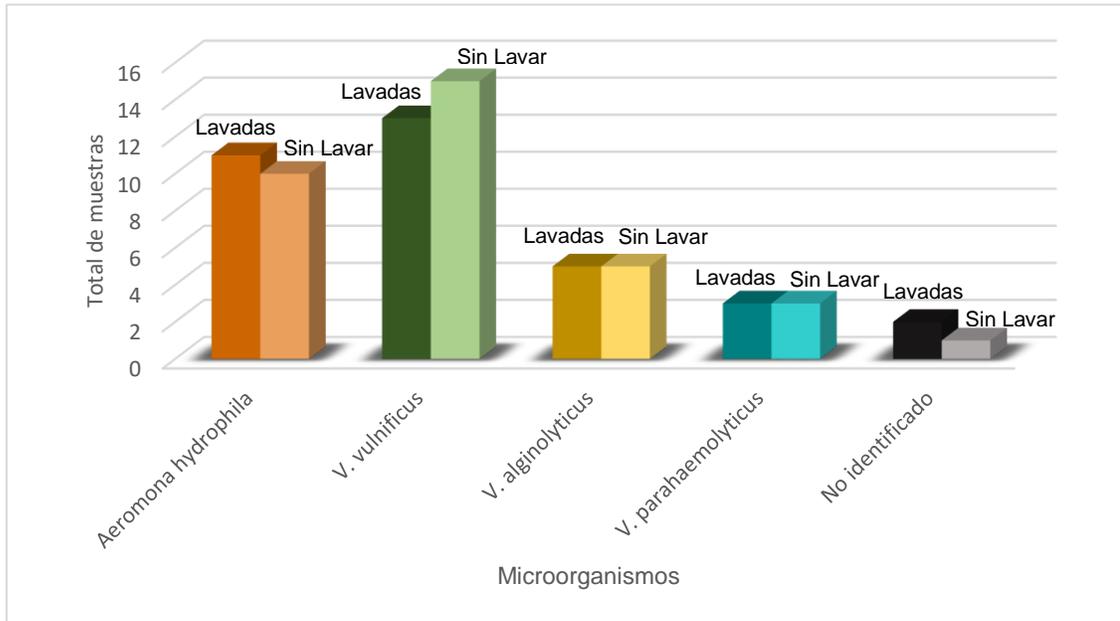


Figura N°5: Total de microorganismos identificados a lo largo de toda la investigación.

La tabla N°1 refleja los resultados de la guía de inspección, desarrollada a cada vendedor que comercializa el producto de interés (concha peluda) realizada durante la época lluviosa y época seca, en este cuadro se plasman únicamente los parámetros de higiene que practican cada uno de los manipuladores junto con la capacidad que poseen los vendedores para mantener un almacenamiento óptimo del producto en investigación, durante el tiempo de comercialización, al tener los resultados de la guía de inspección para ambas épocas, se observó una pequeña variante en los parámetros tomados, entre los cuales resaltan, que durante la época lluviosa los vendedores mantuvieron un ambiente higiénico más adecuado durante su

venta, es decir tenían los puestos de venta más limpios, no presentaban heridas en sus manos y tenían las conchas a una temperatura más adecuada para su venta, a pesar de estas pequeñas diferencias de higiene no se puede decir que son suficientes para tener productos inocuos y libres de contaminantes (la temperatura a la que se encuentra el molusco a la hora de la venta, no evita el crecimiento del *Vibrio parahaemolyticus*) y contaminación cruzada.

En cuanto al almacenamiento de los productos, si observamos que los vendedores tienen el cuidado de separar los productos de venta de acuerdo con su especie, se observó

que no mantienen los requerimientos mínimos de temperatura y humedad ya que de acuerdo a la bibliografía consultada la temperatura recomendada para almacenar los moluscos bivalvos y evitar la proliferación del *Vibrio parahaemolyticus* debe de ser debajo de 5°C ⁽⁸⁾ y arriba de 43°C y al mismo tiempo descuidan también otros factores que pueden causar contaminación cruzada entre estos tenemos:

- Utilizar huacales de aluminio como contenedores en lugar de utilizar hieleras con cierre hermético.
- Los espacios de cada local no están separados adecuadamente, es decir, no tienen una construcción adecuada que permita dividir cada puesto entre sí;
- Y por último y no menos importante: los productos están expuestos a la intemperie por lo que están teniendo contacto con moscas y otros contaminantes.

Aclaremos que se analizaron un total de 34 muestras (17 muestras para época lluviosa y otras 17 muestras para época seca) adquiridas en los 17 establecimientos fijos que comercializan la especie *Anadara tuberculosa* en el muelle del puerto de

La Libertad, Las muestras se dividieron en dos tratamientos: muestras lavadas y sin lavar. Como resultado la tabla N°9 y figura N°5 indican que en toda la investigación se logró aislar al *Vibrio Vulnificus* en 28 muestras y como segundo microorganismo relevante la *Aeromona hydrophila* en 21 muestras, se puede ver con estos resultados que el *Vibrio parahaemolyticus* no es un microorganismo predominante en la especie *Anadara tuberculosa* ya que solo se aisló en 6 muestras durante toda la investigación, en cuanto a las placas donde se identificó *Vibrio parahaemolyticus* (MB05, MB10 y MB15) se observó un mayor crecimiento en las muestras sin lavar, esto nos comprueba que al realizar un procedimiento de limpieza solo con agua y un cepillo se reduce la carga microbiana significativamente.

El RTCA 67.04.50:08 del año 2009, ubica al microorganismo (*Vibrio parahaemolyticus*) en categoría de riesgo 8, donde señala un límite máximo permitido de 1×10^3 UFC/mL. En nuestro caso, de las 34 muestras analizadas solo en 6 se confirmó la presencia de este microorganismo y ninguno cumple con el parámetro establecido ya que se obtuvieron valores a partir de 10^5 UFC/mL.

Cada microorganismo encontrado en los análisis realizados, si bien no están contemplados en el RTCA 67.04.50:08 del año 2009 de alimentos para la especie bivalva, es de suma importancia conocer un poco sobre las diversas enfermedades que pueden estar generando el consumo de alimentos contaminados; por tal razón se menciona puntualmente un poco sobre cada microorganismo y sus efectos a la salud al consumirlos:

- El *Vibrio vulnificus* es una bacteria común en el agua de los estuarios de climas tropicales, puede estar presente en alimentos de origen marino como los bivalvos y pescados, causa tres cuadros clínicos en humanos: septicemia, gastroenteritis e infección en heridas. Por otro lado, las personas saludables tienen un riesgo menor de infección por el *Vibrio vulnificus* la mayoría de las enfermedades de *Vibrio vulnificus* ocurren durante los meses de verano. ^{(15) (18)}
- La especie *Aeromonas hydrophila* se clasificó en la familia Vibrionaceae; sin embargo, se reclasificó posteriormente en la familia Aeromonadaceae, que son bacilos gramnegativos móviles, la *Aeromonas hydrophila* es una bacteria que está en agua dulce o salada, como lagos, ríos, embalses y estuarios, y es más frecuente en

climas cálidos; también puede contaminar el suelo húmedo, resiste el calor, el frío y el cloro. Algunas cepas de *Aeromonas hydrophila* (la más frecuente) producen una toxina llamada aerolisina, que causa daño tisular. La infección se produce cuando las bacterias que producen la toxina aerolisina entran en un área de la piel lesionada. Las infecciones humanas causadas por *Aeromonas hydrophila* son raras e incluyen enfermedades gastrointestinales, infecciones de la piel y de los tejidos blandos. ⁽¹³⁾

- El *Vibrio alginolyticus* es un organismo del mar y estuarios, su distribución es mundial por lo general en costas de países templados, se encuentra en cualquier organismo marino como: peces, almejas, ostiones, corales, entre otros. Los signos y síntomas en el hombre se deben a la ingesta de productos marinos crudos o insuficientemente cocidos, producen un cuadro gastrointestinal asociado a la ingestión de productos marinos contaminados.

Se comprueba mediante esta información que los *Vibrios* de acuerdo a su especie y familia tienen diferentes exigencias para su crecimiento y su desinanciación, por ejemplo, en nuestra investigación encontramos que el *vibrio vulnificus*

se encuentra de forma abundante durante todo el año y para el caso del *vibrio parahaemolyticus* únicamente lo logramos identificar en época seca.

Por tanto, consideramos que este microorganismo es estacional, propio de la época seca y su prevalencia está sujeta a los cambios climáticos; también se confirma que es un microorganismo autóctono de lugares como los esteros, bahías y manglares, cuyas condiciones de proliferación son bien específicas. Es relevante traer a discusión las últimas actualizaciones del RTCA 67.04.50:08 de alimentos, en donde el *Vibrio parahaemolyticus* ya no figura como un microorganismo patógeno de interés en las especies bivalvas, se cree en base a esta investigación que uno de los motivos que ha llevado al ente regulador a tomar estas nuevas disposiciones sobre este tipo de alimento es el decremento de la presencia de este microorganismo en la concha peluda. ⁽¹¹⁾ Más adelante se concluyen las posibles razones que están ocasionando la aparente extinción de este microorganismo.

CONCLUSIONES

1. La falta de interés de los comerciantes por realizar las buenas prácticas higiénicas genera una contaminación cruzada, lo cual influye en que los

alimentos no sean inocuos y aptos para consumo humano.

2. El almacenamiento de los productos de venta no es el adecuado, ninguno de los puestos posee cámaras frigoríficas debido a la falta de conocimiento sobre la temperatura adecuada a la cual deben mantenerse los productos marinos durante la comercialización.
3. Los productos muestreados en el muelle del puerto de La Libertad eran provenientes de La Bahía de Jiquilisco, del puerto El Triunfo, y de un proveedor local, este dato se conoce ya que fue un punto tomado en cuenta en la guía de inspección realizada a cada comerciante.
4. Únicamente 6 de las muestras analizadas presentaron *Vibrio parahaemolyticus*, no se considera un resultado alarmante que pueda generar intoxicación en la población.
5. De los 6 tratamientos analizados con presencia de *Vibrio parahaemolyticus* ninguno cumple con el límite máximo permitido por el RTCA 67.04.50:08 de alimentos que define 10^3 UFC/mL para este

microorganismo, en los análisis obtuvimos recuentos mayores a este límite los cuales fueron 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/mL. ⁽²⁵⁾

6. El proceso de limpieza que se implementó en las valvas de las conchas recolectadas durante la época lluviosa y época seca no permite eliminar completamente la presencia del *Vibrio parahaemolyticus* y de los demás microorganismos identificados en la investigación, pero si reduce la carga microbiana, esto en base a la comparación de resultados del recuento de las colonias de los diferentes tratamientos.
7. Se identificó una diversidad de microorganismos debido a que los manglares de la Bahía de Jiquilisco y del puerto El Triunfo (lugar de procedencia de las muestras) presentan nutrientes que favorece el desarrollo de una diversidad de microorganismos, con requerimientos específicos de temperatura, pH y salinidad.
8. El informe de resultados dirigidos a la defensoría del consumidor tiene como fin informar que el microorganismo en estudio ya no es predominante en el molusco bivalvo *Anadara tuberculosa*, y advertir que debe mantenerse un monitoreo del cumplimiento de las

buenas prácticas higiénicas sobre los alimentos que se comercializan en el muelle del puerto La libertad.

RECOMENDACIONES

1. Desarrollar más capacitaciones y charlas dirigida a los comerciantes por parte de la unidad de salud, acerca de buenas prácticas de higiene y almacenamiento de productos marinos crudos.
2. Sugerir a los comerciantes que soliciten a la alcaldía de La Libertad una mejora en la infraestructura de los diferentes puestos, con el fin de brindar un ambiente más limpio y garantizar que el producto comercializado cumpla con las normas de higiene.
3. Almacenar los productos marinos adecuadamente en cada uno de los puestos de venta, y cumplir con las temperaturas óptimas que interrumpen el crecimiento de cualquier microorganismo patógeno en los productos de pesca.
4. Sugerir a la Dirección General de Desarrollo de la Pesca y Acuicultura invertir en lugares de cultivo de diferentes especies de moluscos bivalvos, en donde se

garanticen las condiciones sanitarias y un monitoreo estricto de calidad.

microorganismo *Vibrio parahaemolyticus* o los que se deseen estudiar, a partir de una muestra de interés.

5. Limpiar las valvas de la concha antes de consumirla y almacenarlas a una temperatura abajo de los 5°C con el fin de interrumpir la proliferación microbiana presente en el producto.
6. Considerar como factor crítico el tiempo de incubación del *Vibrio parahaemolyticus*, para la detección y la cuantificación de este microorganismo, se requiere un crecimiento que genere datos reproducibles y que permita aislar cepas de diferentes tipos de *Vibrios*.
7. Desarrollar en futuras investigaciones un estudio con muestras directamente provenientes de la bahía de Jiquilisco, donde se determinen las condiciones ambientales que puedan estar potencializando la prevalencia de todas las especies de *Vibrios* encontrados en esta investigación.
8. Revisar el método de cuantificación con el fin de hacerlo más específico para el

ANEXO

RTCA 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS del año 2009.

Todos los alimentos se clasifican basándose en la probabilidad de causar daño a la salud de las personas, la gravedad de dicho efecto y los factores de riesgo:

- Alimento Riesgo tipo A: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una alta probabilidad de causar daño a la salud.
- Alimento Riesgo tipo B: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una mediana probabilidad de causar daño a la salud.
- Alimento Riesgo tipo C: Comprende los alimentos que por su naturaleza, composición, proceso, manipulación y población a la que va dirigida, tienen una baja probabilidad de causar daño a la salud.

De acuerdo con la clase de peligro determinado por las variables antes señaladas y por aquellas relacionadas a las condiciones de manipulación y consumo, se establecen las siguientes categorías de riesgo asociadas al alimento y al microorganismo:

- Las categorías 1, 2 y 3 se aplican a aquellos microorganismos que tiene por objeto definir la vida útil y alteración del producto como recuento de microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras, lactobacillus, entre otros.
- Las categorías 4, 5 y 6 se usan para microorganismos indicadores tales como coliformes totales, enterobacteriáceas, entre otros.
- Las categorías de alimentos 7, 8 y 9 se usan en parámetros microbiológicos que siendo considerados patógenos, en bajos niveles pueden aceptarse, tales como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

- La categoría 10 se emplea en otros microorganismos considerados peligrosos como Salmonella, entre otros.

Tabla N°7: Parámetros establecidos por el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50.08

9.0 Grupo de Alimento: Pescado, derivados y productos marinos. Esta amplia categoría se subdivide en categorías para el pescado fresco y para diversos productos marinos elaborados. Se incluyen en ella los vertebrados acuáticos y mamíferos acuáticos (p.ej., ballenas), los invertebrados acuáticos (p.ej., medusas), los moluscos (p.ej., almejas y caracoles), los crustáceos (p.ej., camarones, cangrejos y langostas). Los productos marinos se pueden recubrir, p.ej., con glaseados o especias, antes de su comercialización para el consumo (p.ej., filetes de pescado congelados y glaseados). En el SCA esto se indica con una anotación relativa al “uso como glaseado o recubrimiento (tratamiento de superficie)”			
9.1 Subgrupo de alimentos: Pescado y productos marinos frescos, congelados, incluidos moluscos, crustáceos y equinodermos empacados.			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite Máximo permitido
<i>Escherichia coli</i>	4	A	10 ² UFC/g
<i>Staphylococcus aureus</i> (solo para pescados)	7		10 ³ UFC/g
<i>Salmonella sp</i> /25 g	10		Ausencia
<i>Listeria monocytogenes</i> /25 g (solo para producto crudo listo para consumo ejemplo, sushi y ceviche)	10		Ausencia
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (solo para moluscos bivalvos)	8		10 ³ UFC/g

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0. CONCLUSIONES

1. La falta de interés de los comerciantes por realizar las buenas prácticas higiénicas genera una contaminación cruzada, lo cual influye en que los alimentos no sean inocuos y aptos para consumo humano.
2. El almacenamiento de los productos de venta no es el adecuado, ninguno de los puestos posee cámaras frigoríficas debido a la falta de conocimiento sobre la temperatura adecuada a la cual deben mantenerse los productos marinos durante la comercialización.
3. Los productos muestreados en el muelle del puerto de La Libertad eran provenientes de La Bahía de Jiquilisco, del puerto El Triunfo, y de un proveedor local, este dato se conoce ya que fue un punto tomado en cuenta en la guía de inspección realizada a cada comerciante.
4. Únicamente 6 de las muestras analizadas presentaron *Vibrio parahaemolyticus*, no se considera un resultado alarmante que pueda generar intoxicación en la población.
5. De los 6 tratamientos analizados con presencia de *Vibrio parahaemolyticus* ninguno cumple con el límite máximo permitido por el RTCA 67.04.50:08 de alimentos que define 10^3 UFC/mL para este microorganismo, en los análisis obtuvimos recuentos mayores a este límite los cuales fueron 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/mL. ⁽²⁵⁾
6. El proceso de limpieza que se implementó en las valvas de las conchas recolectadas durante la época lluviosa y época seca no permite eliminar completamente la presencia del *Vibrio parahaemolyticus* y de los demás microorganismos identificados en la investigación, pero si reduce la carga microbiana, esto en base a la comparación de resultados del recuento de las colonias de los diferentes tratamientos.
7. Se identificó una diversidad de microorganismos debido a que los manglares de la Bahía de Jiquilisco y del puerto El Triunfo (lugar de procedencia de las muestras) presentan nutrimentos que favorece el desarrollo de una diversidad

de microorganismos, con requerimientos específicos de temperatura, pH y salinidad.

8. El informe de resultados dirigidos a la defensoría del consumidor tiene como fin informar que el microorganismo en estudio ya no es predominante en el molusco bivalvo *Anadara tuberculosa*, y advertir que debe mantenerse un monitoreo del cumplimiento de las buenas prácticas higiénicas sobre los alimentos que se comercializan en el muelle del puerto La libertad.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Desarrollar más capacitaciones y charlas dirigida a los comerciantes por parte de la unidad de salud, acerca de buenas prácticas de higiene y almacenamiento de productos marinos crudos.
2. Sugerir a los comerciantes que soliciten a la alcaldía de La Libertad una mejora en la infraestructura de los diferentes puestos, con el fin de brindar un ambiente más limpio y garantizar que el producto comercializado cumpla con las normas de higiene.
3. Almacenar los productos marinos adecuadamente en cada uno de los puestos de venta, y cumplir con las temperaturas óptimas que interrumpan el crecimiento de cualquier microorganismo patógeno en los productos de pesca.
4. Sugerir a la Dirección General de Desarrollo de la Pesca y Acuicultura invertir en lugares de cultivo de diferentes especies de moluscos bivalvos, en donde se garanticen las condiciones sanitarias y un monitoreo estricto de calidad.
5. Limpiar las valvas de la concha antes de consumirla y almacenarlas a una temperatura abajo de los 5°C con el fin de interrumpir la proliferación microbiana presente en el producto.
6. Considerar como factor crítico el tiempo de incubación del *Vibrio parahaemolyticus*, para la detección y la cuantificación de este microorganismo, se requiere un crecimiento que genere datos reproducibles y que permita aislar cepas de diferentes tipos de *Vibrios*.
7. Desarrollar en futuras investigaciones un estudio con muestras directamente provenientes de la bahía de Jiquilisco, donde se determinen las condiciones ambientales que puedan estar potencializando la prevalencia de todas las especies de *Vibrios* encontrados en esta investigación.
8. Revisar el método de cuantificación con el fin de hacerlo más específico para el microorganismo *Vibrio parahaemolyticus* o los que se deseen estudiar, a partir de una muestra de interés

9. Investigar en un próximo trabajo de graduación la presencia del *Vibrio vulnificus* y/o la *Aeromonas hydrophila* en la especie *Anadara tuberculosa* (concha peluda) y relacionar el límite máximo permitido de consumo con el grado de patogenicidad en el huésped.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ayala, Patricia; Santos, Mercedes (2011). Determinación de la calidad microbiológica de los cocteles de conchas y de camarones, que se comercializan en los comedores de los tres mercados del distrito cinco de la zona metropolitana de san salvador, Trabajo de Graduación, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
2. BD Diagnostic Systems (2003), Instrucciones de uso, medios en placa listos para usar. PA-254432.02
3. Benavides, Heydi (2017). Propuesta de guía de aplicación de técnicas de microbiología (bacterias y hongos) para ser utilizado en microbiología general. Trabajo de graduación para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. San Salvador. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/4768/1/16100029.pdf>
4. Chikami, Satoshi; Chavéz José; Saito, Takashi, (2007), Guía para Modelo de Mejoramiento de la Calidad de Vida de los Pescadores Artesanales a través del Cultivo de Engorde de Curil o Concha (*Anadara tuberculosa*), CENDEPESCA, El Salvador. Disponible en: https://www.jica.go.jp/project/el_salvador/2271029E1/materials/pdf/2007/2007_10_01.pdf
5. Claros Márquez, Dolores del Carmen, (2007), detección e identificación de especies patógenas del género *Vibrio* en el estero de jaltepeque, utilizando como bioacumulador a *Anadara spp*, Trabajo de Graduación, Universidad de El Salvador, Facultad de Biología.
6. Dabanch, Jeannette; Herrero, Diego; Pavéz, Claudia; Veas, Nicolás; Braun, Stephanie y Porte, Lorena (2009). Bacteriemia por *Vibrio parahaemolyticus*: Reporte de caso y revisión de la literatura. Chile 4,360362. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071610182009000500011.
7. FAO/OMS (2003). Evaluación de riesgos de *Campylobacter spp.* en pollos para asar y *Vibrio spp.* en pescados y mariscos, Roma. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y8145s/y8145s00.htm#Contents>.

8. Flores, T (2013). Fundamento de la prueba bioquímica Voges Proskauer, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann facultad de ciencias, Tacna, Perú. Disponible en: https://edoc.tips/download/prueba-de-voges-proskauer-thalia_pdf
9. Food and Drug Administration FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Chapter 9: *Vibrio*, 2004. 8ed. E.E.U.U. Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>.
10. García, Isabel. Diagnóstico de las infecciones humanas causadas por especies halófilas del género *Vibrio*. Servicio de Microbiología, Hospital de Getafe.
11. Gavilán, Ronnie; Martínez, Jaime (2011). Factores ambientales vinculados con la aparición y dispersión de las epidemias de *Vibrio* en América del Sur, Revista Perú.
12. Guzmán, Rosa; Hernández, Rosa; Contreras, Araceli (2016) Retrato Microbiológico, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México.
13. Hernández, Karla; Sedas, Violeta; Williams, José (2014). Evaluación del riesgo microbiológico a *Vibrio spp.* en alimentos de origen marino en México, Artículo de revisión.
14. Karla M López-Hernández, Violeta T Pardío-Sedas, José de Jesús Williams (2014). Evaluación del riesgo microbiológico a *Vibrio spp.* en alimentos de origen marino en México, Artículo de revisión.
15. Letchumanan, Vengadesh; Chan Kok-Gan; Khan, Tahir; Bukhari, Sarah; Mutalib, Nurul y Goh, Bey-Hing (2017). La detección de bilis: la activación de la virulencia de *Vibrio parahaemolyticus*. China, 8, 728.
16. Mac Faddin, Jean (2003). Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana S.A, disponible en: <https://books.google.com.pe/book?id=FY>

WSzy7EjR0C&printsec=frontcover#v=onepage&q&f=false.

17. Martínez, Liliana; Romero, María (2015). Evaluación de la calidad microbiológica de pescado crudo comercializado en el muelle del puerto de La Libertad. Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
18. Ministerio de Agricultura, (2017) *Vibrio parahaemolyticus* Ficha de peligros/ACHIPIA N°08/2017 ACHIPIA, Área Soporte al Análisis de Riesgo. Chile: Autor.
19. Ministerio de Salud (MINSAL), Dirección Vigilancia Sanitaria. (2019), Boletín Epidemiológico Semana 42 (del 13 al 19 de octubre de 2019). Sitio web: <https://www.salud.gob.sv/download/boletin-epidemiologico-semana-42-del-13-al19-de-octubre-de-2019/>
20. Moreno, S. Agar LIA (Lisina Hierro Agar). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Laboratorio de bacteriología médica, Disponible en: <https://es.scribd.com/document/289320967/Agar-LIA>.
21. Nava, L.; Parrilla, M.; Salcedo, N: Aislamiento de *Vibrio parahaemolyticus* de ostiones en México, D.F. mayo - junio 1981.
22. Odeyemi, O.A., & Stratev, D. (2016). Aparición de resistencia antimicrobiana de *Vibrio parahaemolyticus* en mariscos. Una mini reseña.
23. Olmos, Ana; García, Celia; Nieto, Juan; Ramos, Sylvia (2010). Métodos de identificación en el laboratorio de microbiología. España: Emilia Cerceno y Rafael Cantón. Disponible en: https://www.seimc.org/contenidos/documento_scientificos/procedimientosmicrobiologia/seimcprocedimientomicrobiologia37.pdf
24. Peña, Talía (2008). Recuento de *Vibrio parahaemolyticus* Kanagawa positivo en especies marinas de consumo en Lima Metropolitana y Callao. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA E.A.P DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. Lima – Perú.

25. Reglamento Técnico Centroamericano (2009). ALIMENTOS. CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS. RTCA 67.04.50:08, Anexo de resolución N°243-2009.
26. Rivera, Shirley (2008). Estudio de la presencia de *Vibrio sp.* En bivalvos Trabajo de Graduación, Universidad Dr. José Matías Delgado, Facultad de Agricultura e Investigación Agrícola. El Salvador.
27. Ruiz Zarzuela, Imanol; Trigo de Sousa Roque, Ana Margarita; Blas Giral, Ignacio, 2012, Epidemiología y cinética de crecimiento y supervivencia de *Vibrio parahaemolyticus* en moluscos bivalvos de interés comercial, Tesis Doctoral.
28. Santos, Esperanza (2014). “Dieta del “curil” *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) a partir del análisis de contenido estomacal e intestinal, en Bahía de Jiquilisco, Departamento de Usulután, El Salvador”.
29. San Cristóbal, Wally; Olea, Andrea; Cubillos, Viviana; Fernández, Jorge; Cabrera, Daniel; Hormazabal, Juan; Moreno, Julio y Ballesteros, Maldonado (2008). Aislamiento, Identificación y caracterización de *Vibrio parahaemolyticus*. Chile.
30. Sierralta, Chichizola, Verónica; Huatuco, Egm Mayta; León, Quispe, Jorge (2016) Primer Registro de *Plesiomonas shigelloides* como Patógeno Oportunista de Tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) en una Piscigranja de Lima, Perú.
31. Silva, Francisco; (2011) Retrato Microbiológico *Aeromonas spp*, Hospital Clínico Universidad de Chile Comité de Microbiología Sociedad chilena de Infectología.
32. Umaña Martínez, Mario Milton y otros. 2005. Estadísticas pesqueras y acuícolas. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Centro de Desarrollo Pesquero. Ed. Agricultura de El Salvador. Volumen 32, San Salvador, El Salvador.

33. Valtec, diagnostic. (2019), Medio L.I.A, A.V. Marathon 1943, Nuñoa, Santiago de Chile. Sitio web: <http://andinamedica.com.pe/wp-content/uploads/2016/08/MedioLIA.pdf>
34. Vázquez, Carlos; Mecalco, Gabriela; Ramírez, Irma. (2005) PATÓGENO OPORTUNISTA *Vibrio vulnificus* Revista Digital Universitaria Volumen 6 Número 4 ISSN: 1067-6079.
35. Yeung,Marie; Boor, Kathryn: Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Food bome *Vibrio parahaemolyticus* Infections, 2001.
36. Yukiko, Hara-Kudo; Kanji, Sugiyama; Mitsuaki, Nishibuchi; Ashrafuzzaman, Chowdhury; Jun, Yatsuyanagi; Yoshimitsu, Ohtomo; Akinobu, Saito; Hidetoshi, Nagano; Tokuhiko, Nishina, Nakagawa; Hirotaka, Konuma; Michiko, Miyahara y Susumu, Kumagai (2003). Prevalence of Pandemic Thermostable Direct HemolysinProducing *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 in Seafood and the Coastal Environment in Japan.
37. Yukiko, Hara-kudo; Tokuhiko, Nishina; Hiroshi, Nakagawa; Hirotaka, Konuma; Junko, Hasegawa y Usumu, Kumagai (2001). Improved Method for Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood. Japan, 5819–5823.
38. Zamora, Diana; Santiago, Carolina (2005). Un enemigo marino silencioso *Vibrio parahaemolyticus*. Digital universitaria, 6 (4), 1067- 6079.
39. Zavala, Moreno, Ariana; Quiñónez, Ramírez, Elsa, Irma; Vázquez, Salinas, Carlos. (2005) La vida oscura de *Vibrio alginolyticus*. Revista Digital Universitaria.
40. Zúñiga, Carrasco, Iván, Renato; Caro, Lozano, Janett (2014) *Vibrio vulnificus* una bacteria al acecho en las playas. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría Vol. XXVIII Núm. 11

ANEXOS

ANEXO N°1

IMAGEN SATELITAL Y CROQUIS DE UBICACIÓN DE LOS
ESTABLECIMIENTOS MUESTREADOS

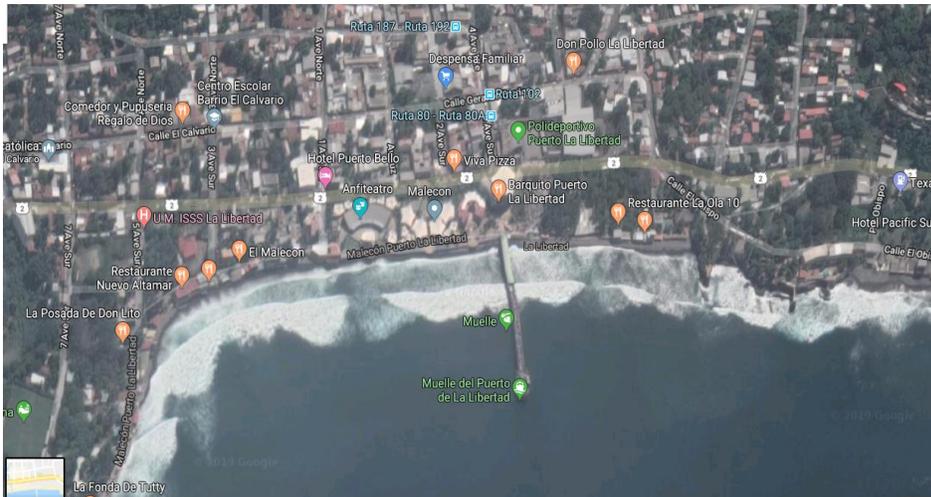


Figura N°28: Mapa de ubicación del muelle del puerto de La Libertad.

ANEXO N°2

BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO 2018 - 2019 Y ENFERMEDADES DIARREICAS EN EL SALVADOR POR DEPARTAMENTO AÑO 2019.

Tabla N°9: Boletín epidemiológico 2018 - 2019

N°	Evento	Semana	Acumulado		Diferencia absoluta	(% diferencial para el 2019)
		epidemiológica 42	2018	2019		
1	Casos con sospecha de dengue	640	6,636	24,045	17,409	(262)
2	Casos con sospecha de Chikungunya	6	317	610	293	(92)
3	Casos con sospecha de Zika	9	227	707	480	(211)
4	Infección respiratoria aguda	43,235	1,531,287	1,594,485	63,198	(4)
5	Neumonías	675	24,305	31,950	7,645	(31)
6	Diarrea y gastroenteritis	4,199	295,723	306,537	10,814	(4)
7	Fiebre tifoidea	4	1,343	1,443	100	(7)
8	Hepatitis aguda A	12	860	694	166	(-19)
9	Parotiditis infecciosa	15	202	2,087	1,885	(933)
10	Enfermedad febril eruptiva	9	457	503	46	(10)
11	Paludismo confirmado*	0	1	1	0	(0)

*Casos importados

Tabla N°10: Cuadros por enfermedades diarreicas en El Salvador por departamento hasta la Semana 42 (del 13 al 19 de octubre de 2019)

Departamentos	Total general	Tasa x 100,000
San Salvador	125,556	7,146
La Libertad	42,356	5,276
San Miguel	22,173	4,460
San Vicente	8,191	4,378
Chalatenango	8,574	4,056
Usulután	15,377	4,010
Cabañas	6,312	3,711
Sonsonate	16,057	3,382
Santa Ana	19,871	3,263
La paz	11,417	3,258
La Unión	8,486	3,185
Morazán	6,410	3,078
Cuscatlán	7,862	2,797
Ahuachapán	7,895	2,238
Total General	306,537	4,679

ANEXO N°3

FORMATO DE LA GUÍA DE INSPECCIÓN PARA VERIFICAR LA PROCEDENCIA, MANIPULACIÓN Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LOS PUESTOS QUE COMERCIALIZAN EL MOLUSCO Y ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN PARA MUESTRAS.

Tabla N°11: Guía de inspección para verificar la procedencia, manipulación y condiciones de almacenamiento de los puestos que comercializan el molusco.



**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



Objetivo: Conocer las condiciones sanitarias y de almacenamiento del molusco bivalvo comercializado en el muelle del puerto de la libertad.

Parámetros a verificar en los manipuladores	Si	No	Observaciones
El vendedor posee uñas cortas			
El vendedor porta vestimenta limpia			
Al vendedor se le observan heridas a simple vista			
El vendedor utiliza joyas (anillos, pulseras, reloj, otros)			
El vendedor utiliza guantes para manipular el producto			
El puesto de venta posee un ambiente limpio			
Existe algún procedimiento de limpieza en el producto previo a la venta.			
El molusco se encuentra almacenado junto con otros productos			
Los moluscos se encuentran almacenados a una temperatura adecuada (con hielo alrededor)			
Los moluscos están protegidos del sol			

Tabla N°11: continuación

Parámetros a verificar en los manipuladores	Si	No	Observaciones
El utensilio para abrir las conchas está limpio			
El utensilio para abrir las conchas lo utilizan para manipular otros productos			
Parámetros a verificar en el producto	Respuesta abierta		
Procedencia de los moluscos			
Tiempo promedio de la venta total del molusco			
Tipo de embalaje que utilizan para la entrega del producto			



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA
ETIQUETA DE IDENTIFICACIÓN



Fecha de muestreo:	Hora de muestreo:	N° de muestreo:
Nombre de la muestra:		Cantidad de muestra:
Lugar de muestreo:		Código de la muestra:
Nombre del analista que realiza el muestreo:		
Nombre del analista que verifica el muestreo:		
Observaciones:		

Figura N°30: Etiqueta de identificación para muestras a analizar.

ANEXO N°4

PROCEDIMIENTO PREVIO A LA MANIPULACION DE LA MUESTRA



Figura N°31: Almacenamiento e identificación de las muestras.

ANEXO N°5

DESCRIPCIÓN DE MATERIALES, EQUIPOS, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN EL LABORATORIO.

EQUIPOS

- Autoclave
- Balanza semianalíticas
- Baño de María
- Cabina de flujo laminar
- Cocina con magneto
- Cuenta colonia
- Estufa
- Mecheros
- Micro pipetas de 100 μ L
- Micro pipetas de 1000 μ L
- Microscopio
- Refrigeradora
- Stomacher

MATERIALES

- Azas
- Azas en L
- Beackear de 100 mL
- Beackear de 250 mL
- Beackear de 5 L
- Bolsa para stomacher
- Bolsas plásticas
- Cajas herméticas plásticas
- Cucharas plásticas
- Cuchillos de acero
- Erlenmeyer 100 mL
- Erlenmeyer 250 mL
- Erlenmeyer 300 mL
- Erlenmeyer 500 MI
- Erlenmeyer 1000 mL
- Erlenmeyer 2000 mL
- Fósforos
- Gasas

- Gradillas para tubos
- Jeringas plásticas 20 mL
- KOH 40%
- Magnetos
- Mascones
- Papel de aluminio
- Papel filtro
- Papel para pesar
- Papel toalla
- Placas de Petri desechables
- Porta objetos
- Probeta 250 mL
- Probeta 500 mL
- Probeta 1000 mL
- Puntas plásticas para micro pipetas
- Tira química
- Tirro
- Toallas de tela
- Tubos con rosca 15 mL

MEDIOS DE CULTIVO

- Agar movilidad
- Agua peptonada
- Caldo de Indol
- LIA
- TCBS
- TSA
- TSI
- Voges proskauer

REACTIVOS

- α -naftol 5%
- Acetona
- Alcohol 70%
- Cloruro de sodio
- Cristal violeta
- kovac
- Lugol
- Safranina

ANEXO N°6

DETERMINACION Y CUANTIFICACION DEL *Vibrio parahaemolyticus*
POR EL METODO DE RECuento EN PLACA Y AISLAMIENTO EN
AGAR TSA.

Procedimiento:

Se dividió cada muestra en dos grupos de tratamiento: muestras lavadas y muestra sin lavar (para cada época).



Para las muestras con proceso de limpieza: se lavaron las valvas de las conchas con agua corriente fría y se utilizó un cepillo para retirar la suciedad externa. (Lodo, arena y otros).

Utilizando un cuchillo estéril por lote de muestra, se abrieron las conchas necesarias para el análisis, extrayendo así el molusco.



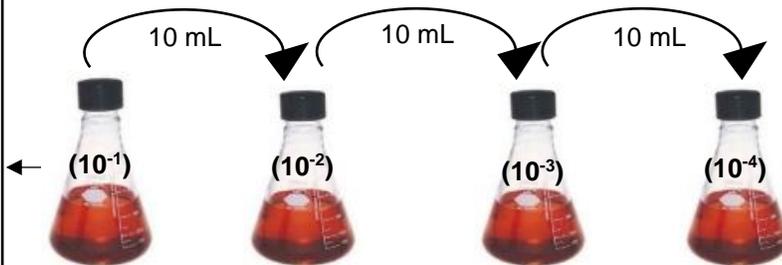
Se añadieron 225 mL de agua peptonada con 3% de NaCl y se homogenizó durante 2 minutos en el Stomacher a 260 rpm. Esta fue la dilución 1:10 (10^{-1}).

Por lote de muestra, se pesó asepticamente 25 g del contenido homogenizado de moluscos, directamente en una bolsa de polietileno previamente tarada.

Se transfirió a un Erlenmeyer estéril de 250 mL y se cubrió con papel aluminio, agitando por 1 minuto. (Dilución 1:10 (10^{-1})).

Se pipetearon 10 mL de la dilución 1:10 (10^{-1}) y se añadió a un Erlenmeyer que contenía 90 mL de agua peptonada con 3% de NaCl, agitando. Esta fue la dilución 1:100 (10^{-2}), se cubrió con papel aluminio, se agitó por 1 minuto. Se repite este procedimiento hasta formar la dilución 1:10000 (10^{-4}).

Se incubaron las cuatro diluciones anteriormente preparadas: 24 horas en época lluviosa y 90 minutos en época seca a 37°C.



Procedimiento: continuación

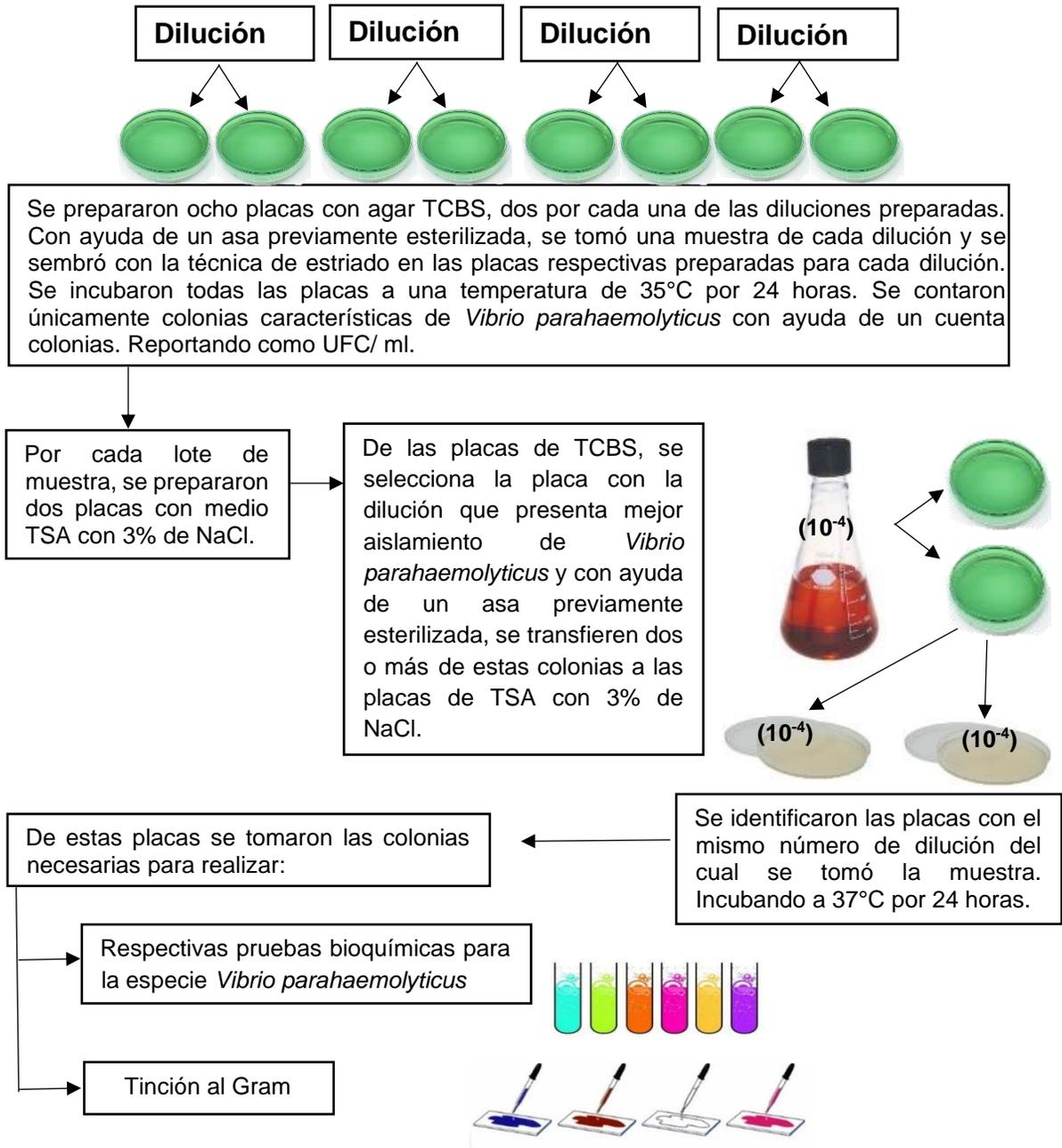


Figura N°32: Proceso para el desarrollo de la técnica, determinación y cuantificación del *Vibrio parahaemolyticus*.

ANEXO N°7

TINCIÓN AL GRAM Y PRUEBAS BIOQUÍMICAS PARA IDENTIFICACIÓN DE *Vibrio parahaemolyticus*, CON SUS RESPECTIVAS INTERPRETACIONES.

Tinción al Gram Bacterias gran negativas

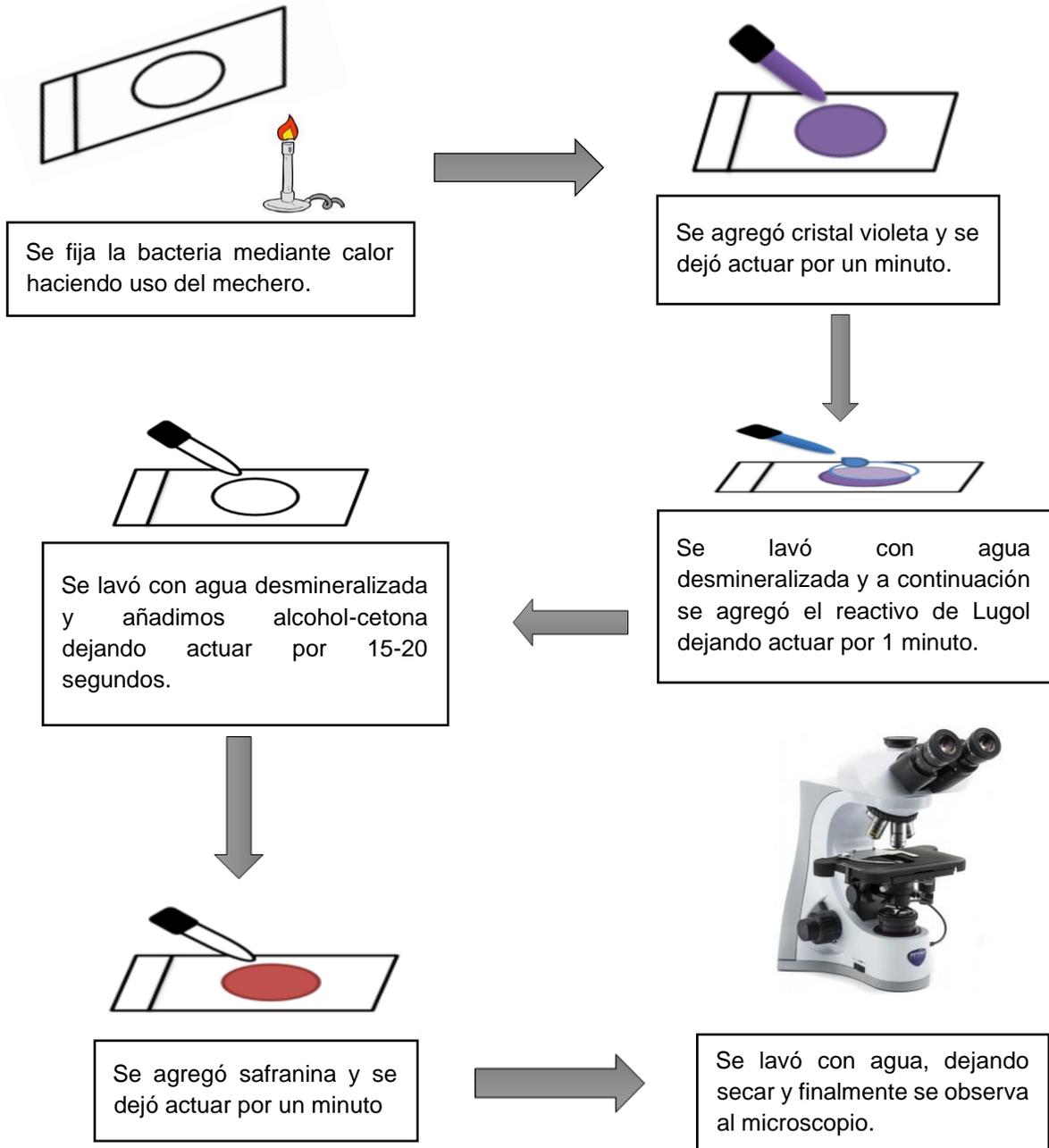
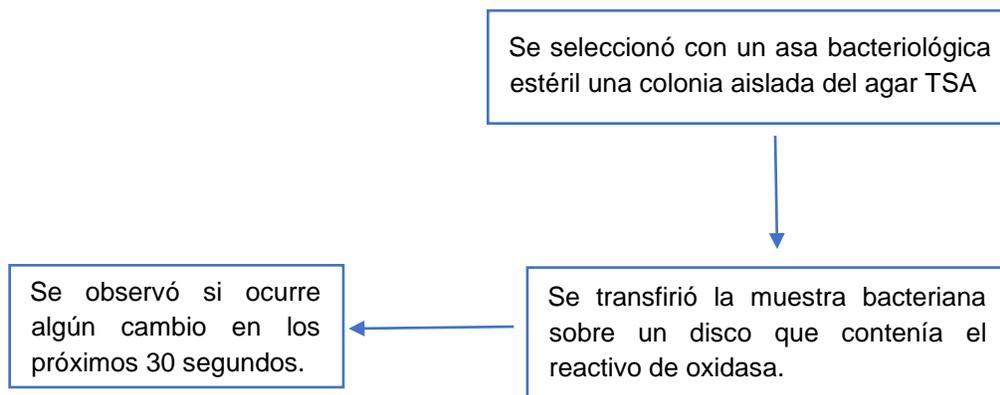


Figura N°33: Proceso para el desarrollo de la tinción de Gram

Prueba de bioquímica de oxidasa



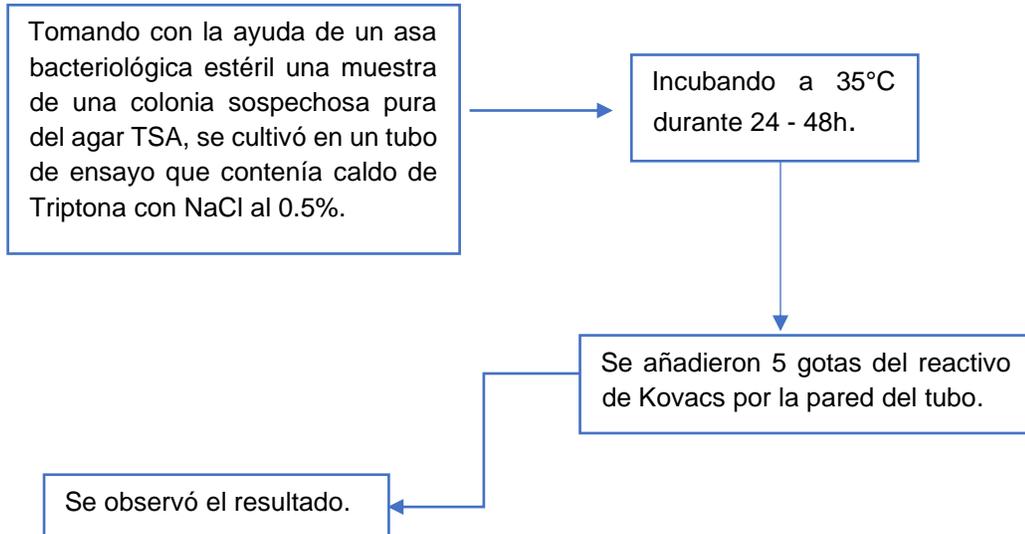
NEGATIVO



POSITIVO

Figura N°34: Esquema del procedimiento de la prueba bioquímica movilidad

Prueba bioquímica de Indol



Resultado
Positivo



Resultado
Negativo

Figura N°35: Esquema del proceso prueba de Indol y resultado

Prueba bioquímica de hierro tres azúcares (TSI)

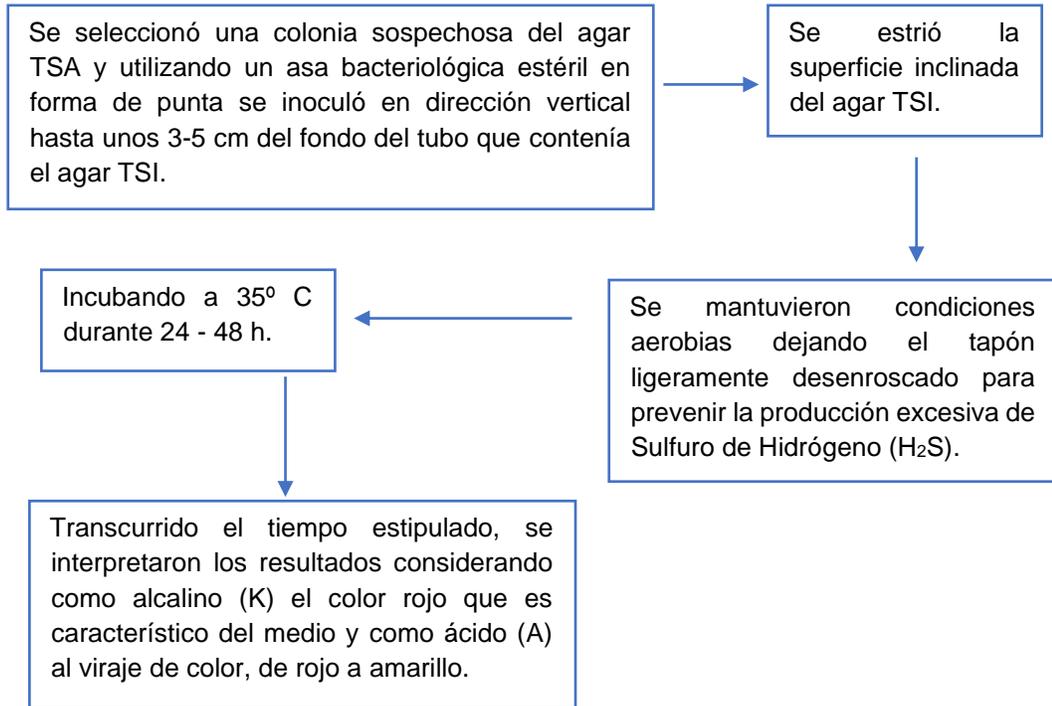


Figura N°36: Esquema del proceso de prueba TSI y resultados.

Tabla N°12: Interpretación del resultado para prueba en Agar TSI.

Resultado	Simbología	Interpretación
Pico alcalino/fondo alcalino (coloración roja)	K/K	Microorganismos no fermentadores
Pico ácido/fondo ácido (coloración amarilla)	A/A	Microorganismo fermentador de glucosa, sacarosa y lactosa
Pico alcalino/fondo ácido (coloración roja/amarilla)	K/A	Microorganismo fermentador de glucosa
Precipitado de color negro	H ₂ S	Microorganismo que produce Sulfuro de Hidrógeno
Producción de burbujas	---	Microorganismo que libera gas

Prueba bioquímica en agar movilidad

Se seleccionó una colonia sospechosa del agar TSA y con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en forma de punta, se inoculó a modo de picadura sobre Agar Movilidad.

Incubando a 25°C por 48 h.

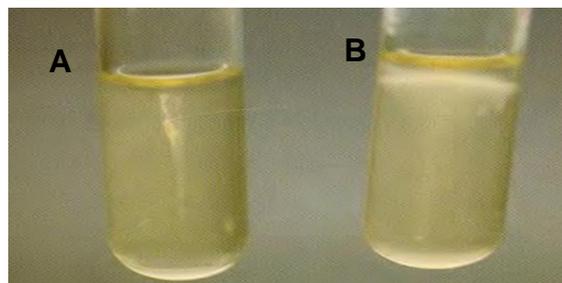


Figura N°37: Proceso de prueba de movilidad y resultados (A) negativo y (B), positivo.

Prueba bioquímica LIA

Se tomó una colonia pura del agar TSA, utilizando un asa con punta y se introdujo la punta del asa hasta unos 3-5 cm del fondo del tubo con agar LIA.

Se estrió la superficie inclinada del agar LIA. Tapando el tubo procurando no apretar demasiado el tapón

Incubando a 35°C durante 18 – 24H en atmosfera normal.

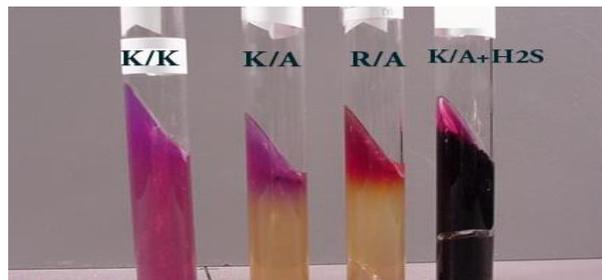
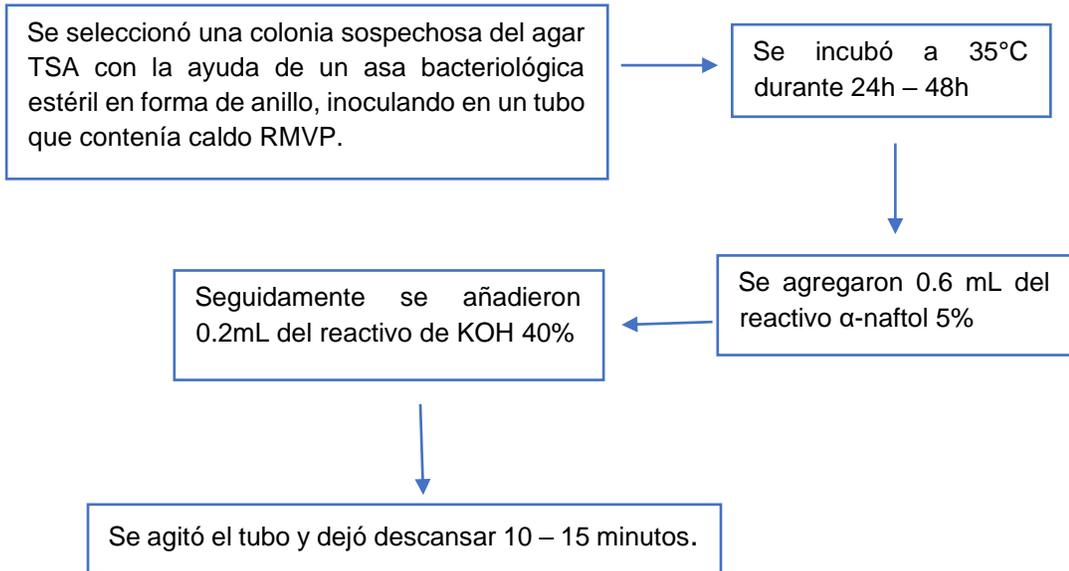


Figura N°38: Esquema del proceso y los posibles resultados de la prueba de LIA.

Tabla N°13: Interpretación del resultado para prueba en Agar LIA.

Resultado	Simbología	Interpretación
Pico alcalino/fondo alcalino (coloración violeta)	K/K	Resultado positivo para descarboxilación de la Lisina
Pico alcalino/fondo ácido (pico violeta / fondo amarillo)	K/A	Resultado negativo para descarboxilación de la Lisina
Pico rojizo /fondo ácido	R/A	Resultado positivo para desaminación de la Lisina, Fermentación de glucosa
Precipitado de color negro	H ₂ S	Microorganismo que produce Sulfuro de Hidrógeno

Prueba bioquímica de Voges Proskauer



Resultado positivo



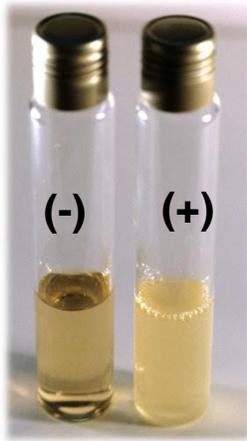
Resultado negativo

Figura N°39: Esquema de procedimiento de prueba de Voges Proskauer y resultados

Crecimiento en NaCl

Se seleccionaron colonias sospechosas del agar TSA con la ayuda de un asa bacteriológica estéril en forma de anillo y se realizaron suspensiones de la bacteria.

Inoculando en diferentes tubos que contenían agua peptonada a diferentes concentraciones: 0%, 1%, 6%, 8% y 10% de NaCl.



Incubamos a 37°C por 24 h

Ensayo positivo (+): desarrollo de turbidez por crecimiento.
Ensayo negativo (-): ausencia de turbidez por falta de crecimiento.

Figura N°40: Esquema de procedimiento de prueba Crecimiento en NaCl.

ANEXO N°9

IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS POR MEDIO DE LAS PRUEBAS
BIOQUÍMICAS PARA ÉPOCA LLUVIOSA Y ÉPOCA SECA

Tabla N°15: Identificación de microorganismos por medio de las pruebas bioquímicas para muestras lavadas y muestras sin lavar en época lluviosa. (7) (14)

Mx	Pruebas bioquímicas												NaCl										Microorganismo	
	OXI		TSI		LIA		MOV		VP		INDOL		0%		1%		6%		8%		10%			
	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	Lavadas	Sin lavar
MB 01	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 02	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 03	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
MB 04	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
MB 05	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
MB 06	(+)	(+)	A/A	H ₂ S	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	No identificado
MB 07	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>
MB 08	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
MB 09	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
MB 10	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
MB 11	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 12	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 13	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 14	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 15	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
MB 16	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
MB 17	(+)	(+)	A/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>

Tabla N°16: Identificación de microorganismos por medio de las pruebas bioquímicas para muestras lavadas y sin lavar en época seca.

Mx	Pruebas bioquímicas												NaCl										Microorganismo		
	OXI		TSI		LIA		MOV		VP		INDOL		0%		1%		6%		8%		10%				
	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL			
													L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	L	SL	Lavadas
MB 01	(+)	(+)	K/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophila</i>	
MB 02	(+)	(+)	H ₂ S	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No identificado	<i>V. vulnificus</i>	
MB 03	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 04	(+)	(+)	K/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophila</i>	
MB 05	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	
MB 06	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 07	(+)	(+)	H ₂ S	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	No identificado	<i>V. vulnificus</i>	
MB 08	(+)	(+)	A/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 09	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 10	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	
MB 11	(+)	(+)	K/A	A/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>A. hydrophila</i>	
MB 12	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 13	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 14	(+)	(+)	A/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 15	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	
MB 16	(+)	(+)	K/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
MB 17	(+)	(+)	A/A	K/A	K/K	K/K	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. vulnificus</i>	

ANEXO N°10

RESULTADOS OBTENIDOS DE LOS ANALISIS MICROBIOLÓGICOS
REALIZADOS DURANTE LA EPOCA LLUVIOSA.

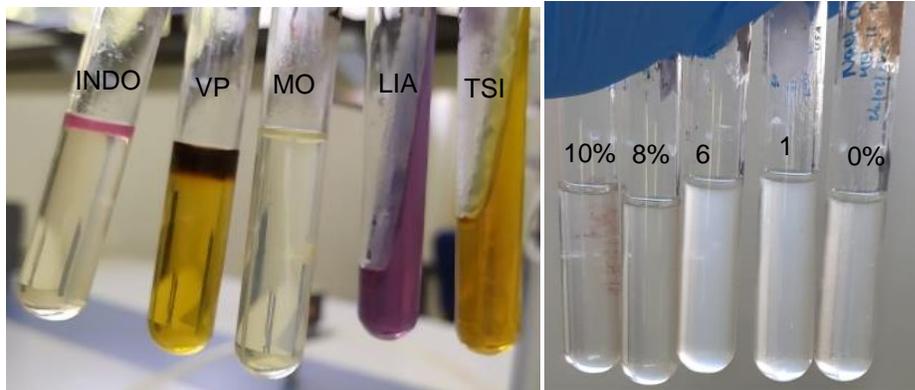


Figura N°41: Resultados de prueba bioquímica y crecimiento en NaCl para *Aeromona hydrophila*, en muestreo durante época lluviosa.

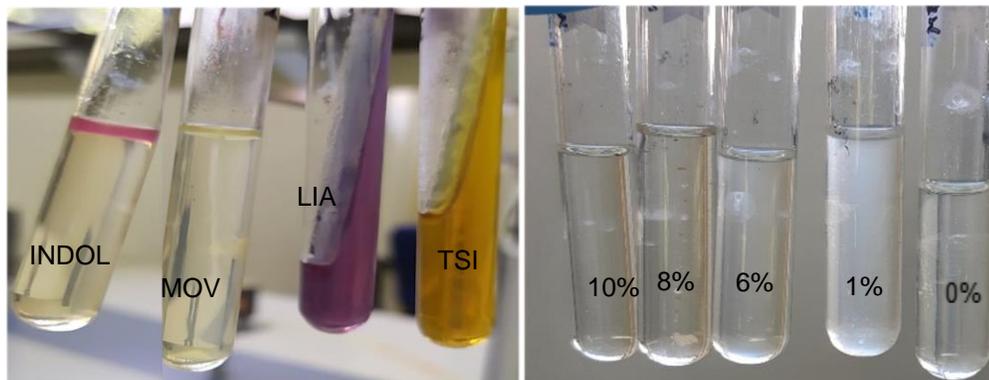


Figura N°42: Resultados de pruebas bioquímicas y crecimiento en NaCl indicando presencia de *Vibrio alginolyticus* en muestreo durante época lluviosa.

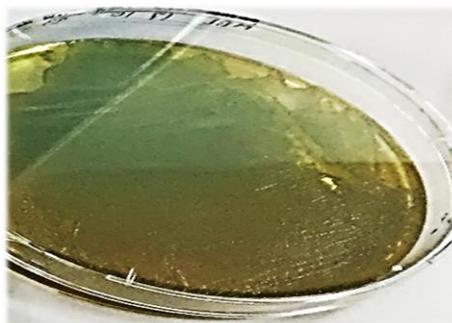


Figura N°43: Crecimiento de *Vibrio Vulnificus* en placas con agar selectivo TCBS (colonias verdes oscuro) en muestreo durante época seca.

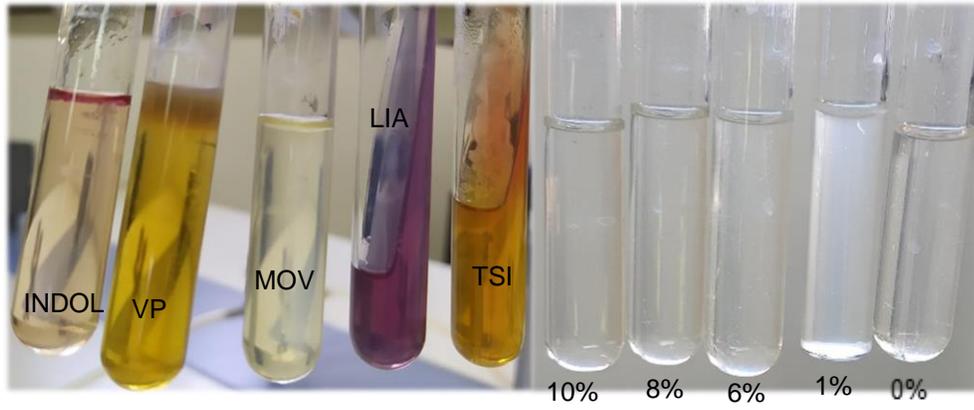


Figura N°44: Resultados de pruebas bioquímicas y crecimiento en NaCl indicando presencia de *Vibrio Vulnificus*, en muestreo durante época lluviosa.

ANEXO N°11

PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE BIVALVO *Anadara tuberculosa* (CONCHA PELUDA) RECOLECTADAS EN EL MUELLE DEL PUERTO DE LA LIBERTAD

Tabla N°17: Procedencia de las muestras de bivalvo *Anadara tuberculosa* (concha peluda) recolectadas en el muelle del puerto de La Libertad durante la época lluviosa del año 2019 y durante la época seca del año 2020.

PUESTO DE VENTA	CÓDIGO DE MUESTRA	PROCEDENCIA
1	MBL01 - MBS01	Jiquilisco
2	MBL02 - MBS02	Jiquilisco
3	MBL03 - MBS03	La Unión
4	MBL04 - MBS04	Jiquilisco
5	MBL05 - MBS05	La Unión
6	MBL06 - MBS06	puerto El Triunfo
7	MBL07 - MBS07	Jiquilisco
8	MBL08 - MBS08	La Unión
9	MBL09 - MBS09	Jiquilisco
10	MBL10 - MBS10	Jiquilisco
11	MBL11 - MBS11	puerto El Triunfo
12	MBL12 - MBS12	Jiquilisco
13	MBL13 - MBS13	La Unión
14	MBL14 - MBS14	La Unión
15	MBL15 - MBS15	Jiquilisco
16	MBL16 - MBS16	puerto El Triunfo
17	MBL17 - MBS17	Jiquilisco

ANEXO N° 12

CARTA DEL INFORME DE RESULTADOS CON FIRMA Y SELLO DE RECIBIDO PRESENTADO A LA DEFENSORÍA DEL CONSUMIDOR.



UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y
FARMACIA



San Salvador, Junio, 2021
Lic. Ricardo Salazar
Presidente de la Defensoría del Consumidor
Presente.

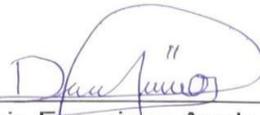
Reciba un cordial saludo deseándole éxito en su labor diaria.

El motivo de la presente es para presentar a usted los resultados del análisis microbiológico realizado a 34 muestras de molusco bivalvo crudo de la especie *Anadara tuberculosa* obtenidas de los 17 establecimientos fijos que comercializan la especie en el Muelle del Puerto de la Libertad, para darle cumplimiento a uno de nuestros objetivos específicos de nuestro trabajo de graduación titulado **“IDENTIFICACION DEL *Vibrio parahaemolyticus* en *Anadara tuberculosa* (CONCHA PELUDA) COMERCIALIZADO EN EL MUELLE DEL PUERTO DE LA LIBERTAD”**.

Cabe mencionar que anexo a los resultados, se incluyen los parámetros microbiológicos para moluscos crudos según el Reglamento Técnico Centroamericano 67.04.50:08 ALIMENTOS, CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS PARA LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS del año 2009, (Criterios microbiológicos para registro de alimentos y vigilancia, grupo de alimento 9: Pescados, derivados y productos marinos, Subgrupo del alimento 9.1: pescado, productos marinos y de agua dulce, crudos, refrigerados o congelados, incluidos moluscos, crustáceos y equinodermos, empacados)

Agradeciendo de antemano su atención.
Atentamente

F. 
Débora María Sánchez de Milian
Estudiantes Egresados de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador

F. 
Denis Francisco Avalos Platero
Estudiantes Egresados de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador

