

EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y PARASITOLÓGICA DE PESCADO DE LA ESPECIE *MUGIL CEPHALUS* (LISA) COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE BARQUISIMETO, ESTADO LARA.

Nayalet Padilla, Alonso Arroyo, Carmen Márquez, Milangela Pineda.

Laboratorio de Microbiología, Programa de Ingeniería Agroindustrial, Decanato de Agronomía.
Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto. Venezuela. E-mail: nayalet.padilla@ucla.edu.ve

RESUMEN

La velocidad del deterioro del pescado y su inocuidad se relacionan con el manejo higiénico del mismo y su acondicionamiento, consumir pescado deficientemente cocido o crudo puede acarrear intoxicaciones alimentarias, hepatitis, cólera y parasitismo. Los platillos, comúnmente implicados en estas enfermedades son elaborados a base de pescado crudo o poco cocido como el sushi, sashimi y ceviche. La enfermedad parasitaria es causada por las fases larvales de un nematodo de la familia *Anisakidae*. El parásito se desarrolla como adulto en mamíferos marinos que adquieren la enfermedad gracias a la forma L3 infectante desarrollada en peces. El humano consume pescado deficientemente cocido y adquiere la larva L3, causándole enfermedad gástrica, intestinal y extraintestinal o una modalidad gastro-alérgica. Se estudiaron 45 especímenes de *Mugilcephalus* adquiridos en mercados populares, frigoríficos y puestos de venta de la ciudad de Barquisimeto. Mediante la inspección visual se evaluó índice de frescura y mediante análisis microbiológicos detectamos indicadores sanitarios, de contaminación fecal y patógena. Se realizó el recuento de las larvas extraídas durante la inspección visual y pos-digestión *in vitro*, los resultados indican que la frescura de los ejemplares fue de $8,36 \pm 3,28$ puntos. El *Staphylococcus aureus* apareció en 64,7% de las muestras. El 82,2% de los ejemplares presentaron parasitismo, con un promedio de 24,48 larvas por ejemplar. Al examen microscópico los parásitos presentan estructuras que coinciden con el género *Anisakis*. Estas larvas son de transmisión alimentaria, de modo que ante síntomas relacionados e historia de consumo de estos productos deberíamos considerar a estos parásitos como agentes etiológicos de enfermedad.

Palabras clave: inocuidad, *Anisakis*, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

MICROBIOLOGICAL AND PARASITOLOGICAL EVALUATION OF FISH OF THE SPECIES *MUGIL CEPHALUS* (LISA) COMMERCIALIZED IN THE CITY OF BARQUISIMETO, LARA STATE.

The rate of deterioration of fish and its safety are related to the hygienic management of the fish and its conditioning, consuming poorly cooked or raw fish can lead to food poisoning, hepatitis, cholera and parasitism. The dishes regularly involved include sushi, sashimi and ceviche. The parasitic disease is caused by the larval phases of a nematode of the family *Anisakidae*. The parasite develops as an adult in marine mammals that acquire the disease thanks to the infective L3 form developed in fish. The human consumes poorly cooked fish and acquires L3 larva, causing gastric, intestinal and extraintestinal disease or a gastro-allergic modality. Fourty - five specimens of *Mugilcephalus* purchased in popular markets, refrigerators and stalls in the city of Barquisimeto were studied. Through the visual inspection we evaluated the freshness index and through microbiological analysis we detected sanitary indicators, fecal contamination and pathogens. A recount of the larvae extracted during the visual inspection and during *in vitro* digestion, the results indicate that the freshness of the specimens was 8.36 ± 3.28 points. *Staphylococcus aureus* appeared in 64.7% of the samples. The 82.2% of the specimens showed parasitism, with an average of 24.48 larvae per specimen. Microscopic examination of the parasites present structures that coincide with the genus *Anisakis*. These larvae are foodborne, so that in the face of symptoms and history of consumption of these products, its important to consider these parasites as etiological agents of these diseases.

Key words: innocuity, *Anisakis*, *Staphylococcus aureus*

Recibido 23/06/2017, Aprobado 07/11/2017.

INTRODUCCIÓN

El pescado constituye una importante fuente proteica incluida en la alimentación humana. La calidad higiénica del pescado de consumo, repercute en la velocidad del deterioro y en la salud del consumidor, puesto que se asocia a producción de aminas biógenas como la histamina la cual causa intoxicación y enfermedades como el cólera y

hepatitis. En los últimos años se ha incorporado a la cultura culinaria de occidente platillos a base de pescado crudo, tales como sushi, sashimi y otros más suramericanos como el ceviche. Esto ha traído como consecuencia el hallazgo de la enfermedad parasitaria en el consumidor y directamente relacionada con fases larvales del parásito *Anisakis simplex* llamada anisakiosis. Este parásito es cilíndrico de color

blanquecino de unos 15 a 30 mm de longitud que pertenece a la *Familia Anisakidae*, del *Phylum Nematoda*¹. Este se desarrolla en espacios marinos, cuyo hospedero definitivo son los mamíferos marinos (delfines, ballenas, marsopas, orcas y menos frecuentemente en focas, morzas y leones marinos) los cuales albergan las formas adultas dioicas del parásito. Los huevos del anisakis son excretados al agua y luego de una embriogénesis y posterior maduración de 4 a 8 días a una temperatura de 13°C a 18°C, el huevo eclosiona y da origen a una larva que puede permanecer en estado libre unos tres meses. Esta larva es ingerida por crustáceos, que a su vez son alimento para cefalópodos y peces teleosteos, en el pez, la larva se transforma a L3 infestante. Esta L3 es infectiva para el mamífero marino, en el cual se transforma adulto. Si el pez portador de la L3 es capturado y consumido crudo, el humano adquiere la larva y desarrolla la enfermedad anisakiasis o anisakidosis. En el pez, las larvas se distribuyen en forma de espiral plano en el tejido conectivo de las vísceras y en muchos casos en la musculatura, tanto la hipoaxial como la epiaxial. La parasitosis en el humano no desarrolla formas adultas y presenta varias modalidades según la localización de la larva: puede ser gástrica, intestinal y extraintestinal (pulmón, hígado y páncreas). Recientemente se ha descrito la forma gastro-alérgica, que se caracteriza por urticaria, angio-edema o anafilaxia acompañada de un cuadro digestivo. En general se distinguen dos etapas: aguda o forma fulminante y crónica. En la fase aguda, el cuadro clínico se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea y dolor abdominal y epigástrico. La forma intestinal a veces se confunde con apendicitis. En la fase crónica se pueden hallar lesiones ulcerativas o tumores que a veces son confundidos con cáncer gástrico, debido a la intensa reacción granulomatosa eosinofílica formada alrededor del parásito². La larva sobrevive a los procesos de ahumado, escabechado, salado y al congelamiento y cocción insuficiente, de modo que la ingesta de pescado crudo o poco cocido es la forma de adquirir la parasitosis. Esta enfermedad es de transmisión alimentaria, de modo que ante los brotes relacionados con el consumo de platillos como sushi, sashimi o ceviche debe sospecharse la forma gastro-alérgica como posible etiología. Por otro lado, la investigación plantea dar un acercamiento a la realidad higiénico sanitaria de los pescados *Mugilcephalus* (Lisa) expendidos en la ciudad de Barquisimeto, para lo cual se analizó microbiológicamente en búsqueda de indicadores higiénicosanitarios, testigos de la falta de higiene y patógenos según norma COVENIN 3086-94, 2394-94, 902, 1104-84, 1292.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Agua Peptonada (AP), agar PlateCount (PCA), Caldo Lauril Sulfato, Caldo Bilis Verde Brillante, agar Baird Parker, agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS), Agar F, Agar Sulfuro-Indol-Motilidad (SIM), agar Kligler, medio Hugh-Leifson con Glucosa (OF), agar Lisina Hierro (LIA), Reactivo de Kovacs, tetrametilparafenilendiamina al 2% en ácido clorhídrico, desoxicolato de sodio al 0,5%, solución de etanol 75% y glicerol 5%, Acido clorhídrico 1N, píldoras coadyuvantes de la digestión contentivas de 150 mg de pancreatina equivalente a 10.000 unidades de lipasa, 8.000 unidades de amilasa y 600 unidades de proteasa.

Material biológico: 45 especímenes de *Mugilcephalus* (Lisa) adquiridos en mercados populares, frigoríficos y puestos de venta del Este, Oeste y centro de la ciudad de Barquisimeto, Estado Lara. Durante el periodo 2015-2016.

Estimación del índice de frescura: por medio de inspección visual y aplicando el cuadro de deméritos desarrollada por *Larsen* según se muestra en el cuadro 1.

Análisis microbiológico: se procedió a retirar una porción de 10 gramos de musculatura para realizar su dilución en 90 mL de AP y obtener la dilución 10^{-1} . A partir de esta primera dilución se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-3} .

Análisis de aerobios mesófilos: partiendo de las diluciones anteriores se realizaron la siembra en PCA fundido, luego de la incubación se realizó el recuento de placas para obtener UFC/g.

Análisis de coliformes totales y fecales: de cada dilución se sembró un (1) mL en caldo Lauril Sulfato para la determinación presuntiva de coliformes por la técnica del Número más probable. La confirmación de coliformes totales y fecales se realizó en Caldo Bilis Verde Brillante y agar Levine tal como establece la norma COVENIN 1104-84. La presencia de turbidez y gas en la campana Durham indica positividad.

Análisis de *Pseudomonas* sp.: A partir de la primera dilución se inocula 0,1 mL y se transfiere al agar F. La siembra se realizó con asa de vidrio. Las colonias consideradas sospechosas por presentar fluorescencia a la luz UV, fueron seleccionadas para posterior confirmación con medio Sulfuro-Indol-Motilidad y tinción de Gram.

Análisis de *Vibrio cholerae*: de la dilución 10^{-1} se tomó un inóculo de 0,1 mL para el enriquecimiento con agua peptonada alcalina. Una vez incubado a 37°C por 24 horas se realizó la siembra en agar TCBS. Las colonias sospechosas se les practicó identificación con Agar Kligler, Agar LIA, medio Hugh-Leifson, prueba de la oxidasa, String test y tinción de Gram.

Análisis parasitológico: con ayuda de bisturí y pinzas se realizó la disección del ejemplar para exponer e

inspeccionar los órganos de la cavidad abdominal. Con ayuda de las pinzas se extrajeron las larvas tanto de la cavidad abdominal como de la musculatura hipoaxial. Las larvas fueron contadas, lavadas con agua destilada y conservadas en solución de etanol-glicerina 75-25% para conservación y posterior observación.

RESULTADOS

Digestión del pescado: se realizó una digestión empleando 1 litro de HCl 1N por cada 600 g de carne de pescado y se le adicionó 3 g de pancreatina proveniente de píldoras comerciales coadyuvantes de la digestión.

El peso promedio de los ejemplares estudiados fue de $254,9 \pm 148,9$ g, presentando el ejemplar de mayor peso 600 g y el de menor peso 39,2 g.

La tendencia en frescura según la tabla de Deméritos de *Laersen* fue de $8,36 \pm 3,28$ puntos.

Los indicadores sanitarios en los ejemplares analizados se muestran en el cuadro 2. La investigación de patógenos mostró que el patógeno más común fue *Staphylococcus aureus*, el cual se encuentra presente en un 64,7% de las muestras siendo la carga total de *S. aureus* de $8,4 \times 10^4 \pm 2,4 \times 10^3$ UFC/g según se muestra en el cuadro 3.

No hubo desarrollo de colonias características de *Vibrio cholerae* en los ejemplares estudiados.

La prevalencia parasitaria fue de 82,2% y la intensidad del parasitismo fue de 24,48 larvas por ejemplar.

Los parásitos colectados fueron mantenidos en solución de conservación y luego de su clarificación, observados al microscopio con lente 10, 40 y 100X para buscar estructuras que permitan la identificación. Las estructuras identificables en la región anterior corresponden a tres labios y la presencia de un diente apical, en la región caudal, la presencia de espina caudal o mucrón y ano tal como se observa en las figuras 1, 2 y 3. En la figura 4 se puede observar la presencia de cutícula protectora estriada.

DISCUSION

Existe una considerable variación en los pesos de los ejemplares expendidos en la ciudad, lo cual indica que los ejemplares comercializados son de diversas edades. Algunos estudios indican que existe relación entre la edad del espécimen y la intensidad del parasitismo, ya que los especímenes de mayor tamaño pueden presentar mayor parasitismo³.

La tendencia en frescura de los ejemplares está influenciada por el tiempo transcurrido desde la captura hasta el momento del expendio y eso incluye la manipulación (higiene, golpes, aplastamiento) y el transporte (temperatura e higiene). Para los ejemplares objeto de estudio fue de 8,36 puntos, lo que indica que ha perdido frescura sin perder aptitud para consumo.

La carga microbiológica de los ejemplares está influenciada por las aguas de captura y se le suma la

proveniente de la actividad humana de acondicionamiento y transporte. Los ejemplares capturados en aguas profundas tienden a tener menor carga total y menos unidades de patógenos que los ejemplares capturados en adyacencias de fuentes de agua derivadas de actividad humana. La carga microbiana total y especialmente los coliformes, están asociadas al deterioro del pescado y de la producción de aminas biógenas responsables de las intoxicaciones por ingesta de pescado crudo o cocido. La manipulación humana incluye el manejo de los ejemplares, modo de almacenamiento, daños sufridos por los ejemplares, evisceración tardía, higiene de los utensilios, calidad del agua de elaboración del hielo, exposición al sol, compresión y aplastamiento de la pesca por los ejemplares que están en la parte superior, ejemplares golpeados, pisados y los hábitos higiénicos de quien manipula el producto de la pesca, higiene deficiente y hábitos inadecuados pueden incrementar la carga microbiana total y de coliformes e incluso adicionarles microorganismos como el *St. aureus*, el cual para este estudio se encuentra dentro de los parámetros de la norma COVENIN 1292, siendo el patógeno más abundantemente hallado. En 11,8% de los ejemplares hubo desarrollo de *E. coli* y *Pseudomonas*, el primero es un patógeno que causa sintomatología gastrointestinal y el segundo es psicrófilo oportunista, productor de proteasas y lipasas que degradan el sustrato donde desarrolla. Ambos microorganismos son eliminados durante la cocción, pero pueden ser ingeridos al consumir pescado crudo. Si bien los procesos de salado y escabechado logran reducir de la carga total, el resultado final dependerá de la carga inicial. Adicionalmente los productos de la degradación de estos microorganismos no son eliminados con la cocción.

El análisis parasitológico demostró una prevalencia de 82,2% de larvas en *Mugilcephalus*. Del total de larvas, 374 (41,28%) fueron encontrados en la cavidad mesentérica y 434 (47,9 %) se recuperaron luego de la digestión. La digestión permitió recuperar 116,04% más larvas que solo la extracción manual, de modo que el procedimiento mejora considerablemente la sensibilidad de la inspección visual. En la inspección externa 98 larvas (10,82%) fueron halladas en musculatura hipoaxial, indicando que estaban activas y tuvieron oportunidad de migración. Esta prevalencia total es alta, sobretodo, considerando que los especímenes eran en su mayoría ejemplares jóvenes de mediano peso.

La intensidad del parasitismo fue de 24,48 larvas/ejemplar, tomando en cuenta que en la inspección visual se recuperaron 47,92% de larvas y pos digestión se recuperaron el 52,08%. Esto podría estar indicando que la inspección visual de los ejemplares no es suficiente para dar un reporte de ausencia de larvas y que es necesaria la digestión

enzimática para obtener la verdadera prevalencia del parasitismo. El peso promedio de los ejemplares fue de 0,26 Kg, el *Mugilcephalus* puede crecer hasta alcanzar 0,75 a 1 Kg, por lo cual podemos inferir que la intensidad parasitaria se incrementara en la medida que el pez se desarrolla⁴. Este resultado contrasta con el obtenido por investigadores en el oriente del país⁵, los cuales obtuvieron una intensidad parasitaria de 65 ± 5 parásitos por ejemplar en la lisa y de 38 ± 16 en lebranche. Se requieren estudios en otras especies para valorar la prevalencia de parasitosis en las especies de mayor consumo en esta región del país.

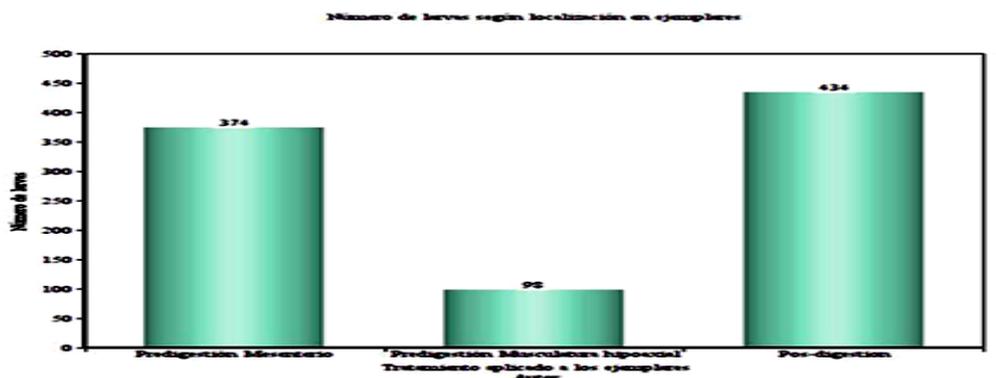
Las recomendaciones generales para evitar /o disminuir la transmisión de laparasitosis es reducir la oportunidad de migración de las larvas mediante la evisceración inmediata, para lo cual se debe educar al pescador al respecto y concientizar sobre la importancia de la misma. Por otra parte, algunos pescaderos y pescadores pueden desarrollar reacciones anafilácticas por contacto cutáneo o presencia de antígenos dispersos en aerosoles, lo que nos da una idea del carácter de enfermedad ocupacional que puede generar el contacto con el parásito. El resto de las medidas son aplicables a los consumidores entre las cuales tenemos: evitar el consumo de pescado crudo o insuficientemente cocido. Si el pescado está destinado a elaboración de platillos crudos, el ejemplar deberá ser ultracongelado a -20°C entre 48 a 72 horas. Cuando se aplica cocción, entonces el interior de la pieza debe alcanzar 60°C o más por al menos 10 minutos ya que debemos tomar en cuenta que algunos antígenos termoestables pueden estar presentes en el alimento (aun cuando no haya larvas viables) y desencadenar reacciones anafilácticas en el consumidor⁶.

Todo esto nos lleva a contemplar que el estado venezolano debe incluir medidas de manejo y consumo de frutos del mar crudos y control parasitológico dentro de la vigilancia sanitaria en los especímenes. No existe relación entre la presencia de patógenos y parásitos ya que las bacterias son adquiridas por el pescado capturado en zonas costeras de aguas templadas con elevada actividad humana mientras que los parásitos son adquiridos en aguas más profundas y frías (22°C).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- CECOPESCA. *Guía sobre los principales parásitos presentes en productos pesqueros: técnicas de estudio e identificación*. Madrid. España..Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2012.
2. González S, González R, Arias L, Gil A, Vicente J, Vorrall E: Manifestaciones digestivas de la Anisakiasis: descripción de 42 casos. *RevClin Esp*. 2005; 205 (7) 311-315.
3. Cabrera R, Suárez L, Martínez R, Leiva R, Gambirazio C, Ruiz L: *Larvas de Anisakisphyseteris y otros helmintos en Coryphaenahippurus* “perico” comercializados en el mercado pesquero de ventanilla, callao, Perú. *Rev peru biol*. 9 (1) 23-28.
4. Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAO. *Cultured Aquatic Species Information Programme Mugilcephalus*. *Cultured Aquatic Species Fact Sheets*. Departamento de pesca y Acuicultura de la FAO [en línea]. 2017. [consultado 30 de may 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Mugilcephalus/es#tcNA0112>.
5. Maniscalchi M, Espinoza D, Marcano Y, Nounou E, Zacarias M, Narvaez N: *Larvas Anisakidae en peces del genero Mugil Comercializados en mercados de la región costera Nor-Oriental e Insular de Venezuela*. *Saber*. 2015. (27). N° 1. 30-38.
6. Gómez B, Lasa E, Arroabarren E, Garrido S, Anda M, Tabar A: *Alergia a Anisakis simplex*. *AnsissanitNavar* 2003; 26(2): 25-23.
7. FAO. Departamento de Pesca y Acuicultura [en línea]. 2017. [consultado 30 de may 2017]. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/V7180S/v7180s09.htm>

GRAFICA 1. Recuento de larvas durante inspección visual y pos-digestión.



Cuadro 1. Esquema para la evaluación de la calidad empleado para identificar el índice de Deméritos según Larsen [citado en FAO]⁷. Las puntuaciones registradas en cada característica se suman y es el denominado *Índice de Calidad* el cual mientras más bajo indica que el ejemplar es más fresco.

Parámetro de la calidad	Característica	Puntuación (hielo/agua de mar)
Apariencia general	Piel	0 Brillante, resplandeciente
		1 Brillante
		2 Opaca
	Manchas de sangre (enrojecimiento) en opérculos	0 Ninguna
		1 Pequeños, 10-30%
		2 Grandes, 30-50%
	Dureza	3 Muy grandes, 50-100%
		0 Duro, en <i>rigor mortis</i>
		1 Elástico
	Vientre	2 Firme
		3 Suave
		0 Firme
	Olor	1 Suave
		2 Estallido de vientre
		0 Fresco, algas marinas/metálico
1 Neutral		
Ojos	2 A humedad/Mohoso/ácido	
	3 Carne pasada/rancia	
	0 Claros	
	1 Opacos	
Branquias	0 Normal	
	1 Planos	
	2 Hundidos	
Suma de la puntuación	Color	0 Rojo característico
	Olor	1 Pálidas, descoloridas
		0 Fresco, algas marinas/metálico
		1 Neutral
		2 Dulce/ligeramente rancio
3 Hedor agrio/pasado, rancio		
		(Mínimo 0 y máximo 20)

CUADRO 2. Indicadores sanitarios e indicadores de contaminación fecal.

Indicador	Resultado
<u>Aerobios Mesófilos</u>	$8,89 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^5$ UFC/g
<u>Coliformes totales</u>	$762,8 \pm 9,1 \times 10^2$ NMP/g
<u>Coliformes fecales</u>	$2,25 \times 10^2 \pm 3,9 \times 10^2$ NMP/g

Cuadro 3. Indicadores de patogenicidad y distribución en los especímenes investigados.

Patógeno	% de positividad de los ejemplares
<i>Escherichia coli</i>	11,76
<i>Pseudomonas sp</i>	11,76
<i>Staphylococcus aureus</i>	64,7

Figura 1: Larvas extraídas de los ejemplares de *Mugil cephalus*.



Figura 2: región anterior. Protuberancia labial y diente apical. 40X



Figura 3. Mucrón y ano en la región caudal. 40X



Figura 4. Región anterior con cutícula con estriaciones transversales. 40X.

