



UNIVERSIDAD DE GRANADA

**Departamento de Medicina Preventiva
y Salud Pública**

**PREVALENCIA DE NOROVIRUS
EN MOLUSCOS BIVALVOS Y SU
RELACIÓN CON INDICADORES
DE CONTAMINACIÓN**

Tesis Doctoral

Elena Moreno Roldán

Granada, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Elena Moreno Roldán
D.L.: GR 234-2013
ISBN: 978-84-9028-314-1

PREVALENCIA DE NOROVIRUS EN MOLUSCOS BIVALVOS Y SU RELACIÓN CON INDICADORES DE CONTAMINACIÓN

Tesis Doctoral que presenta ELENA MORENO ROLDÁN
para aspirar al Título de Doctor con mención internacional.

Granada, 2012.

Directores de la Tesis Doctoral

Dra. D^a. Milagros Fernández-Crehuet Navajas

Profesora Titular del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada.

Dra. D^a. Elena Espigares Rodríguez

Profesora Contratada Doctora del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada.

Prof. D. Miguel Espigares García

Catedrático del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universidad de Granada.

El doctorando ELENA MORENO ROLDAN y los directores de la tesis MILAGROS FERNÁNDEZ- CREHUET NAVAJAS; ELENA ESPIGARES RODRIGUEZ y MIGUEL ESPIGARES GARCIA, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 2012

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

-A MI PADRE-

INDICE

	Pág
AGRADECIMIENTOS	I
ÍNDICE DE TABLAS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
SUMMARY	XIII
I.INTRODUCCIÓN	1
1. El agua como agente transmisor de enfermedades infecciosas.....	3
1.1 Generalidades.....	5
1.2 Epidemiología de las enfermedades de transmisión hídrica.....	10
1.3 Control microbiológico del agua.....	19
2. Moluscos	27
2.1 Generalidades.....	29
2.2 Ecología y clasificación.....	33
2.3 Mecanismo de alimentación de los moluscos: mecanismo de filtración	35
2.4 Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de enfermedades infecciosas	38
2.5 Normativa aplicable a la producción y comercialización de moluscos bivalvos	43

2.6 Tendencias en el consumo de moluscos bivalvos	52
3. Bacterias, protozoos y parásitos transmitidos por vía hídrica y/o moluscos	57
3.1 Generalidades.....	59
3.2 Bacterias.....	61
3.3 Protozoos y parásitos	66
4. Virus.....	69
4.1 Generalidades.....	71
5. Norovirus.....	75
5.1 Generalidades.....	77
5.2 Reservorio y fuente de infección.....	82
5.3 Sintomatología clínica.....	85
5.4 Supervivencia.....	88
5.5 Patogenia y virulencia.....	90
5.6 Inmunidad	94
5.7 Diagnostico	97
5.8 Epidemiología de los brotes producidos por Norovirus	101
5.9 Mecanismos de transmisión	103
5.10 Prevención	111
5.11 Norovirus y moluscos	114
5.12 Norovirus e indicadores de contaminación fecal	117

II.JUSTIFICACIÓN	119
III.OBJETIVOS.....	123
IV.MATERIAL Y MÉTODOS.....	127
1. Selección y distribución de las pescaderías	129
2. Muestras	133
3. Preparación de las muestras	136
3.1 Preparación de la muestra y suspensión inicial	136
3.2 Preparación de las diluciones decimales	138
4. Aislamiento e identificación de indicadores de contaminación fecal.....	139
4.1 Aislamiento e identificación de Aerobios mesófilos.....	139
4.2 Aislamiento en identificación de coliformes totales: recuento de enterobacterias lactosa positiva	140
4.3 Aislamiento e identificación de coliformes fecales: recuento de <i>E.coli</i>	140

4.4 Aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	
coagulasa positiva	141
4.5 Aislamiento e identificación de <i>Clostridium</i>	142
5. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos	143
5.1 Aislamiento e identificación de <i>Salmonellas</i>	143
5.2 Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> ,	
método horizontal para la detección y recuento.....	144
5.3 Aislamiento e identificación de <i>Vibrio</i>	146
6. Aislamiento e identificación de fagos somáticos	147
7. Normas microbiológicas	149
8. Concentración de partículas virales.....	150
9. Extracción del ácido ribonucleico (ARN).....	152
10. Amplificación del ARN de Norovirus.....	156
11. Electroforesis en gel de agarosa	160
12. Composición de los medios de cultivo y reactivos	162
13. Análisis estadístico.....	173

V.RESULTADOS	175
1. Estudio descriptivo.....	177
2. Prevalencia de Norovirus en moluscos bivalvos.....	189
3. Prevalencia de Norovirus en función de distintas variables.....	193
4. Prevalencia de Norovirus en relación a <i>Escherichia coli</i>	201
5. Prevalencia de <i>E.coli</i> , clostridios y fagos en relación a distintas variables	209
5.1 Prevalencia de <i>E.coli</i> según distintas variables.....	211
5.2 Prevalencia de clostridios según distintas variables.....	216
5.3 Prevalencia de fagos según distintas variables.....	221
6. Relación de los distintos indicadores	227
7. Relación entre los distintos indicadores de contaminación fecal y <i>Escherichia coli</i>	231
8. ¿Qué variables influyen en la presencia de Norovirus?	237
VI.DISCUSIÓN	243
VII.CONCLUSIONES.....	261
VIII.BIBLIOGRAFÍA.....	267
IX.ANEXOS	301

AGRADECIMIENTOS

Con la gran ilusión de llegar a este momento, quiero expresar mi agradecimiento a todas y cada una de las personas que han hecho de este sueño una realidad.

La presente tesis es un esfuerzo en el cual, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Quiero hacer constar mi más sincero agradecimiento a mi directores, Dr. Miguel Espigares por el interés y confianza que ha demostrado en mi desde el primer momento. Gracias a él he podido realizar una beca en su Departamento, pudiendo comprobar su inmenso talento como profesional y como persona; Dra. Milagros Fernández-Crehuet por la dirección, apoyo permanente y horas de trabajo dedicadas a la elaboración de esta Tesis Doctoral, así como por su entusiasmo y valiosos consejos, el apoyo y el ánimo que me ha brindado y lo sigue haciendo en todo momento y por último pero no menos importante, a la

Dra. Elena Espigares por sus comentarios en todo el proceso de elaboración de la tesis y por ser, a parte de una excelente directora, una buena amiga.

Gracias por haberme dado el privilegio de teneros como directores.

A la Dra. Obdulia Moreno por su ayuda a la hora de impartir prácticas de saneamiento, sus consejos y su cariño que tengo el honor de recibir cada día.

Al Dr. Pablo Lardelli, por su gran amabilidad en todo momento que tocaba su puerta con mis dudas estadísticas y epidemiológicas.

A Cesar Criado por su disponibilidad para el trabajo y su ayuda incondicional. Así como por hacerme pasar tantos momentos divertidos (siento no haber hecho la tesis de pasteles, como tu proponías...).

Y al resto de los compañeros de este departamento especialmente a los profesores del máster por haberme permitido compaginar un mal momento con sus explicaciones en salud pública y medicina preventiva, endulzándome ese pequeño trance.

Me siento muy afortunada por haberme permitido ser parte de este departamento.

Gracias también al grupo de trabajo de la Dra. Miren Iturriza-Gomara: Dr. David J. Allen, Farah Aladin, Sameena Nawaz, Mathu Segaram y Ana Fernández, que me apoyaron, me ayudaron y me permitieron entrar en su vida durante esos tres meses, de convivir dentro y fuera del lugar de trabajo. Pero sobre todo, por hacerme sentir como una más y por la cantidad de ratos divertidos que hemos compartido que sientan muy bien siempre y más aún cuando uno no está en su mejor momento.

Al equipo médico que me ha atendido y lo sigue haciendo, gracias por animarme a la realización de este trabajo.

A mis mejores amigas, Yani y Fati, porque cuando duele mirar el pasado y da miedo el futuro, siempre os tengo aquí, a mi lado.

A Paco por ser tan optimista, y por haber estado a mi lado siempre que lo he necesitado.

A mis tíos y a mis primos por su inestimable cariño. En especial, gracias a mi tía Toñi por su colaboración en la recogida de muestras que sustentan este proyecto.

Muy especialmente a Juan y a Pura por el cariño y apoyo que me han dado en todo momento.

Pero todo este esfuerzo se lo quiero dedicar a mis “dos madres” y a mis “dos padres”, porque se lo merecen, ya que sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Creo que todo lo que ponga aquí resultara poco para agradeceros todo lo que habéis hecho, así que por eso simplemente diré que os quiero.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos transmitidos por vía hídrica tipo especie patología.

Tabla 2. Estructura taxonómica de Calicivirus.

Tabla 3. Clasificación de norovirus.

Tabla 4. Síntomas presentados por los afectados por un brote.

Tabla 5. Distribución y frecuencia de muestras, procedentes de pescaderías particulares.

Tabla 6. Distribución y frecuencia de las muestras tomadas en pescaderías de centros comerciales.

Tabla 7. Distribución de las muestras según el tipo de molusco, la procedencia, la estación del año y el día de la semana.

Tabla 8. Temperaturas medias de Granada.

Tabla 9. Descripción Primer.

Tabla 10. Valores medios de los indicadores microbiológicos de contaminación fecal de moluscos bivalvos.

Tabla 11. Prevalencia de norovirus según el tipo de molusco.

Tabla 12. Prevalencia de norovirus según la estación del año.

Tabla 13. Prevalencia de norovirus según el día de toma de la muestra.

Tabla 14. Prevalencia de norovirus según la clasificación de *Escherichia coli* de acuerdo a la legislación vigente.

Tabla 15. Prevalencia de *Escherichia coli* según el tipo de molusco.

Tabla 16. Prevalencia de *Escherichia coli* según la estación del año.

Tabla 17. Prevalencia de *Escherichia coli* según el día de toma del molusco.

Tabla 18. Prevalencia de clostridios según el tipo de molusco.

Tabla 19. Prevalencia de clostridios según la estación del año.

Tabla 20. Prevalencia de clostridios según el día de toma del molusco.

Tabla 21. Prevalencia de fagos somáticos según el tipo de molusco.

Tabla 22. Prevalencia de fagos somáticos según la estación del año.

Tabla 23. Prevalencia de fagos somáticos según el día de toma del molusco.

Tabla 24. Test estadístico de comparación de dos medias para muestras independientes, de norovirus frente a los distintos indicadores.

Tabla 25. Test estadístico de comparación de dos medias para muestras independientes, de *Escherichia coli* frente a los distintos indicadores.

Tabla 26. Asociación entre variables de carácter cuantitativo: coeficiente de correlación de *Pearson*.

Tabla 27. Estimación lineal para el recuento de *Escherichia coli* y el recuento de clostridios.

Tabla 28. Regresión logística de las variables que pueden estar asociadas con la presencia o ausencia de norovirus entre las 329 muestras de moluscos estudiados.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de contaminación fecohídrica.

Figura 2. Morfología de un molusco (mejillón).

Figura 3. Estructura de una concha.

Figura 4. Estructura del aparato digestivo de un molusco.

Figura 5. Destino de los virus en los ecosistemas marinos.

Figura 6. Evolución de las capturas de la flota española entre 1993-2003.

Figura 7. Consumo per cápita de moluscos por comunidad autónoma en 2011.

Figura 8. Consumo per cápita de moluscos por provincia en 2011.

Figura 9. Consumo de pescado en 2011.

Figura 10. Compra en pescadería tradicional versus centro comercial en 2003 y 2007.

Figura 11. Estructura tridimensional de Calicivirus tipo Norwalk, determinada por procesamiento de imagen de microfotografías electrónicas.

Figura 12. Representación de la estructura proteasa de Norovirus.

Figura 13. Tiras Operon para detección de norovirus.

Figura 14. Distribución geográfica de las pescaderías incluidas en el estudio.

Figura 15. Stomacher.

Figura 16. Kit *Purelink viral RNA/DNA*.

Figura 17. Kit *Primers Script One Step*, Takara.

Figura 18. Marcador del peso molecular.

Figura 19. Estadísticos descriptivos del logaritmo de *Escherichia coli* versus prevalencia de norovirus.

Figura 20. Estadísticos descriptivos del logaritmo de clostridios versus prevalencia de norovirus.

Figura 21. Estadísticos descriptivos del logaritmo de fagos somáticos versus prevalencia de norovirus.

Figura 22. Estadísticos descriptivos del logaritmo de aerobios mesófilos versus prevalencia de norovirus.

Figura 23. Estadísticos descriptivos del logaritmo de enterobacterias versus prevalencia de norovirus.

Figura 24. Prevalencia de los microorganismos patógenos en los moluscos bivalvos de venta en Granada.

Figura 25. Distribución de muestras en función de la presencia de norovirus.

Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos por PCR para la detección de norovirus.

Figura 27. Prevalencia de norovirus según la procedencia.

Figura 28. Distribución de muestras en función de la presencia de *Escherichia coli*.

Figura 29. Prevalencia de norovirus según la clasificación de *Escherichia coli* de acuerdo a las categorías establecidas.

Figura 30. Prevalencia de *Escherichia coli* según la procedencia del molusco

Figura 31. Prevalencia de clostridios según la procedencia del molusco.

Figura 32. Prevalencia de fagos somáticos según la procedencia del molusco.

Figura 33. Prevalencia de los distintos parámetros de acuerdo a la época del año.

SUMMARY

Seafood makes up a large part of the diet in many areas around the world. In the European Union, substantial economic activity is connected with the exploitation of natural bivalve shellfish beds and shellfish farms.

Large increases in population and industrial activity have compromised sanitary conditions in coastal areas. This situation has led to considerable changes in the physicochemical and biological characteristics of marine ecosystems, and thus creates a potential public health risk from the consumption of marine organisms. Bivalve mollusks in coastal waters can become contaminated if the waters in which they grow are subject to contamination from industry or more importantly coastal sewage. These sedentary organisms obtain nourishment by filtering large volumes of water, retaining suspended particles, including which include microorganisms.

Therefore, bivalve mollusks are especially prone to act as transmitters of disease-causing enteric bacteria and viruses, because the waters they inhabit are often exposed to contamination by fecal matter from sewage outlets, and furthermore, mollusks are often consumed raw or only partially cooked, it has been widely shown that the consumption of contaminated seafood can cause diseases in humans.

With regard to contamination with bacteria we know that these are excreted at a constant rate of approximately 10^8 per gram of fecal matter and are found in human feces and those of other warm-blooded animals. In light of these characteristics and the survival capacities of different species, contamination limits in water for human consumption have been established for the following groups: total coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci and sulfur-reducing clostridia. Some enteroviruses become resistant in certain aquatic environments and under conventional treatment processes, including disinfection. This is the main reason for including sulfur-reducing clostridia as a microbiological parameter in quality standards, and for using coliphage bacteria in the microbiological control of water quality.

Human excreta also contain many viruses belonging of different families, in contrast with bacteria, viruses cannot multiply in the environment or in the contaminated molluscs, however, viruses remain viable and infective in these environments which can act as vehicles for further transmission.

Waterways near human population centers commonly contain large concentrations of viruses because they are excreted in the feces and urine of infected humans and animals, including those that do not show obvious signs of sickness. Because enteric viruses can survive for a long time in water by associating with particulate matter, aquatic environments act as storehouses for contagious viral particles. The use of water contaminated with human excreta for irrigation or for shellfish farming can result in the contamination of foods for human consumption.

Bivalve molluscs are one of the foods that have often been implicated in the transmission of enteric viruses. Although these viruses are not able to multiply in the molluscs, these filter feeders act as concentrator of virus particles, and in some cases, there is also evidence that the molluscs possess receptor that specifically bind some viruses, providing a means for further concentration eg, noroviruses. In addition, the very low infectious doses may

increase their public health risk by hindering the use and development of analytical methods. Climatic variables, such as precipitation and temperature, have both direct and indirect effects on the prevalence of enteric viruses. For example, the influx of waste water caused by heavy rains and flooding is a significant factor in the contamination of coastal waters and the molluscs that live in these areas. Although solar and ultraviolet radiations are harmful to the stability of virus particles, salinity has very little effect on their survival. The first well-described norovirus outbreak associated with the consumption of shellfish occurred during the winter of 1976-1977 in the United Kingdom, during which the consumption of cockles was epidemiologically linked to 33 incidents that affected approximately 800 people. In a European study of more than 3.700 outbreaks of nonbacterial gastroenteritis that occurred between 1995 and 2000, 85% of the outbreaks were associated with noroviruses. Many studies have shown that noroviruses are the most frequent cause of acute gastroenteritis in Western Europe and the principal cause of nonbacterial gastroenteritis throughout the world. Norovirus genogroups I and II are responsible for the majority of outbreaks.

Various species of bivalve mollusks are preferentially consumed raw [e.g., oysters (*Ostrea edulis*) and smooth clams (*Callista chione*)] or only lightly

cooked [e.g., Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*)], which makes them a high-risk food category.

The general objective of this study was to determine the level of contamination by norovirus genogroups I and II of various types of bivalve molluscs and to test whether the treatments that these foods are required to receive is sufficient to avoid the risk of transmission of gastrointestinal viruses.

For this purpose performs the following methodology:

Samples

From February 2009 to October 2010, bivalve samples were collected from 16 randomly selected fish markets among the 46 markets in Granada, Spain. Among the 16 fish markets, 12 were stand-alone fish markets, and 4 were located within shopping centres. Four types of molluscs were sampled: Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*), smooth clams (*Callista chione*), striped Venus clams (*Chamelea gallina*), and grooved carpet shell clams (*Ruditapes decussatus*). A total of 329 samples of bivalve mollusks were obtained.

Sample preparation

Twenty-five grams of the mollusc body (stomach and digestive diverticulum) was homogenized with 200 ml of 0.1% peptone water (pH 7.0 ± 0.2) in a Stomacher blender (Stomacher 400 Circulator, Seward Limited,

Norfolk UK) for 2 min at 150 rpm. The supernatant was divided into 8-ml aliquots, and 2 ml of glycerol was added to each aliquot. The aliquots were stored at -40°C until subsequent experiments to determine the viral concentrations.

Microbiological analysis

Microbiological analysis was done under aseptic conditions with sterilized materials. Suspensions and decimal dilutions were prepared in accordance with Spanish standard Norma UNE consistent with ISO standard 6887-1-2000 (Wood 1980). To ensure that samples for microbiological analysis were representative we used at least 6 individual mussels or clams weighing 75 to 100 g each (or 25 g for smaller animals). The flesh and intervalve water were used together. Under aseptic conditions we weighed 25 g of each sample and homogenized it in a Stomacher blender for 2 min at 150 revolutions/min with 200 mL of 0.1% peptone water (pH 7.0 ± 0.2). Each sample was tested for microorganisms indicative of fecal contamination of the water, including mesophilic aerobes, total coliforms, fecal coliforms and sulfur-reducing clostridia. We also looked for the pathogenic microorganisms *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus*.

Detection methods for different organisms were based on the following Spanish and international standards:

- *Recuento de aerobios mesófilos* [Mesophilic aerobe counts] (UNE EN ISO 4833:2003)
- *Recuento de enterobacterias lactosa positiva y recuento de Escherichia coli* [Lactose-positive enterobacteria and *Escherichia coli* counts] (Reference method UNE 556 83)
- *Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva* [Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* counts] (UNE EN ISO 6888-1-1999)
- *Listeria monocytogenes*, (método horizontal para la detección y recuento de listeria monocytogenes [Horizontal method for the detection and counting of *Listeria monocytogenes*] (UNE EN ISO 11290-2:1998)
- *Determinación de Salmonellas. Método* [Determination of *Salmonella* species. Method] (UNE EN ISO 6579:2007)
- *Determinación de Clostridios* [Determination of clostridia] (UNE EN ISO 7937:2005)
- *Determinación de fagos somáticos* [Determination of somatic phages] (UNE EN ISO 10705-2; 2000)

Bacterial contamination criteria

In raw samples, contamination was considered to exist on the basis of criteria established by the current legislation: more than 300 fecal coliforms or more than 230 *Escherichia coli* per 100 g of mollusc flesh and intervalve water, and any *Salmonella* bacteria in 25 g of mollusc flesh (REGLAMENTO (CE) N° 854/2004).

Virus concentration

Five millilitres of the previously described supernatant was centrifuged at 20,000 x g for 5 min (Digicen20- R) and kept chilled at 4°C for 12 h. A 16% polyethylene glycol 6000 solution (Merck) and a 0.6 M NaCl solution were added to precipitate out the viral particles. The sample was then centrifuged at 12,000 x g (Ultracentrifuge, Sigma 3K10) for 30 min at 4°C, and the resulting precipitate was resuspended in 0.5 ml of Tris-Tween. This viral particle concentrate was kept at -40°C until the extraction of nucleic acids and reverse transcriptase – PCR (RT-PCR).

Extraction

Using 200 µl of each sample, the viral nucleic acids were extracted and purified using the Purelink™ Viral RNA/DNA Kit (Invitrogen, Carlsbad CA) in accordance with the manufacturer's instructions. The viral nucleic acids were stored at -80°C until the RT-PCR.

Reverse transcription PCR (RT-PCR) for the detection of noroviruses

The specific norovirus primers JV12 Y and JV13 I were selected via an alignment of a 20-21 nucleotide section of the noncoding regions of the extreme 5' end to synthesize extension products, which generated fragments of 327 bp that were common to norovirus genogroups I and II.

For this process, the commercial One Step SYBR® PrimeScript™ (Takara, Japan) kit was used in accordance with the manufacturer's protocol. The PCR amplification consisted of an initial 3-min denaturation at 94°C followed by 25 amplification cycles, each of which consisted of a 30-s denaturation step at 94°C, a 1-min rehybridization step at 37°C, and a 1-min elongation at 72°C. The final elongation step lasted 7 min at 72°C. The resulting fragments were analyzed using conventional electrophoresis in a 2% agarose gel with a buffer containing Tris base, sodium acetate trihydrate, EDTA

(Na)₂•2H₂O, and ethidium bromide. We used a 100-bp reference marker and allowed the gel to run at 300 V for approximately 2 cm.

Statistical analysis

The data were analyzed using the statistical software SPSS version 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

We studied a total of 329 samples of bivalve molluscs collected throughout the spring, summer, autumn and winter of 2009 and 2010. Samples were collected from specialty stores and from supermarket fish and seafood departments. The four species analyzed here were Mediterranean mussel, smooth clam, striped venus clam and grooved carpet-shell clam.

Current Spanish legislation sets limits only for contamination by *E. coli*. In general the maximum allowable limit is 230 *E. coli* cells per 100 g raw flesh and intervalve water (Real Decreto 571/1999).

Of the samples tested 15% (48/329) [CI 95 % (11.05-18.97)] surpassed the legal limit for *E. coli* contamination and we detected the presence of genogroup I or II noroviruses in 76 samples (23.10 % CI 95 % (18.73-28.10)).

Norovirus was detected in 61 (21.71 %) [CI 95 % (17.13-27.08)] of the 281 samples did not exceed the 230 *Escherichia coli* cells per 100 g of shellfish therefore the presence of these viruses in bivalve mollusc that are considered fit for human consumption according to the law represents a potential health risk.

Of the 76 samples that tested positive for norovirus, there was a statistically significant association between the different types of molluscs and the presence of norovirus. Interestingly, grooved clam showed the highest prevalence of contamination (34.48 % CI 95 % (22.82-48.20)), whereas smooth clams showed the lowest prevalence (4 samples, 8.89% CI 95 % (2.89-22.13)). We also found a statistical association regarding the season during which the samples were collected. Indeed, more positive samples were found in the summer compared with the other seasons (32.39 % CI 95 % (22.05-44.66)). Although no statistically significant difference between the two market types was found, stand-alone fish markets produced 23.97 % (CI 95 % (18.83-29.94)) compared with 20.69 % (CI 95 % (13.03-30.98)) from the shopping centres. Interestingly, Tuesdays had the largest percentage of positive samples (25.95% CI 95 % (19.46-33.63)).

Finally, we have performed a logistic regression to estimate the study variable that influences the presence of norovirus. With this we get that the only variables that influence the presence of this virus, are the temperature and type of mollusc, as no statistically significant differences were obtained with no parameter microbiological analysis.

CONCLUSIONS

From this study of norovirus contamination in shellfish and other variables of epidemiological interest, we arrive at the following conclusions:

1. Among samples 15 % surpassed the legal limit for *Esherichia coli* contamination, so that the microbiological quality of bivalve molluscs intended for human consumption constitutes a risk to the consumer.
2. Of the samples tested, approximately one quarter had norovirus contamination. In samples of molluscs were satisfactory according to the parameter *Esherichia coli*, was obtained a 21.7 % contamination by this virus. This shows that this indicator is enough bacteria to ensure the safety of shellfish.
3. There has been verified that the plan of self-control, which includes general plans of hygiene and plan of analysis of control and critical points, turns out to be less effective in the traditional establishments of sale of fish since the contamination for norovirus and / or *Esherichia coli* is major that in those big chains of distribution of sale that have more efficient systems of self-control, whereas the small points of sale, as fish

markets traditional or markets to the air it can be submitted to uncontrolled changes in the suppliers or in the procedures for what they can increase the risks for the human health.

4. Differences have been observed in the seasonal boss of contamination for norovirus and for *Esherichia coli*. In both cases the major prevalence happened during the summer. This can owe to that in the waters in which the molluscs grow there has been an increase in the fecal contamination during this months, raising therefore the concentration of the virus. Another possible hypothesis is that the methodology used to the being of minor sensibility that the method that ORFI/II junction amplifies estimates for under the level of contamination.
5. The study of contamination for norovirus in samples of different types of bivalve molluscs, it has allowed us to state that the major prevalence takes place in the grooved carpet shell clams (*Rudipates decussatus*). This might be due to the fact that this type of mollusc needs periods of purification more prolonged in the time.
6. The presence of norovirus in samples of mollusks has been compared with other indicators proposed (*Esherichia coli*, clostridia, somatic

- phages, mesophilic aerobe and enterobacteria) not finding any statistically significant association.
7. The parameter that establishes the legislation, has related to other microorganisms (clostridia, somatic phages, mesophilic aerobe and enterobacteria) finding significant positive correlation between *Esherichia coli* and clostridia, and between *Esherichia coli* and enterobacteria.
 8. On having verified the inefficiency of the process of purification and the existence of norovirus in the bivalve molluscs, which in agreement with the in force legislation can be destined for the human consumption, we believe necessary the incorporation of other microbiological parameters in order to guarantee the sanitary quality of this food.
 9. Due to the gravity that acquires the disease caused for norovirus in certain groups of the population and the low minimal infectious dose, it is necessary that this type of population has the sufficient information to be conscious of the risk that supposes the ingestion of bivalve raw molluscs.

10. The obtained results reveal the need of a coordination between the different responsible organisms in order the presence monitors of these virus in the molluscs and to establish the preventive measures and of control adapted to minimize the risk of infection in the human population.

INTRODUCCIÓN

1. EL AGUA COMO
AGENTE
TRANSMISOR DE
ENFERMEDADES
INFECCIOSAS

1.1 Generalidades

El agua es un medio relativamente rico en microorganismos, bien autóctonos o alóctonos cuyo efecto sobre este medio, en sí puede no ser importante, pero sí es especialmente destacable cuando se trata del consumo para los seres humanos.

El crecimiento de la población a nivel mundial y el aumento del uso del agua para diferentes actividades, ha incrementado los niveles de contaminación. Esta contaminación está relacionada con los vertidos de origen doméstico e industrial a los cuerpos de agua. En el caso de los residuos de origen doméstico, la carga contaminante está representada por altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal. Estos microorganismos son causantes de enfermedades de origen hídrico, que generan altos porcentajes de morbi-mortalidad en la población.

En el agua pueden estar presentes organismos patógenos del tipo de bacterias, virus, hongos, protozoos, helmintos, etc., así como la importancia que el medio hídrico posee como transmisor de enfermedades ya que forman parte del ciclo vital de algunos insectos, que actúan como vectores.

Sin duda, la principal vía de contaminación por agentes patógenos son los residuos procedentes de las múltiples actividades humanas, entre ellos los desechos humanos y animales que dan lugar a la denominada contaminación fecal, que constituye una excelente señal de alarma de la presencia de microorganismos entre los que podemos citar como ejemplos, *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* (*V.cholerae*), *Yersinia enterocolítica*, etc (ESPIGARES y cols., 2008).

El agua como vehículo de transmisión de enfermedades es de gran importancia. Este problema, como factor en la diseminación de microorganismos, tiene consecuencias trascendentes que aún no han sido plenamente evaluadas. La mayoría de los ríos que sirven como fuentes de agua potable transportan cantidades variables de aguas de desecho, que se ven incrementadas en los periodos en que disminuye el caudal. La urbanización rápida tanto de los países desarrollados como de los países en vías de desarrollo ha dado lugar a problemas críticos en el suministro de agua y en la eliminación de desechos. Las crecientes demandas de fuentes de agua disponibles debidas al aumento de la población mundial y a la concurrente expansión de la industria hacen inevitable el aprovechamiento de las aguas residuales domésticas.

Hay que decir que sigue siendo el principal factor de riesgo del agua de consumo a que está sometida la población. A nivel mundial es uno de los problemas sanitarios más importantes. Por ejemplo, la mortalidad mundial por diarrea entre la población menor de cinco años se estimó en 1,87 millones, lo que supone aproximadamente el 19% de la mortalidad total en los niños. Las regiones de África y Asia Sudoriental de la OMS acumulan entre ambas el 78% (1,46 millones) de todas las muertes por diarrea registradas entre los niños en el mundo en desarrollo; y el 73% de estas defunciones se concentran en sólo 15 países en desarrollo.

Se ha estimado que aproximadamente 3.000 millones de personas en todo el mundo carecen de sistemas de saneamiento. El 95% de las aguas residuales domésticas son vertidas al medio ambiente sin ser tratadas. Como consecuencia de estas deficiencias sanitarias y de la falta de aguas de bebida limpias, se ha estimado que cada año 3.500 millones de personas contraen alguna enfermedad de transmisión hídrica, y 3,3 millones de personas mueren anualmente de enfermedades entéricas.

Cada año, más de mil millones de seres humanos se ven obligados a recurrir al uso de fuentes de abastecimiento de agua potencialmente nocivas. Este hecho perpetúa una crisis humanitaria silenciosa que acaba con la vida de unos 3900 niños al día e impide lograr los Objetivos de Desarrollo del Milenio. El fracaso colectivo para abordar este problema se traduce en unas perspectivas de futuro muy poco esperanzadoras para los miles de millones de personas que viven atrapados en una espiral de pobreza y enfermedad.

La razón principal de esta situación es el alto coste que supone la puesta a punto de procesos de tratamiento, y el mantenimiento de infraestructuras apropiadas que permitan el control sanitario, de los que solamente se benefician el 6% de la población mundial.

En diciembre de 2003, la Asamblea General de las Naciones Unidas proclamó el Decenio Internacional para la Acción, “El agua, fuente de vida” 2005-2015. Su principal objetivo consiste en promover las actividades necesarias para cumplir los compromisos contraídos, basados en la idea de que el agua es indispensable para la salud y el bienestar humano¹. En la región de la Comisión Económica para Europa (CEPE) en febrero de 2005 se estableció un

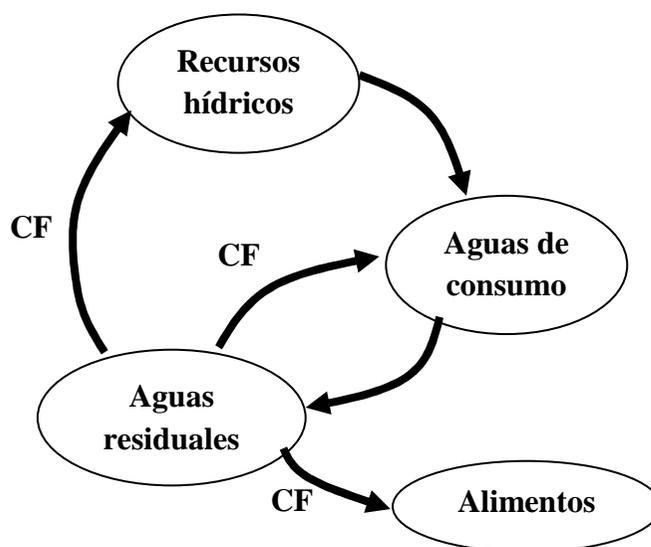
marco para la elaboración de políticas, estrategias, y medidas relacionadas con los recursos hídricos y el saneamiento que se aplicará hasta 2015 (ONU, 2005).

1.2 Epidemiología de las enfermedades de transmisión hídrica

Aunque son muchas las enfermedades en las que el agua participa como mecanismo de transmisión, existe un grupo de infecciones, denominadas gastrointestinales o de transmisión fecohídrica, en las que el agua es el principal mecanismo responsable. Todos los agentes que se eliminan por las heces y la orina de los enfermos y portadores pueden llegar al agua en cantidades suficientes como para producir infecciones hídricas (fiebre tifoidea, disentería bacilar y amebiana, cólera, hepatitis, etc.).

La *contaminación fecohídrica* es un riesgo siempre presente en la gestión sanitaria del agua, y uno de los pilares del saneamiento básico. Su participación en la transmisión de infecciones gastrointestinales se esquematiza en el *ciclo de contaminación fecohídrica*, (Figura 1).

Figura 1. Ciclo de contaminación fecohídrica.



CF: contaminación fecohídrica

Como el agua no es un buen medio de cultivo y operan, además, mecanismos naturales de autodepuración, las posibilidades de supervivencia y multiplicación de los microorganismos son escasos lo que explica que, generalmente, no debe mediar mucho tiempo entre el momento de la contaminación del agua y su consumo, para que se produzcan las infecciones hídricas.

En cualquier caso, el agua contaminada actúa como mecanismo de transmisión indirecta en la cadena epidemiológica de muchas infecciones, al vehicular los microorganismos hasta el individuo sano susceptible. En este mecanismo indirecto, el agua puede intervenir de diversas formas:

1. Por ingestión de agua contaminada: Se produce a partir de aguas incorrectamente cloradas en servicios de abastecimiento mal controlados, o a partir de fuentes, manantiales o pozos contaminados. Los microorganismos que más frecuentemente producen brotes de enfermedades de transmisión hídrica son: bacterias (*Salmonella spp*, *Esherichia coli (E.coli)*, *Shigella spp*, *Campylobacter*); virus (Rotavirus, virus Norwalk, virus de la hepatitis A, virus de la Hepatitis E); protozoos y helmintos (*Crystosporidium parvum*, *Dranculus medinensis*, *Giardia*, *Entamoeba histolytica*).

2. Por contaminación hídrica de alimentos: Tiene especial importancia en verduras y frutas, cuando se han regado con aguas residuales, ya que se ingieren crudas, y en moluscos, cuando proceden de aguas marinas contaminadas con aguas residuales.

3. Por contacto: Puede ocurrir por contacto con el agua en usos higiénicos, recreativos, ocupacionales, terapéuticos a través de piel, heridas, ojos, mucosas, etc. (*Aeromonas spp*, *Pseudomonas*, *Leptospira spp*, *Mycobacterias* no tuberculosas).

4. Por inhalación y aspiración: Mediante aerosoles (*Legionella pneumophila*, *Mycobacterias* no tuberculosas, diversos virus).

5. Mediante vectores: Se produce en muchas infecciones transmitidas por vectores activos (*Aedes*, *Anopheles*) o pasivos (*Linnea*, *Planorbis*, *Cyclops*), en los que el agua interviene de alguna forma en el desarrollo del ciclo biológico.

La susceptibilidad de las personas ante la infección depende de factores como la edad, higiene personal, acidez gástrica, etc., y de otros factores epidemiológicos secundarios, como factores estacionales, infraestructura sanitaria, grado de desarrollo tecnológico, económico y social, etc (ESPIGARES y cols., 2008).

Estas enfermedades de transmisión hídrica se suelen presentar en forma de brotes, un brote es aquel incidente que afecta a dos o más personas, que

presentan la misma enfermedad y mismos síntomas y en los cuales existe una asociación tiempo-lugar. Los brotes de transmisión hídrica tienen un gran impacto en la salud pública debido al gran número potencial de población expuesta.

En España, en el periodo 1999-2006 se declararon 413 brotes de transmisión hídrica por agua de consumo, con 23.642 casos declarados, de los cuales 204 hubieron de ser hospitalizados y se produjeron 2 defunciones. De los brotes notificados, en 130 (31,47%) el vehículo de transmisión fue la red de abastecimiento común. El segundo lugar, por orden de frecuencia, lo ocupan las fuentes con 110 brotes (26,63%). La mayoría tuvieron lugar en el municipio, barrio o calle como territorio epidémico con 85 brotes (20,58%), seguido del campamento con 61 brotes (14,76%) y del hogar con 40 (9,68%).

Del total de los 117 brotes confirmados producidos por agua de consumo, los agentes causales fueron infecciosos en 112 brotes (95,72%) y tóxicos en 5 brotes (4,28%).

Los agentes patógenos identificados con mayor frecuencia fueron las bacterias con 58 brotes (51,78%), seguido de virus con 48 brotes (42,85 %) y parásitos con 6 (5,37%).

La bacteria identificada con mayor frecuencia fue *Shigella sonnei* con 14 brotes (24,13 % del total de los 58 brotes causados por bacterias), en segundo lugar se encuentra *Campylobacter* con 13 brotes (22,41%). *Campylobacter jejuni* fue la especie más frecuente con 10 brotes.

El número total de brotes de etiología vírica en agua de consumo fue 48. Norovirus fue identificado, en muestras humanas, en 26 brotes (54,16%), el virus de la hepatitis A en 14 brotes (29,16%) y rotavirus en 6 (12,5%). Considerando los parásitos y protozoos, *Cryptosporidium* se identificó en dos brotes, *Giardia lamblia* en un brote y en dos brotes los agentes fueron dos o más parásitos (*Cryptosporidium* y *Giardia*, y *Giardia* más *Blastomyces hominis*) (MARTIN y cols., 2008).

La vigilancia epidemiológica de los brotes hídricos en España se realiza a través de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). Las distintas Comunidades Autónomas notifican al Centro Nacional de

Epidemiología los brotes y situaciones epidémicas de cualquier etiología y mecanismo de transmisión que ocurren en su territorio.

Cuando se produce un brote, la investigación del mismo constituye uno de los elementos clave tanto para su control como para la prevención de futuros episodios.

La investigación de un brote es un proceso complejo y multidisciplinar en el que, sólo en condiciones óptimas, llega a identificarse el germen responsable, el vehículo y los factores que pudieron contribuir a su aparición; hay que resaltar que en los últimos años el número de brotes de etiología desconocida supera a los de etiología conocida y lo mismo ocurre cuando se trata de considerar el vehículo y los factores contribuyentes.

Por todo lo expuesto anteriormente, es imprescindible que el proceso de investigación del brote se inicie en el menor tiempo posible y siga el protocolo establecido para que sea eficaz y se obtenga la información necesaria para diseñar las medidas de control correctas.

Una vez se detecta un brote el proceso seguido comprende las siguientes etapas:

- A. Notificación. Los brotes de enfermedad transmitidos por alimentos o agua requieren una notificación urgente y por sospecha al sistema de vigilancia epidemiológica. Las infecciones gastrointestinales de declaración obligatoria (EDO) en nuestro país se encuadran dentro de cuatro categorías: Fiebres tifoideas y paratifoideas, disentería, toxiinfecciones alimentarias y otros procesos diarreicos. Toda sospecha de brote se centralizará en el Distrito Sanitario desde el que, preferentemente el Coordinador de Epidemiología y Programas, dirigirá el proceso de investigación.
- B. Investigación. Una vez ha sido confirmada la existencia de un brote los pasos seguidos en el proceso de investigación son: formulación de la hipótesis de partida; diseño y realización de la investigación; análisis de la información recopilada y obtención de resultados y conclusiones. En esta etapa se procede a verificar o no la hipótesis de partida.

C. Aplicación de medidas de control. Tras el proceso de investigación se propondrán medidas a adoptar encaminadas en primer lugar a controlar el brote si éste persiste y, en segunda instancia, una vez se ha identificado la causa que lo ocasiona, a la prevención de futuros brotes. Entre las medidas de control y preventivas a adoptar ante brotes hídricos cabe mencionar la desinfección del agua abastecida, la prohibición de consumo, prohibición del riego con aguas residuales, saneamiento de alimentos, etc. No obstante, cuando los brotes declarados son graves pueden aplicarse medidas de control sin esperar los resultados de la investigación del brote.

D. Elaboración del informe técnico final con los resultados del proceso una vez concluye la investigación del brote.

E. Retroalimentación del proceso con objeto de que se conozca tanto el hecho como las recomendaciones oportunas en todos los niveles.

1.3 Control microbiológico del agua

El riesgo de contaminación tanto a nivel humano como ambiental hace necesario el control de la presencia de microorganismos en el agua. Determinar el tipo de microorganismos presentes y su concentración proporciona una herramienta indispensable para conocer la calidad del agua y para la toma de decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas.

El control de la calidad microbiológica del agua de consumo y de vertido, requiere una serie de análisis dirigidos a determinar la presencia de microorganismos patógenos. El diagnóstico de estos microorganismos, requiere laboratorios especializados y representa varios días de análisis y costos elevados. Como alternativa a estos inconvenientes, se ha propuesto el uso de indicadores microbianos que se pueda identificar mediante el uso de métodos sencillos, rápidos y económicos.

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos (concentración y reacción frente a

factores ambientales y barreras artificiales), pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar.

Una vez se ha evidenciado la presencia de grupos indicadores, se puede inferir que los patógenos se encuentran presentes en la misma concentración y que su comportamiento frente a diferentes factores como pH, temperatura, presencia de nutrientes, tiempo de retención hidráulica o sistemas de desinfección es similar a la del indicador.

Un microorganismo indicador de contaminación fecal debe reunir las siguientes características:

- Ser un constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos.
- Estar presente, de forma exclusiva, en las heces de animales homeotérmicos.
- Estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están.

- Presentarse en número elevado, facilitando su aislamiento e identificación.
- Debe ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotérmicos.
- Su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas (su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal).
- Debe ser fácil de aislar y cuantificar.
- No debe ser patógeno.

En el caso de las bacterias se han utilizado varios indicadores. Entre ellos los más comúnmente utilizados y que representan algunos de los pocos parámetros que exigen la gran mayoría de las normativas a nivel mundial, son el grupo de los coliformes totales, coliformes fecales, *E.coli* y *Enterococcus faecalis* para el control de aguas potables, residuales y de uso recreativo. De igual forma se ha propuesto el uso de *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) como indicador de contaminación fecal antigua y como posible indicador de presencia de quistes de protozoos (FERGUSON y cols., 1996).

Desde el punto de vista de la salud pública, los virus entéricos son el grupo de organismos patógenos más críticos, las concentraciones de virus entéricos presentes en el agua procedentes de la materia fecal pueden ser elevadas, y aunque los virus no se pueden reproducir en el agua , aún son capaces de causar enfermedades al ser ingeridos incluso a dosis bajas ya que la dosis mínima infecciosa es muy pequeña, son muy resistentes a los sistemas de desinfección, la investigación ha demostrado que los virus entéricos son inherentemente más resistentes a los desinfectantes comunes que los indicadores bacterianos. El control a nivel de laboratorio requieren de cultivos celulares y técnicas moleculares que no están al alcance de la mayoría de los laboratorios (OKOH y cols., 2010).

Se ha demostrado también que las bacterias indicadoras no se correlacionan bien con la presencia de virus (GRABOW, 2001; BAGGI y cols., 2001).

Por ello, se propuso al poliovirus como indicador viral. Sin embargo, las cantidades de este virus encontradas en ambientes acuáticos son demasiado variable para que sea considerado un buen indicador.

Además de estas variaciones, la detección de virus entéricos como hemos comentado anteriormente, requiere laboratorios especializados y los resultados tardan varios días. Estas dificultades en el uso de enterovirus como indicadores de contaminación fecal en el agua llevaron a la búsqueda de indicadores alternativos que sean de rápida y fácil detección y que permitan prever el comportamiento de los enterovirus en el medio ambiente.

Como alternativa a dichos inconvenientes, se propuso el empleo de bacteriófagos o colifagos, los cuales son virus que sólo utilizan bacterias como hospedadores para la replicación. Los colifagos utilizan *E. coli* y otras especies emparentadas próximamente con ella como hospedadores y, por lo tanto, pueden ser liberados por estos hospedadores bacterianos a las heces humanas y de otros animales de sangre caliente.

Los colifagos que se utilizan en la evaluación de la calidad del agua se dividen en dos grupos principales: colifagos somáticos y colifagos de ARN F-específicos (específicos para *E. coli* F+). Una de las diferencias entre ambos grupos es la vía de infección.

Los colifagos somáticos inician la infección uniéndose a receptores ubicados permanentemente en la pared celular de los hospedadores; suelen replicarse en el aparato digestivo de los animales de sangre caliente, pero también pueden hacerlo en medios acuáticos. Los colifagos somáticos incluyen una gran variedad de fagos (que pertenecen a las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* y *Microviridae*) con diferentes tipos morfológicos.

Los colifagos de ARN F-específicos inician la infección uniéndose a las fimbrias de fertilidad (fimbrias F⁺ o sexuales) de las *E. coli* hospedadoras, que producen exclusivamente las bacterias portadoras del plásmido de fertilidad (F). Dado que las fimbrias F se producen únicamente en la fase de crecimiento logarítmico a temperaturas superiores a 30 °C, no es probable que los colifagos de ARN F-específicos sean capaces de replicarse en ambientes diferentes del aparato digestivo de los animales de sangre caliente. Los colifagos de ARN F-específicos son un grupo reducido de fagos con un parentesco próximo que pertenecen a la familia *Leviviridae* y que comprenden un genoma de ARN monocatenario y una cápside icosaédrica.

Los colifagos tienen muchas características en común con los virus humanos, como su composición, morfología, estructura y modo de replicación.

Por lo tanto, los colifagos son sustitutos o modelos útiles para evaluar el comportamiento de los virus entéricos en medios acuáticos y su sensibilidad a los procesos de tratamiento y desinfección. A este respecto, son más útiles que las bacterias fecales.

El tercer grupo propuesto, son los fagos que infectan *Bacteroides fragilis*. Este grupo presenta la ventaja de no replicar en ambientes naturales, dado que infectan una cepa anaerobia y su multiplicación se realiza solo bajo estas condiciones. Por otro lado su aislamiento se realiza en la mayoría de los casos en heces humanas.

La importancia para la salud pública de las aguas destinadas al consumo humano hace necesaria la fijación de normas de calidad. Con este fin el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano estableciéndose como parámetros microbiológicos:

- *E.coli*, valor paramétrico: 0 UFC en 100 ml
- Enterococo, valor paramétrico: 0 UFC en 100 ml
- *C. perfringens*, valor paramétrico: 0 UFC en 100 ml

Otros parámetros que se encuentran incluidos en el grupo de parámetros indicadores, como son el recuento de aerobios a 22 ° C y el recuento de bacterias coliformes (valor paramétrico es de 0 UFC en 100 ml de agua) (REAL DECRETO 140/2003, 7 febrero).

2. MOLUSCOS

2.1 Generalidades

Los moluscos son metazoos protostomos de simetría originariamente bilateral, que puede perderse secundariamente por torsión del saco visceral; su cavidad celómica está más o menos reducida y no tiene rastro metamérico alguno.

Pueden considerarse próximos a los Anélidos por presentar algunas veces formas larvianas semejantes a la trocófora.

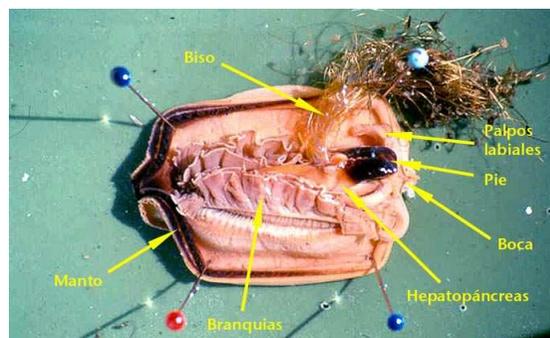
El aspecto del cuerpo es muy variado, por lo cual es difícil dar una descripción que se adapte a todas las diversas formas. En su organización típica se distinguen una cabeza, un pie y un saco visceral.

La cabeza comprende el orificio oral con el principio del tubo digestivo, los centros nerviosos cerebroides y algunos órganos sensoriales. Sin embargo en algunos tipos y generalmente en los Lamelibranquios puede faltar una diferenciación cefálica.

El tronco está revestido por un saco músculo-cutáneo, con desarrollo ventral predominantemente, formando con frecuencia una abundante masa muscular, el pie, que desempeña funciones variadas y tiene diversas formas. La pared dorsal, en cambio, es tenue, de modo que los órganos internos sobresalen y penetran en el llamado saco visceral, que puede adoptar forma cónica o experimentar una torsión y arrollarse en espiral.

Entre el saco visceral y el pie, existe un repliegue cutáneo, más o menos desarrollado, que constituye el manto. El manto limita la cavidad del manto y produce exteriormente como revestimiento cuticular la concha (Figura 2).

Figura 2. Morfología de un molusco (mejillón).



En la concha de los moluscos se distinguen tres estratos: periostraco, ostraco e hipostraco, yendo de fuera a dentro.

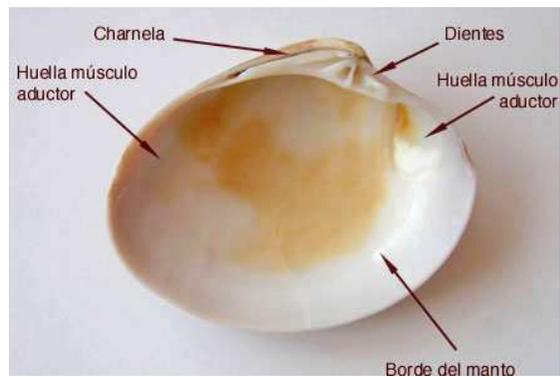
El primero de ellos es delgado y está formado por conquiolina, una sustancia orgánica parecida a la quitina. Las otras dos capas están más o menos abundantemente calcificadas. El ostraco crece solamente en la periferia (determina así el crecimiento en longitud de la concha), mientras que el hipostraco aumenta en toda su superficie (determinando así el crecimiento en espesor de la concha).

El ostraco está formado por conquiolina y carbonato cálcico, presentándose éste como cristales con una estructura a base de largos prismas perpendiculares a la superficie o bien se organizan en una mezcla de estructuras prismáticas y laminares.

El hipostraco está formado por varias capas de aragonito dispuesto en capas paralelas o ligeramente inclinadas unas respecto a otras. El número de capas determina el espesor de la concha. Esta capa, llamada también madreperla

o nácar, presenta fenómenos de refracción de la luz y de iridiscencia, típicos de la cara interna de las conchas (Figura 3).

Figura 3. Estructura de una concha.



2.2 Ecología y clasificación

Los moluscos son animales acuáticos, en su mayor parte marinos; un pequeño número de ellos están adaptados a la vida terrestre. Por lo general se mueven deslizándose por el suelo o sobre los fondos acuáticos; son típicamente lentos en sus movimientos o bien viven fijos sobre el substrato; algunos son pelágicos.

Se dividen en las siguientes clases:

Solenogastros, Placóforos o Lorigados, Gasterópodos, Escafópodos, Bivalvos o Lamelibranquios y Cefalópodos.

Las dos primeras clases se reúnen bajo la denominación común de *Anfíneuros*, mientras que las restantes se agrupan en el subtipo *Conchíferos*.

En este trabajo nos hemos centrado en la búsqueda de microorganismos en la clase *Bivalvia*, por ello solo nos centraremos en esta.

Los Bivalvos se subdividen en los tres órdenes siguientes:

Taxodontos. Ejemplo: *Nucula nucleus* y *Arcanooae*.

Anisomiaros. Ejemplo: *Mytilus edulis* y *Ostrea edulis*.

Eulamelibranquios. Ejemplo: *Margaritana margaritifera* y *Teredo navales*.

(D'ANCONA, 1960).

2.3 Mecanismo de alimentación de los moluscos: mecanismo de filtración

Existen organismos pertenecientes a diversos grupos zoológicos cuya alimentación es exclusivamente a base de plancton. Para ello reúnen el plancton microscópico disperso en el agua por medio de determinados procedimientos de filtración de ésta y concentración de los organismos planctónicos antes de que pasen a su tubo digestivo encontrándose que la mayoría de los animales que manifiestan este régimen alimenticio son, a su vez, miembros del plancton.

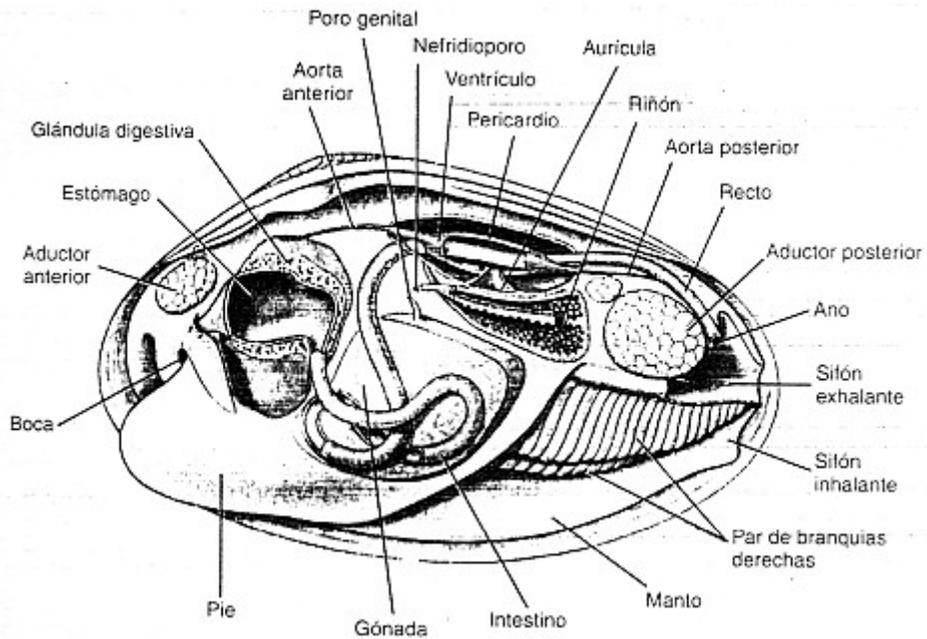
Los aparatos que presentan los animales marinos para filtrar el agua son de diferentes tipos.

Entre los animales como los mejillones y las ostras, hay varios que llevan el plancton hasta la boca durante los movimientos respiratorios por medio de series de cilios más gruesos llamados cirros vibrátiles, situados en los surcos de sus branquias que están impregnadas de moco donde se pegan los organismos y con el movimiento llegan a su boca.

El género *Crepidula*, molusco gasterópodo que se alimenta de sustancia en suspensión y filtrando plancton, presenta largos filamentos branquiales con el fin de brindar un área más amplia de superficie para atrapar su alimento. Los bordes de la concha y el manto están físicamente adheridos al sustrato salvo un pequeño espacio a cada lado de la parte anterior por donde el agua entra por el lado izquierdo y sale por el derecho y cuando el plancton pasa por la cavidad del manto, es atrapado en una lámina mucosa situada en la superficie frontal del filamento branquial.

La lámina de la branquia de estos moluscos lleva gran cantidad de cilios encargados de mover partículas alimenticias que pasan a los extremos de los filamentos, los cuales se enroscan contra los lados del cuerpo; posteriormente las partículas de alimento llegan al estómago siguiendo un surco alimentario localizado en el esófago (Figura 4).

Figura 4. Estructura del aparato digestivo de un molusco.



2.4 Los moluscos bivalvos como agentes transmisores de enfermedades infecciosas

Los productos extraídos del mar constituyen una proporción muy importante de los recursos alimenticios a escala mundial. La actividad económica relacionada con la explotación de los criaderos naturales de moluscos bivalvos y el cultivo artificial tiene una gran importancia en la Comunidad Europea.

En nuestro país, esta actividad económica de gran trascendencia se ha desarrollado principalmente en el noroeste español, en el que las rías gallegas constituyen un ecosistema muy propicio para su desarrollo.

Las especies explotadas comercialmente incluye la ostra plana (*Ostrea edulis*), ostrón (*Crassostrea gigas*), mejillón común mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) y atlántico (*Mytilus edulis*), varias especies de almeja (*Tapes* spp., *Mercenaria mercenaria*), berberecho (*Cerastoderma edule*), navaja (*Ensis* spp.), vieira (*Pecten maximus*) (LEES, 2000).

Los moluscos bivalvos son especialmente propensos a transmitir bacterias y virus entéricos patógenos debido a que las aguas en las cuales crecen, pueden encontrarse expuestas a contaminación con materia fecal transportada por aguas residuales o durante la manipulación por portadores.

El aumento de los aportes de aguas residuales al mar, debido al fuerte incremento de la población y a la actividad industrial ha comprometido la calidad sanitaria de las zonas costeras (Figura 5). Esta situación no solo conlleva cambios importantes en las características físico-químicas y biológicas del ecosistema marino, sino que constituye un riesgo potencial para la salud pública derivado del consumo directo de organismos marinos y de las actividades recreativas que se realizan en las aguas costeras contaminadas por aguas residuales. Independientemente del comercio, la recolección no controlada se desarrolla a lo largo de todo el litoral, y es precisamente esta actividad, con el consiguiente consumo directo sin los debidos controles sanitarios y sin ser sometidos a depuración, la que puede representar una vía de trasmisión de ciertas enfermedades. Pueden ser criados y alimentados en aguas contaminadas, y algunos de ellos, suelen consumirse crudos (Ej. las otras).

Figura 5. Destino de los virus en los ecosistemas marinos.



Los moluscos bivalvos son animales de carácter sedentario y de régimen alimentario exclusivamente filtrador. Las branquias cubiertas de mucus y cilios vibrátiles, además de cumplir con la función respiratoria, retienen las partículas en suspensión, entre ellas, bacterias, virus y protistas planctónicos (CROCI y cols., 2007).

Asimismo las materias en solución contenidas en el agua también son absorbidas e incorporadas a su organismo. Los productos ingeridos siguen diferentes caminos:

a) La materia orgánica, ciertos protistas planctónicos, sales minerales, factores de crecimiento, constituyen su propio alimento que es asimilado por el animal, distribuyéndose por toda sus anatomía.

b) Otros microorganismos son retenidos en el tracto digestivo o en el aparato filtrador, y generalmente no suelen ser nocivos para el animal, si bien en algunas ocasiones pueden representar un riesgo para la salud del hombre en el caso de que hayan acumulado bacterias patógenas, virus animales o biotoxinas producidas por dinoflagelados.

El pescado puede ser considerado como un alimento con un historial sanitario relativamente limpio, sin embargo, son numerosos los agentes nocivos que puede transmitir (GARCÍA y SÁNCHEZ, 1998).

Cuando los productos marinos provienen de fuentes contaminadas, se consumen crudos o apenas cocidos y son mal almacenados o con una

manipulación técnicamente no adecuada, pueden ser causa de brotes de enfermedades que pueden conducir a un problema de salud pública (WOOD, 1980).

Ha sido ampliamente demostrado que el consumo de productos marinos contaminados puede provocar un cierto número de enfermedades en el hombre. Estas enfermedades son muy diversas, encontrándose entre las principales las fiebres tifoidea y paratifoidea, salmonelosis, infección por *Vibrio parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus*), hepatitis vírica de tipo A, intoxicación paralizante por molusco y cólera.

2.5 Normativa aplicable a la producción y comercialización de moluscos bivalvos

Según la reglamentación internacional sobre seguridad alimentaria, el control de los alimentos se basa en el análisis de riesgos, que incluye tres elementos:

- Evaluación del riesgo: la evaluación científica de efectos potencialmente adversos para la salud debido a la exposición humana a peligros transmitidos a través de los alimentos.
- Gestión del riesgo: el proceso de sopesar medidas alternativas para aceptar, minimizar o reducir los riesgos evaluados y seleccionar y aplicar opciones apropiadas.
- Comunicación del riesgo: un proceso interactivo de intercambio de información y de opiniones sobre el riesgo entre evaluadores y gestores de riesgos y otras partes implicadas.

El *Codex Alimentarius* aporta un marco general para los controles en el contexto del comercio internacional. En el Apéndice 1 se recogen algunas secciones relevantes a los moluscos bivalvos vivos del Código de Prácticas para el Pescado y los Productos Pesqueros del *Codex Alimentarius*. Incluye varios

artículos pertinentes a la depuración, además de recomendaciones específicas para la depuración en la Sección 7.5. En el Apéndice 2 se presenta la Norma del *Codex Alimentarius* para los moluscos bivalvos vivos y los moluscos bivalvos crudos, destinados al consumo directo o a una elaboración posterior. Esta norma no incluye ningún aspecto específico relativo a la depuración, aunque sí contiene aspectos relacionados con la higiene y la calidad del producto. El contenido del código de buenas prácticas debe suplementarse para producir los detalles necesarios para la aplicación de un sistema completo de control o para definir buenas prácticas.

El resto de esta sección ofrece unas consideraciones generales relacionadas con los controles de salud pública en la producción comercial de moluscos y presenta ejemplos relacionados con los sistemas de la Unión Europea y los Estados Unidos. Ambos sistemas son importantes en términos de comercio internacional ya que dictan normas que los países exportadores a dichos mercados deben cumplir.

A finales del siglo XIX y principios del XX, el principal problema relacionado con el consumo de moluscos bivalvos era la fiebre tifoidea. No solo se dieron brotes de la enfermedad sino también un número importante de muertes. Estos brotes finalmente condujeron a la implementación de controles reglamentarios en algunos países como el Reino Unido, Francia, Italia, Estados Unidos y otros. A finales del siglo XIX se desarrollaron métodos de depuración como medida para reducir el riesgo de enfermedades causadas por el consumo de moluscos, mientras que los controles legislativos en Europa y los Estados Unidos se introdujeron a principios del siglo XX.

En general, estos controles reglamentarios han tenido éxito con respecto a las enfermedades bacterianas asociadas a las aguas fecales, aunque la reducción de fiebres tifoideas y paratifoideas en Europa y los Estados Unidos asociadas a moluscos podría haberse debido en gran parte a mejoras generales en la sanidad pública reduciendo la presencia de estos microorganismos en las aguas residuales y por consiguiente en las zonas de cultivo de moluscos impactadas.

En muchos sistemas legislativos el requisito de la depuración u otros medios de reducción de la contaminación microbiana tras la recolección viene dictado por la clasificación de la zona de cría basada en el alcance de la contaminación mostrado por el análisis de bacterias fecales indicadoras en una serie de muestras tomadas en un período largo de tiempo (un año o más).

En la Unión Europea (UE), los requisitos estipulados en la Directiva sobre la Inocuidad de Moluscos Bivalvos se sustituyeron a partir del 1 de enero de 2006 por requisitos similares, pero no idénticos, en la reglamentación consolidada sobre la higiene de los alimentos que abarca todos los alimentos de origen animal. En concreto, los requisitos que deben cumplir las empresas de la industria alimentaria se presentan en el Reglamento (CE) N° 853/2004 que incluye reglas específicas de higiene para alimentos de origen animal (REGLAMENTO (CE) N° 853/2004, 29 abril).

En la UE, la clasificación de las zonas de producción se especifica en el Reglamento (CE) N° 854/2004 que incluye reglas específicas para la organización de controles oficiales sobre productos de origen animal destinados

al consumo humano, modificado en sus anexos I, II y III por el Reglamento (CE) N° 1021/2008. Esta clasificación se basa en los niveles de *E.coli* presentes en muestras de moluscos (REGLAMENTO (CE) N° 854/2004, 29 abril; REGLAMENTO (CE) N° 1021/2008, 17 octubre).

Los reglamentos de la UE contienen pocas estipulaciones detalladas sobre el procedimiento de depuración a seguir. El principal requisito relacionado con el propio sistema es que: “El sistema de depuración deberá permitir que los moluscos reanuden rápidamente y mantengan su alimentación por filtración y que queden limpios de residuos cloacales, no vuelvan a contaminarse y se mantengan con vida en condiciones adecuadas para el envasado, almacenamiento y transporte que precedan a su puesta en el mercado”. También, se estipula que los moluscos bivalvos deben depurarse continuamente durante un período suficiente para cumplir con el estándar microbiológico del producto final (*E. coli* $\leq 230/100$ g; ausencia de *Salmonella* en 25 g). Los Estados miembros de la UE han ido especificando cómo deben realizarse los principios de depuración y los otros criterios generales a través de la aplicación de la legislación en los procedimientos de autorización e inspección nacionales.

En los Estados Unidos, los requisitos para la depuración se presentan en el Capítulo XV de la Ordenanza Modelo del Programa Sanitario Nacional de Moluscos (NSSP; US FDA 2006). Es la responsabilidad de cada Estado de los Estados Unidos desarrollar la legislación según los requisitos de la Ordenanza Modelo para que su industria obtenga la autorización para comerciar con otros Estados de los Estados Unidos. Los mismos requisitos se aplican a otros países que deseen comerciar con los Estados Unidos. En esta parte, la clasificación de las zonas de recolección se basa en los niveles de coliformes fecales en las muestras de agua de mar. Los requisitos de depuración en la ordenanza están más detallados que en la legislación de la UE, e incluyen más requisitos específicos para la construcción del centro depurador y el funcionamiento y verificación del sistema de depuración.

En Japón, la Prefectura de Hiroshima es la mayor zona de producción de ostras del país (aproximadamente el 57% de la producción ostrícola en 2004), de donde se recolectan 13.000 toneladas de ostras destinadas al consumo en crudo y 7 000 toneladas para el cocinado y procesado. Las ostras para el consumo en crudo deben recolectarse de las aguas donde el número más probable de

coliformes no sea superior a 70/100 ml de agua marina. Si se recolectan de otras aguas, las ostras deben ser sometidas a depuración.

En muchos programas de seguridad alimentaria, los controles relacionados con la misma depuración cubren los siguientes requisitos:

- Utilización de agua de mar limpia (con desinfección si la fuente de agua no es de la calidad adecuada).
- Diseño y construcción del sistema,
- Funcionamiento del sistema.
- Demostración del rendimiento adecuado con respecto a la eliminación de los indicadores bacterianos.
- Requisitos de control de calidad.
- Comprobación del producto final.

En España resulta indispensable aplicar una normativa para controlar la calidad sanitaria de las aguas destinadas a la producción, así como un reglamento de salubridad de los moluscos bivalvos. Como consecuencia de la adhesión de España a la comunidad europea, se ha efectuado la adecuación de la normativa nacional sobre la materia a lo establecido por la directiva del consejo 91/492/CEE. Así pues, se han establecido los Reales Decretos 308/1993 y

571/1999 en los que se aprueba la reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos, gasterópodos y equinodermos destinados al consumo humano directo o a la transformación previa a su consumo.

Las zonas de producción se han clasificado de acuerdo a las siguientes categorías:

- Zonas tipo A: en dichas zonas, los moluscos bivalvos vivos tendrán menos de 300 coliformes fecales o menos de 230 *E.coli*, por cada 100 gramos de carne de molusco y liquido intervalvar. Los moluscos extraídos de estas regiones podrán ser destinados al consumo humano directo.
- Zonas tipo B: los moluscos bivalvos en estas zonas presentan un índice igual o inferior a 6000 coliformes fecales o 4600 *E.coli* por cada 100 gramos de carne en el 90 % de las muestras. Los animales procedentes de estas zonas se destinaran al consumo humano tras someterse a un tratamiento de depuración o de reinstalación.
- Zonas tipo C: los moluscos bivalvos de estas zonas representan un índice inferior a 60000 coliformes fecales por cada 100 gramos de carne. Los moluscos extraídos de estas zonas podrán ser destinados al consumo

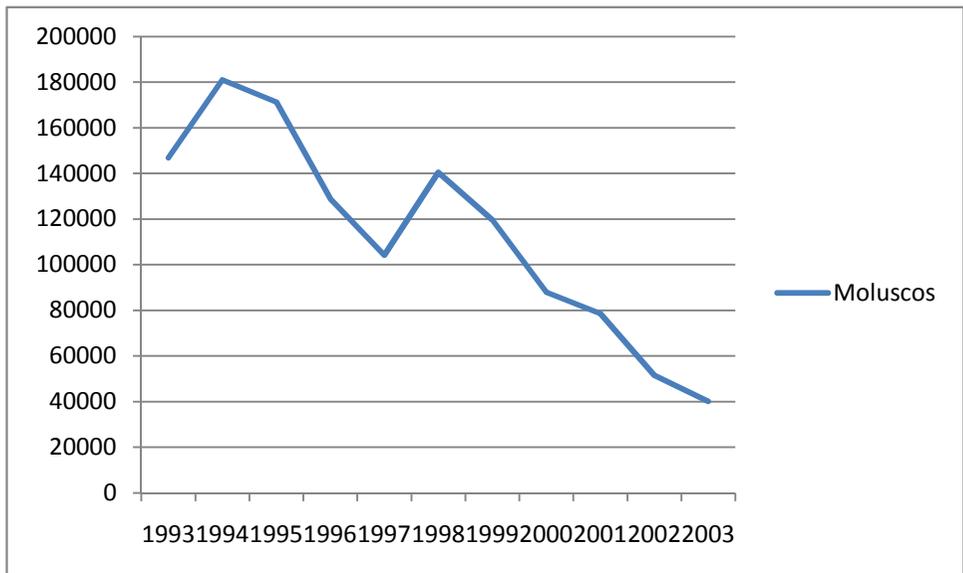
humano tras su reinstalación durante un periodo mínimo de 12 meses, o tras una depuración intensiva a fin de cumplir las condiciones mencionadas anteriormente.

A falta de métodos habituales de detección de virus y de normativa en cuanto a la calidad virológica, el control sanitario se basa en el recuento de bacterias fecales. Así pues, los moluscos bivalvos destinados al consumo humano inmediato deben cumplir básicamente los niveles establecidos para una zona de categoría A, y no contener *Salmonella* en 25 gramos de carne. Además deben cumplir con las características visuales propias de frescura y viabilidad y no contener compuestos tóxicos o nocivos (toxinas, metales pesados, pesticidas).

2.6 Tendencias en el consumo de moluscos bivalvos

La evolución de las capturas de la flota española entre 1993 y 2003 viene expresado en el gráfico (Figura 6):

Figura 6. Evolución de las capturas de la flota española entre 1993-2003.



Fuente: Servicio de Estadísticas Pesqueras. Secretaría General Técnica. MAPA

A la vista de la tabla se puede concluir que las capturas de moluscos han descendido un 72.7 % en esos diez años.

El consumo per cápita de moluscos por comunidad autónoma y provincia en hogares en el año 2011 se muestra en la siguiente figura (Figura 7 y 8).

Figura 7. Consumo per cápita de moluscos por comunidad autónoma en 2011.

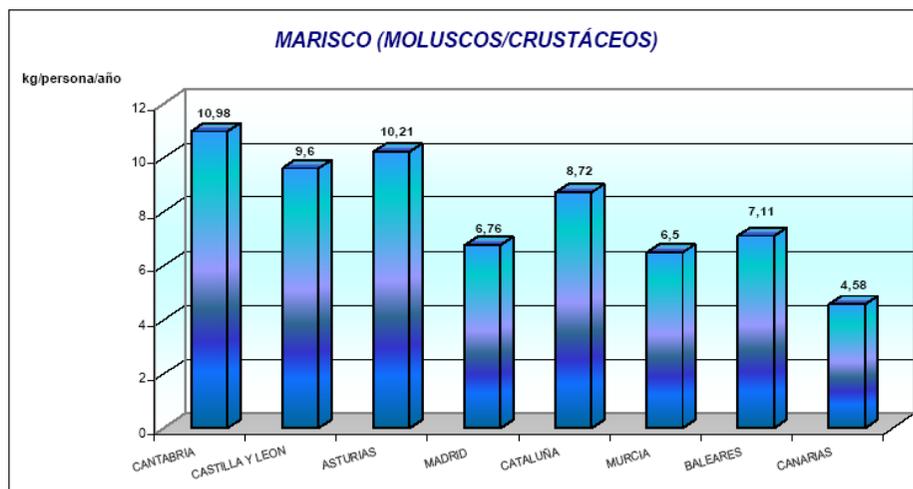
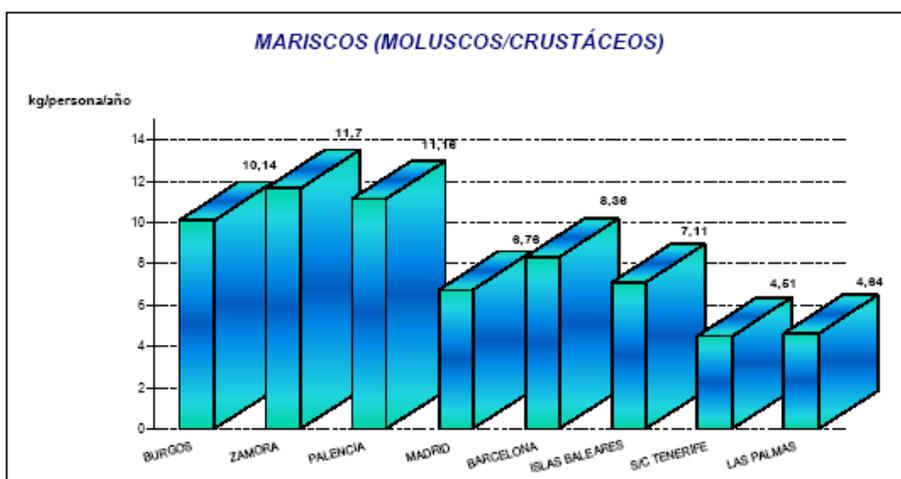
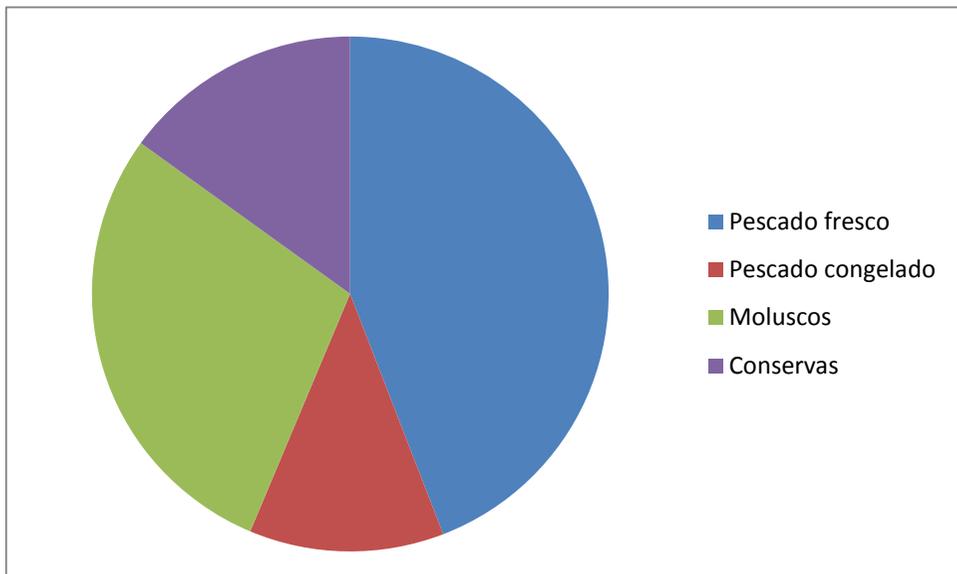


Figura 8. Consumo per cápita de moluscos por provincia en 2011



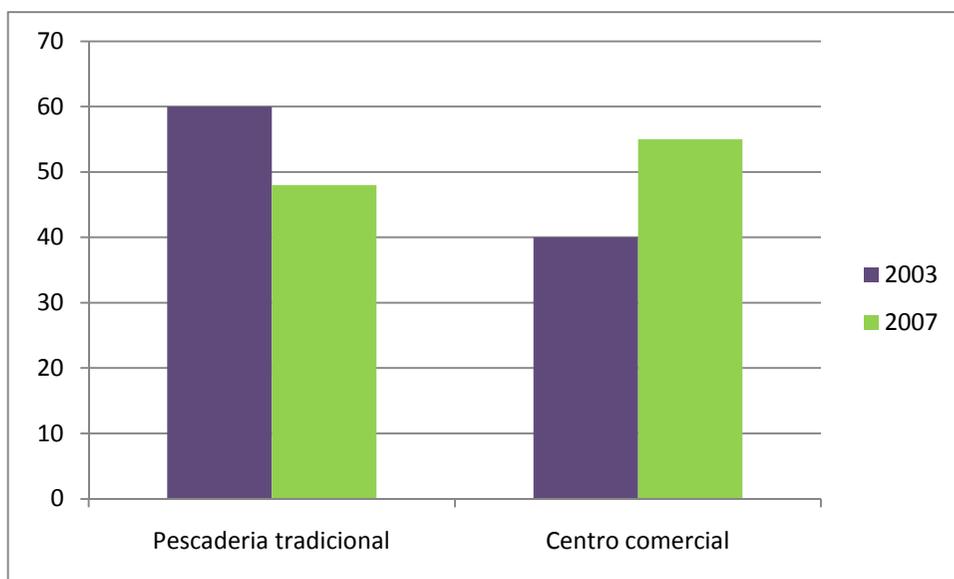
En 2011 en los hogares españoles se han consumido un total de 27,30 kilogramos de productos pesqueros por persona y año. El pescado fresco representó el mayor consumo con el 44,14% del total, seguido del consumo de mariscos, moluscos o crustáceos (28,64%), el consumo de pescado congelado representó el 12,20%, finalmente las conservas de pescado se consumieron el 15,04% (Figura 9).

Figura 9. Consumo de pescado en 2011.



Del año 2003 a 2007 se ha producido una evolución en cuanto al lugar de compra de este tipo de alimento. En 2003 del total de moluscos comprados más de la mitad se compraron en una pescadería tradicional; en cambio en 2007 estas cifras se invirtieron (Figura 10) (FROM, 2010).

Figura 10. Compra en pescadería tradicional versus centro comercial en 2003 y 2007.



3. BACTERIAS,
PROTOZOOS
Y PARASITOS
TRANSMITIDOS
POR VIA HIDRICA
Y/O MOLUSCOS

1.1 Generalidades

Microorganismos patógenos tales como bacterias, protozoos y parásitos, y toxinas producidas por cianobacterias, se transmiten por vía hídrica o están asociados al consumo de moluscos bivalvos (tabla 1), produciendo toxiinfecciones e intoxicaciones alimentarias, aunque son los virus los predominantes.

Tabla 1. Microorganismos transmitidos por vía hídrica tipo especie patología.

Tipo	Especie	Patología
Bacterias	<i>Salmonella</i> spp. <i>Shigella</i> spp. <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva <i>E.coli</i> enterohemorrágica <i>E.coli</i> enterotoxigénica <i>Campylobacter</i> spp. <i>V. cholerae</i> O1 <i>V. cholerae</i> no O1 <i>Vibrio vulnificus</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritis Disentería Disentería Diarrea con sangre Diarrea Gastroenteritis Cólera Diarrea Gastroenteritis Diarrea con sangre
Patógenos oportunistas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Aeromonas</i> spp. <i>Flavobacterium</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp. <i>Klebsiella</i> spp. <i>Legionella</i> spp.	Infecciones oculares y del oído Lesiones en la piel Infecciones de herida, diarrea Meningitis Meningitis, infecciones heridas Neumonía Enfermedad del legionario
Protozoos	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia intestinalis</i> , <i>Giardia lamblia</i> <i>Crptosporidium parvum</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Acanthamoeba</i> spp. <i>Gonyaulax</i> spp. <i>Pyrodinium</i> spp. <i>Procentrum</i> spp. <i>Dinophysis</i> spp.	Disentería Giardiasis Diarrea Meningoencefalitis Lesiones en la piel, conjuntivitis Intoxicación paralítica Intoxicación diarreica
Parásitos	<i>Schistosoma</i> spp. <i>Dracunculus medinensis</i> <i>Ancylostoma</i> , <i>Ascaris</i> , <i>Taenia</i>	Esquistosomiasis, dermatitis Dracunculiasis Trastornos gastrointestinales

3.2 Bacterias

Las bacterias patógenas humanas transmitidas por el pescado se pueden dividir en dos grupos: uno constituido por géneros y especies cuyo hábitat natural es el agua (*V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *Pleisomonas shigelloides*, *Edwardsiella tarda*, *Aeromonas*...) y el otro que incluye bacterias presentes en el agua pero procedentes de contaminación de origen fecal y/o asociadas con el procesado y la manipulación posterior del pescado (*Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*) (HERRERA y cols., 2005).

E.coli

La utilización del grupo coli aerógenos como indicadores de contaminación fecal del agua y de los alimentos es una práctica establecida desde hace muchos años.

El grupo de coliformes fecales está restringido a organismos que crecen en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y humanos. Incluye a los miembros de géneros de la familia Enterobacteriaceae, *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. Debido a la evidencia de la existencia de *E. coli* patógenas, y a que la comprobación de la ubicuidad de *Klebsiella* es mayor de los que se

suponía, algunos investigadores han sugerido que se utilice solo la enumeración de *E. coli* como índice de contaminación fecal directa o indirectamente.

Algunas cepas de *E.coli* que causan enfermedades gastrointestinales en los humanos se denominan de manera general enteropatógenas. Estas cepas de *E.coli* que causan enfermedades diarreicas son reconocidas actualmente y se agrupan en seis categorías: enterotoxigénicas, enteroinvasivas, enteropatógenas, enteroagresivas y enterohemorrágicas. Mas recientemente se ha descrito un nuevo grupo llamado *E.coli* enterogregativa difusa pero sus propiedades virulentas no están esclarecidas.

Los biotipos toxigénicos, invasivos y patógenos infantiles han estado implicados con alimentos y aguas como vía de transmisión.

El interés de la detección de *E. coli* patógenas no se ha limitado a muestras clínicas, la detección directa en muestras de alimentos cárnicos contaminados y poco cocidos, leche cruda, frutas, ensalada de vegetales, mayonesa, agua etc., han estimulado las investigaciones conducentes a

establecer los posibles alimentos que pueden servir como vehículos de cepas patógenas de *E. coli* (VILLALOBOS y ELGUEZABAL, 2000).

Salmonella spp

Se encuentra distribuida a nivel mundial. Es un agente zoonótico importante y ha sido aislada a partir de una gran variedad de animales homeotermos y poiquilotermos. Peces y crustáceos capturados en aguas contaminadas con heces pueden portar este microorganismo.

En Europa está bien documentado el brote ocurrido en febrero de 2001 en Noruega y Suecia en el que notificaron 60 casos, tres de los cuales fueron fatales y 22 necesitaron ser hospitalizados; en este brote se logró aislar *Salmonella livingstone* a partir de un producto derivado del pescado en una tienda al por menor. Otro brote que es importante resaltar, se presentó en el Reino Unido; se debió a *Salmonella paratyphi-B* y fue ocasionado por comida para llevar que fue contaminada por un manipulador de alimentos portador asintomático. También existen datos relacionados con el aislamiento de *Salmonella* a partir de pescado en agua dulce, mariscos crudos, alimentos marinos listos para consumir, pescado ahumado, moluscos bivalvos recogidos en una zona de cría contaminada, entre otros (HERRERA y cols., 2005).

Listeria monocytogenes

Es una bacteria ubicuitaria, ampliamente distribuida en la naturaleza. Los animales y el ser humano actúan, en general, como portadores subclínicos. Atraviesa la barrera placentaria en las gestantes y puede producir abortos, partos prematuros y afectar al feto. Las formas más graves se presentan con sepsis o con meningoencefalitis. Esta bacteria suele estar relacionada, en la mayoría de las veces, con el consumo de alimentos. Los alimentos más implicados en los brotes y en los casos esporádicos de listeriosis son los crudos tanto de origen animal como vegetal, los productos lácteos, en especial los quesos de pasta blanda, la carne de pollo, los embutidos cocidos y crudos curados, los patés y los productos de la pesca crudos o ahumados. Prácticamente en todos los alimentos y en todos los países en los que se ha buscado se ha encontrado *L. monocytogenes*, incluso en alimentos que han sufrido un tratamiento térmico y son recontaminados posteriormente. Desde 1997 se ha descrito una listeriosis con afectación exclusivamente gastrointestinal y con un comportamiento diferenciado de la listeriosis invasiva. Son brotes en los que la contaminación de los alimentos que los ocasionan es muy elevada ($> 10^7$ unidades formadoras de colonias ufc/g) y con un período de incubación de menos de 24 horas (SERRA y MATA, 2006).

Vibrios

La presencia de vibrios, en particular *V. cholerae*, *V. vulnificus* y *V. parahaemolyticus* en los alimentos representa un serio problema de salud humana. Estas bacterias se aíslan con frecuencia de los estuarios y ambientes marinos, tanto sus formas patógenas como no patógenas, así como de peces y moluscos de estos ambientes. Los cambios en los tipos de alimentación, la importación de alimentos crudos de zonas cálidas, así como el aumento de consumo de estos productos, explicarían el incremento progresivo de este tipo de toxiinfecciones en los países occidentales. En este sentido, es interesante resaltar que la conocida estacionalidad de estas infecciones en los meses de calor no siempre se cumple, ya que cada vez es más frecuente que, en invierno, importemos alimentos procedentes de zonas cálidas (GIL, 2004).

1.3 Protozoos y parásitos

Los moluscos bivalvos, al concentrar partículas alimenticias, pueden también retener y acumular formas de resistencia de organismos parásitos, en particular protozoos, que se encuentran en el agua de mar circundante y cuya forma y tamaño son similares al de las partículas retenidas. Entre estos parásitos se encuentran *Cryptosporidium* spp.; *Giardia* spp.; *Cyclospora* spp.; *Toxoplasma gondii*; y algunas especies de Microsporidia, los cuales presentan una distribución cosmopolita y son frecuentemente diagnosticados en el hombre y animales. Los estados exógenos, ooquistes/quistes/ esporas, son resistentes a la mayoría de los desinfectantes comúnmente utilizados y pueden sobrevivir en medios acuáticos durante semanas y/o meses, incluso cuando se exponen a un amplio rango de temperaturas y salinidades (FAYER y cols., 2004). Algunas de estas especies fueron responsables de importantes brotes de infección relacionados con la contaminación de aguas destinadas al consumo humano (LEE y cols., 2002). Aunque también han sido detectadas en moluscos bivalvos, hasta la actualidad no se ha descrito ningún brote infeccioso asociado con su consumo (GRACZYK y cols., 2003).

La presencia de ooquistes de *Cryptosporidium* spp. en aguas costeras ha sido demostrada por diversos autores (FAYER y cols., 1998) y su supervivencia confirmada mediante colorantes vitales y ensayos de infectividad en ratones. Diversos estudios experimentales comprobaron la captación y retención de formas infectantes del parásito por moluscos bivalvos (MILLER y cols., 2005).

También, la contaminación natural fue observada en diferentes especies destinadas al consumo humano. Al igual que *Cryptosporidium*, quistes de *Giardia* spp. han sido detectados en aguas marinas. Su supervivencia en agua de mar no ha sido evaluada, pero la existencia de infecciones en mamíferos marinos sugiere que, de alguna forma, ofrecen cierta resistencia al menos a salinidades bajas. Experimentalmente se ha demostrado que la almeja *C. fluminea*, el mejillón *D. polymorpha* y la ostra *C. virginica* pueden acumular quistes de *G. duodenalis* (GRACZYK y cols., 2003).

Estas observaciones fueron confirmadas posteriormente en moluscos bivalvos naturalmente contaminados.

Brotos de cyclosporidiosis descritos en países industrializados se han relacionado con el consumo de alimentos, como frutas y verduras, importados de regiones tropicales y subtropicales donde la infección humana es más frecuente (MANSFIELD y GAJADHAR, 2004). Se ha demostrado que la almeja de agua dulce *C. fluminea* puede captar y retener ooquistes de *Cyclospora cayetanensis* presentes en agua contaminada experimentalmente.

La elevada seroprevalencia de *T. gondii* detectada en varias especies de mamíferos marinos evidencia la presencia y supervivencia de este parásito en el medio marino y demuestra la capacidad de los ooquistes para esporular en el agua de mar y mantener su viabilidad durante al menos 6 meses.

4. VIRUS

1.1 Generalidades

Prácticamente todos los virus enteropatógenos pueden transmitirse por el agua o por los alimentos. Está documentada la transmisión alimentaria de virus Norwalk, calicivirus, astrovirus, adenovirus entéricos, rotavirus y parvovirus, que producen gastroenteritis víricas. La contaminación de los alimentos se produce por su manipulación por personas portadoras o por aguas contaminadas, y los que están implicados suelen ser los que no han sufrido un tratamiento térmico posterior a su manipulación, como las ensaladas o el pescado y marisco crudos.

De todas maneras, la enfermedad vírica más repetida transmitida por alimentos es la hepatitis A, pero las más usual transmitida por los moluscos son los norovirus. Los alimentos implicados más frecuentemente son los mariscos cultivados en zonas contaminadas que se consumen crudos o poco cocinados y aquellos que son contaminados por los manipuladores portadores, especialmente los que no son cocinados después de la manipulación (vegetales, ensaladas, pescados, leche y productos lácteos) (SERRA y MATA, 2006).

Los virus han demostrado además presentar una mayor estabilidad en el ambiente que los indicadores bacterianos comúnmente utilizados para evaluar la contaminación fecal (MELNICK, 1984). La contaminación del medio ambiente a partir de aguas residuales se confirma al analizar la presencia de virus en aguas superficiales de ríos y lagos en los que detectamos altos porcentajes de muestras positivas al analizar de 1-4 litros de muestra (PINA y cols., 1998), y en los frecuentes casos de infecciones virales asociados al consumo de moluscos bivalvos que se observan cada año en países industrializados (LEES, 2000). Los virus entéricos en agua pueden permanecer estables durante meses o incluso más tiempo si están asociados a sólidos y pueden acumularse en sedimentos donde persistirán durante más tiempo y desde donde pueden resuspenderse en la columna de agua por diversos procesos naturales como lluvias fuertes, o por procesos artificiales, facilitando la diseminación viral (RZEZUTKA y COOK, 2004).

Se ha observado en algunos casos que los estándares de calidad microbiológica actuales no garantizan la ausencia de virus y se han aislado virus en agua de bebida, aguas superficiales, agua de mar o moluscos bivalvos que cumplen los estándares actuales de índices bacterianos (VIVIER y cols., 2004).

El único parámetro viral incluido en la normativa actual europea es la presencia de enterovirus en aguas recreacionales ya que en general se aíslan y cuantifican con facilidad mediante las técnicas actuales. Los datos existentes obtenidos utilizando técnicas moleculares han permitido observar que la presencia de enterovirus no se relaciona con la presencia de otros virus patógenos y se ha sugerido la utilización de bacteriófagos como indicadores que permiten una rápida identificación de virus infecciosos y de adenovirus humanos como índice molecular de contaminación viral de origen humano (FORMIGA-CRUZ y cols., 2003).

5. NOROVIRUS

5.1 Generalidades

El género Norovirus junto a Sapovirus, Vesivirus y Lagovirus (Tabla 2), forman la familia *Caliciviridae*. Los virus que componen esta familia son icosaédricos, no recubiertos, de genoma constituido por una sola hebra de ARN (ssRNA) en sentido positivo.

Tabla 2. Estructura taxonómica de Calicivirus.

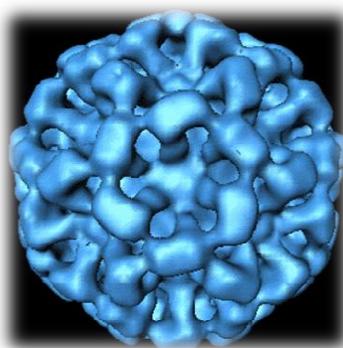
Género	Especie
Norovirus	Norwalk virus
Sapovirus	Sapporo virus
Lagovirus	Virus de la enfermedad hemorrágica del conejo Virus del síndrome de la fiebre parda europea
Vesivirus	Virus del exantema vesicular porcino Calicivirus felino

Los principales agentes patógenos humanos de esta familia son norovirus y sapovirus que causan gastroenteritis aguda. Como patógenos animales se incluyen vesivirus como los calicivirus felinos, que causan infección respiratoria en gatos.

Los norovirus son virus pequeños, con un diámetro aproximado de 38 nanómetros, no envueltos e icosaédricos.

Los viriones se componen de una única proteína estructural de la cápside. Las técnicas de criomicroscopía electrónica revelan la estructura de simetría icosaédrica de la cápside (GLASS y cols., 2000). La proteína estructural, constituida por 180 moléculas, se pliega en 90 dímeros formando una cubierta continua con protusiones en forma de arco (Figura 11). Una característica clave es la existencia de 32 depresiones en forma de copa, situadas en los ejes del icosaedro, de cuya denominación latina, *calix*, deriva su nombre (ATMAR y ESTES, 2001).

Figura 11. Estructura tridimensional de Calicivirus tipo Norwalk, determinada por procesamiento de imagen de microfotografías electrónicas.

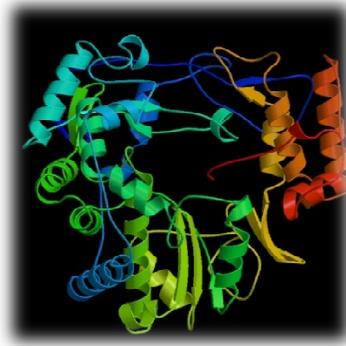


Son pequeños virus esféricos, no envueltos, que tienen un tamaño de entre 28 y 35 nanómetros, que contienen un genoma (ribonucleico) de ARN monocatenario de 7.3 a 7.6 kb. El genoma de los Calicivirus humanos consiste en una cadena sencilla de ARN de polaridad positiva. El genoma de los norovirus se organiza en tres secuencias de lectura abierta (ORF). La ORF1 codifica una poliproteína precursora de las proteínas no estructurales, la ORF2 codifica la proteína de la cápside y la ORF3 codifica una proteína pequeña cuya función no se conoce. Estudios recientes indican que se trata de una proteína estructural menor (TSAN-YUK y cols., 2012).

El genoma de los sapovirus difiere del anterior, de manera que la ORF1 codifica las proteínas no estructurales y, además, la proteína estructural de la cápside. La ORF2 codifica una proteína pequeña de función desconocida similar a la ORF3 del virus Norwalk. En los sapovirus se ha visto también un ORF3 de significado incierto todavía. Los estudios sobre las diferencias entre ambos genomas han llevado a la subdivisión en géneros dentro de los genogrupos.

Los Calicivirus, poseen tres proteínas estructurales que mantienen la integridad estructural y tienen capacidad inmunógena e infectiva. Se ha demostrado en estudios recientes que estas proteínas podrían ser determinantes de especificidad de las diferentes cepas. También se han identificado siete proteínas no estructurales, algunas con función desconocida. La principal proteína no estructural parece ser una ARN-polimerasa dependiente de ARN, pudiendo detectarse funciones helicasa y proteasa, así como en el anclaje de la proteína precursora de la cápside con estructura plegada similar a la quimiotripsina (Figura 12) (FARKAS y cols., 2010).

Figura 12. Representación de la estructura proteasa de norovirus.



5.2 Reservorio y fuente de infección

El género norovirus presenta una elevada variabilidad genética que se explica por mutaciones puntuales y por recombinación entre diferentes fragmentos homólogos de ARN que, por coinfección, hayan entrado en una misma célula. Clásicamente, el género se ha dividido en dos genogrupos, I y II. Las especies prototipo del genogrupo I y las del genogrupo II incluyen las variantes recogidas en la tabla 3 (L'HOMME y cols., 2009).

Tabla 3. Clasificación de norovirus.

NOROVIRUS	Genogrupo I	Virus Norwalk, Southmanpton, Desert Shield, Queens Arms, Winchester, Musgrove, Sindlesham
	Genogrupo II	Virus Snow Mountain, Hawai-Toronto, México y Lordsdale, Bristol, Camberwell, Melksham, Hillingdon, Leeds

Los estudios más recientes de epidemiología molecular han demostrado que la gran diversidad genética de norovirus se puede estudiar mejor en relación con la proteína principal de la cápside que se relaciona con la especificidad antigénica y que permitiría reconocer cinco agrupaciones filogenéticas o genogrupos GI a GV, que se subdividen en una treintena de genotipos. Tres de los genogrupos de esta clasificación (GI, GII y GIV) afectan a las personas,

mientras que el genogrupo GII se ha descrito en el ganado bovino y el GV, en ratones.

El hombre es el único reservorio de norovirus confirmado, aunque no se puede descartar el reservorio animal. La infección por norovirus está sumamente extendida por el mundo. En países desarrollados se empiezan a detectar anticuerpos séricos la edad de 3-4 años y anticuerpos tipo Ig A secretores en leche materna y su prevalencia va aumentando hasta el 50 % en la quinta década de la vida.

5.3 Sintomatología clínica

El período de incubación más habitual es de 24 a 48 horas y la transmisibilidad es máxima durante las primeras 24 - 48 horas de la enfermedad. Los individuos infectados tienen una probabilidad elevada de transmitir la infección a sus contactos domiciliarios o muy cercanos, por lo que en brotes de exposición única son frecuentes los casos secundarios.

La enfermedad causada por norovirus, suele ser leve o moderada y de curso limitado; a menudo se presenta en brotes con síntomas clínicos como náuseas (79 %), vómitos (69 %), diarrea no sanguinolenta (66 %), fiebre (37 %) y dolor abdominal (30 %) (Tabla 4) (RIBES y BUESA, 2010). Los síntomas gastrointestinales generalmente persisten de 24 a 48 horas (MANDELL y cols., 2006).

Tabla 4. Síntomas presentados por los afectados por un brote.

SINTOMAS	%
Nauseas	79
Vómitos	69
Diarreas	66
Fiebre	37
Dolor abdominal	30

La gastroenteritis por norovirus se caracteriza por un inicio súbito de diarrea y/o vómitos que se autolimitan en unos tres días. En la mayoría de ocasiones la sintomatología es moderada, pero hay algunas personas para las cuales la diarrea y/o los vómitos son realmente incapacitantes. Se ha observado que los vómitos predominan en niños (GIOVANNI y cols., 2011).

Se ha descrito casos graves asociados a enterocolitis necrosante y fallecimientos de pacientes de edad avanzada en brotes en residencias de ancianos. La gravedad de la enfermedad, comparada con la diarrea por rotavirus, parece ser ligeramente menor en estudios basados en pacientes extrahospitalarios, mientras que, en niños hospitalizados, posee una gravedad similar. Se han descrito la persistencia de infección con síntomas durante más de un año en pacientes pediátricos oncológicos y en adultos inmunodeprimidos. Tanto en personas de edad avanzada como en niños pequeños pueden aparecer alteraciones hidroelectrolíticas, haciendo necesaria la rehidratación por vía oral o parenteral. Las alteraciones provocadas por norovirus afectan fundamentalmente al tracto intestinal, aunque hay que tener en cuenta que también puede ocasionar otras manifestaciones clínicas.

5.4 Supervivencia

Son virus estables dentro de un amplio rango de temperaturas, sobreviven a la congelación, refrigeración, calentamiento a 60 ° C y a la acción de algunos desinfectantes clorados, ácidos, alcohol y soluciones antisépticas de higiene de manos (KHAN y cols., 2010). De aquí que se puedan encontrar en hielos elaborados con agua contaminada o bien que se haya contaminado su superficie. Estos virus pueden encontrarse en una gran variedad de superficies que si no se limpian y desinfectan adecuadamente pueden constituirse en reservorio que alarga la duración de los brotes, especialmente cuando se trata de entornos cerrados como hospitales, residencias geriátricas o cruceros. Son también resistentes a los cambios de pH, aún tras una exposición a un pH de 2,7 durante un período de 3 horas a temperatura ambiente, retienen su capacidad infectiva, lo que explica que sobreviva al paso por el medio ácido del estomago (DUIZER y cols., 2004). Resisten concentraciones de cloro entre 3,75-6,25 mg cloro/L, sin embargo se inactivan a 10 mg cloro/L, por lo que esta es la concentración de cloro utilizada tras una sospecha de contaminación por este virus.

Pueden sobrevivir por períodos prolongados en agua de mar, especialmente en invierno cuando las temperaturas son bajas. Se ha visto que algunas variantes de calicivirus pueden permanecer viables por más de 14 días a 15 ° C, en el agua de mar.

5.5 Patogenia y virulencia

Es un virus altamente contagioso, solo precisa 100 viriones para producir enfermedad (KHAN y cols., 2010; FALLAHI y MATTISON, 2011).

El estudio de los mecanismos moleculares de la patogenia y de la inmunidad está limitado por la ausencia de un modelo animal y por la incapacidad de los norovirus de replicar *in vitro*. En estudios con voluntarios infectados llama la atención que, aproximadamente, el 13-40% de los voluntarios no se infectan, y únicamente un 50% desarrollan la enfermedad. Estas observaciones hicieron sospechar que la susceptibilidad del hospedador es importante en el desarrollo de la enfermedad. Se ha demostrado que la infección depende de la presencia de antígenos de grupo histosanguíneo (HBGA, del inglés *histo-blood group antigens*) específicos, que actúan como receptores para el virus en el intestino de los hospedadores susceptibles. La combinación de la unión específica de cada cepa de norovirus a receptores HBGA específicos y la expresión variable de los mismos puede explicar la distinta susceptibilidad a la infección, tanto en el contexto de brotes como en voluntarios sanos.

Los norovirus se unen a los receptores celulares a través de un dominio específico de la proteína de la cápside. Ésta posee dos dominios funcionales: el dominio S (la porción interna de la cápside) y el dominio P (la porción protuberante). El dominio P se divide en los subdominios P1 (el enlace entre el interior y la región P2) y P2 (que se une al receptor celular y es la región más externa de la cápside). La secuencia génica que codifica P2 es la región más variable del genoma de norovirus y expresa determinantes de su unión al receptor y epítomos reconocidos por anticuerpos (ALLEN y cols., 2008).

Los receptores HBGA son una familia compleja de glucanos presentes en la superficie de células sanguíneas, en los epitelios intestinales y respiratorios, y en secreciones biológicas, como la saliva y la leche. La expresión de HBGA está regulada por varios genes que determinan la vía biosintética específica que establece los fenotipos ABO, Lewis y secretor. La presencia o la ausencia de alelos de los genes FUT1, FUT2 y FUT3, que codifican las enzimas que glucosilan de forma secuencial distintos precursores, determinan si un individuo es susceptible a la infección por una cepa determinada de norovirus.

El estado denominado “secretor” depende de la expresión del gen que codifica la enzima α -1,2-fucosiltransferasa (FUT2) y determina la susceptibilidad a las infecciones por norovirus. Las personas que son “no secretoras” (20% de los europeos) son resistentes a la infección por el virus Norwalk (GI.1). Se ha observado que algunas cepas de norovirus infectan sólo a un conjunto de la población humana y se han identificado ocho patrones distintos de HBGA que permiten la unión a muy diversos genotipos de norovirus dentro de los genogrupos GI y GII, lo que hace posible que prácticamente todos los individuos sean susceptibles a la infección por alguna cepa de norovirus. Aunque parece que los HBGA son esenciales para la infección, pueden existir otros receptores adicionales, o los norovirus podrían unirse a otros hidratos de carbono no identificados todavía. El estudio de los mecanismos evolutivos de persistencia de norovirus se ha realizado con el genotipo GII.4, porque es el predominante a nivel mundial en los últimos 20 años. Se ha propuesto que el genotipo GII.4 sufre un proceso de evolución secuencial, similar al que ocurre con los virus gripales. La mayor parte de las variaciones ocurren cerca del dominio de unión al receptor y consisten en cambios de aminoácidos en la región P2 y en zonas adyacentes de la región.

Estos cambios permitirían a los virus escapar del reconocimiento por los anticuerpos y originarían nuevos patrones de unión a los receptores HBGA (RIBES y BUESA, 2010).

5.6 Inmunidad

Los estudios realizados con voluntarios demostraron que los individuos infectados desarrollan una respuesta inmunitaria después de la infección, aunque de corta duración, de entre 6 y 14 semanas. La infección por norovirus induce una respuesta específica de anticuerpos IgG, IgA y IgM, incluso si ha habido exposición previa. Dos semanas después de la infección por norovirus se ha demostrado un aumento en la síntesis yeyunal de IgA y la mayoría de los pacientes son resistentes a la reinfección durante 4-6 meses. Sin embargo, se ha observado una falta de protección a largo plazo (LOPMAN y cols., 2003).

Contrariamente a lo esperado, estos estudios también demostraron que los individuos con títulos más elevados de anticuerpos séricos o de coproanticuerpos tenían más probabilidad de infectarse con el virus que las personas con concentraciones bajas de anticuerpos. Este hecho se explica porque las personas sin anticuerpos frente a una cepa determinada de norovirus no son genéticamente susceptibles a ella. También se observó que individuos que fueron sintomáticos podían reinfectarse cuando se les volvía a inocular norovirus 27-42 meses más tarde. A pesar de estos resultados, estos mismos estudios con voluntarios y otros trabajos sugieren que se desarrolla, al menos,

una protección parcial frente a infecciones posteriores por norovirus, como es el caso de algún estudio de cohortes en comunidades (ROCKX y cols., 2002).

La elevada prevalencia de infecciones por norovirus entre los niños y los ancianos, y los avances limitados que se han hecho en la prevención de los brotes epidémicos ha llevado a algunos investigadores a considerar el papel potencial de las vacunas en el control de la enfermedad. Los destinatarios de ese tipo de vacunas serían los bebés (incluyéndola dentro del calendario de vacunación), los ancianos, los manipuladores de alimentos, el personal militar, los viajeros, los trabajadores de la salud y los asistentes de guarderías. Por otra parte, ya que los norovirus provocan la mayoría de las infecciones en los niños y posiblemente, es la segunda causa más común de diarrea grave en el mundo en desarrollo, las vacunas podrían desempeñar un papel clave en los calendarios de vacunación, con el fin de reducir la mortalidad infantil y el control de las enfermedades diarreicas. Una revisión sistemática reciente de la literatura señala que el 15% de las hospitalizaciones de niños con diarrea en la India y el 31% en el Perú se asociaron con la infección por el norovirus, porcentajes éstos que podrían contribuir en gran medida con la muerte de 1.6 millones de niños por año debido a la diarrea.

Los estudios preclínicos han demostrado que las partículas símil virus administradas como vacunas a ratones por vía parenteral, oral o intranasal son altamente inmunogénicas. En el grupo de voluntarios, las partículas recombinantes símil virus expresadas en plantas transgénicas y administradas por vía oral y las símil virus expresados en baculovirus y administradas por vía oral han sido seguras e inmunogénicas. Sin embargo, sigue presentando un gran desafío el desarrollo de vacunas contra las infecciones por norovirus, incluyendo la necesidad de mayor comprensión de los factores de protección inmunológica, la falta de una buena protección a largo plazo, la diversidad antigénica de las cepas, y la existencia de múltiples tipos genéticos y antigénicos de virus. La reciente predominancia de cepas poco comunes indica que, por el momento, los candidatos a la vacuna podrían requerir relativamente pocos antígenos. Sin embargo, dada la evolución continua y rápida del virus, podría ser necesario implementar un proceso anual de selección de cepas, similar al que se hace con el virus de la gripe, para adecuar la vacuna a las cepas del norovirus que están en circulación. Los estudios de las vacunas de prueba con las partículas símil virus apenas están empezando, y los conocimientos que se obtienen de estos estudios bien podrían determinar la viabilidad final de este enfoque (ROGER y cols., 2009).

5.7 Diagnóstico

Hasta 1993, el único método disponible para diagnosticar las infecciones por norovirus fue la microscopia electrónica. Una vez conocida la secuencia nucleotídica de su genoma, la PCR-TR se ha convertido en la técnica de referencia para su diagnóstico, lo que nos permite detectar norovirus en muestras clínicas y ambientales, en agua y alimentos. Esta técnica, junto a la secuenciación de los amplificados, es particularmente útil en los estudios epidemiológicos para descubrir el origen de un brote o para caracterizar cepas. Se han descrito múltiples cebadores para detectar secuencias genómicas de norovirus. En general, estos cebadores están diseñados para detectar el gen de la ARN-polimerasa viral (región A) o el gen de la cápside (región C). Dos cebadores comúnmente utilizados para identificar el gen de la ARN-polimerasa son JV12Y (ATACCACTATGATGCAGAYTA) y JV13I (TCATCATCACCATAGAAIGAG) (VENNEMA y cols., 2002). La secuenciación de los amplificados permite identificar el genotipo (GI.1-8 y GII.1-17) o el genogrupo (I o II) del aislado al comparar la secuencia con otras secuencias que han sido depositadas en bases de datos de norovirus, como la base europea. El diagnóstico de PCR-TR puede mejorarse con la aplicación de la técnica de PCR-TR a tiempo real (*real time*). Esta técnica es más sensible y

permite detectar y diferenciar entre genogrupos I y II más rápidamente. El empleo de la técnica de PCR-TR a tiempo real se ha generalizado últimamente en laboratorios que procesan un elevado número de muestras.

Existen métodos comerciales basados en la detección de antígenos de norovirus por métodos inmunoenzimáticos. En general, estos métodos poseen una elevada especificidad pero una moderada sensibilidad. Además, tienen el problema de que son específicos para algunos norovirus, por lo que los resultados pueden variar según las cepas circulantes. Por lo tanto, si las muestras de brotes son negativas por análisis inmunoenzimático, los resultados deberían confirmarse por PCR-TR. Su utilidad depende de la relación entre sensibilidad y especificidad y variará dependiendo de si el objetivo es la investigación de un brote o el diagnóstico clínico de casos esporádicos. Estos métodos son especialmente útiles cuando hay que diagnosticar brotes de gastroenteritis de los que se dispone de muchas muestras. En esta situación, la detección fiable del virus en unos pocos casos es suficiente para la confirmación de la etiología de la enfermedad (GRAY y cols., 2007).

En España existen dos ensayos inmunoenzimáticos comercializados para diagnosticar infecciones por norovirus: IDEIA®Norovirus (Oxoid, Thermo

Fisher Scientific) y RIDASCREEN® Norovirus (R-Biopharm). En comparación con la PCR-TR, la sensibilidad de los ensayos IDEIA® y RIDASCREEN® Norovirus es del 58,93 y 43,81%, con una especificidad del 93,91 y 96,37%, respectivamente (GRAY y cols., 2007). La sensibilidad de ambos ensayos aplicados a estudios de brotes de gastroenteritis mejoró cuando se evaluaron 6 o más muestras de un mismo brote. Actualmente, también se dispone de un método rápido consistente en un ELISA de membrana que detecta cepas de ambos genogrupos GI y GII (RIDA®QUICK Norovirus, R-Biopharm).

Debido a las dificultades técnicas, hasta ahora no se había desarrollado ninguna técnica inmunocromatográfica para el diagnóstico rápido de norovirus, como las existentes para rotavirus. Sin embargo, recientemente han aparecido publicaciones que describen el desarrollo y la aplicación diagnóstica de métodos inmunocromatográficos para norovirus. Estos trabajos demuestran que los equipos presentan niveles de sensibilidad cercanos al 100% y con una especificidad del 75% (KHAMRIN y cols., 2009). Hay un kit en estudio para la detección de norovirus mediante inmunocromatografía. Este kit es de la casa comercial Operon (Operon, S.A, Zaragoza), que utiliza tiras para la detección de norovirus (Figura 13).

Figura 13. Tiras Operon para detección de norovirus.



Conviene recordar que, ya en 1982, Kaplan y sus colaboradores establecieron unos criterios epidemiológicos que pueden ser útiles para sospechar que los norovirus son la causa de un brote de gastroenteritis:

- a)* más de la mitad de los afectados evolucionan con vómitos
- b)* el período de incubación es de 24-48 h
- c)* la duración de la enfermedad es de 12 a 60 h
- d)* la ausencia de patógenos bacterianos en los coprocultivos

Estos criterios han sido posteriormente validados al resultar altamente específicos y razonablemente sensibles para diferenciar los brotes por norovirus de los debidos a otras causas (KAPLAN y cols., 1982)

5.8 Epidemiología de los brotes producidos por Norovirus

El estudio de los brotes de gastroenteritis, entendiendo por brote la existencia de dos o más personas que presentan una clínica similar siempre que estén relacionadas epidemiológicamente, permite destacar la importancia que tiene el norovirus como agente causal y, además, permite conocer el mecanismo de transmisión por el cual se ha llegado a producir el brote, cosa que no sucede con los casos esporádico. Así mismo, no se puede obviar que los brotes representan solo la parte más pequeña de todos los casos, ya que incluyen exclusivamente los que han consultado con los servicios sanitarios, que se han podido relacionar epidemiológicamente, que se han notificado a los servicios de salud pública y que finalmente han sido investigados.

Los norovirus infectan a personas de todas las edades. Sin embargo, son considerados grupos de riesgo los niños, los ancianos y los pacientes inmunodeprimidos. Los brotes de gastroenteritis por norovirus se producen durante todo el año, aunque existe una mayor incidencia durante los meses más fríos en los países de clima templado (HARRIS y cols., 2011; ALLEN y cols., 2008).

Sin embargo, también se ha descrito un incremento de brotes por norovirus en la primavera y el verano y en niños hospitalizados.

La prevalencia de norovirus como causa de gastroenteritis esporádica seguramente está subestimada debido a que no se realiza habitualmente un diagnóstico específico. La aplicación de las técnicas de PCR-TR ha demostrado que los norovirus son una causa frecuente de gastroenteritis esporádica en todo el mundo y en todos los grupos de edad. Se ha calculado que representan, aproximadamente, el 12% (4,4-30,7%) de los casos de gastroenteritis grave en niños menores de 5 años en todo el mundo. Por lo tanto, la infección por norovirus parece ser la segunda causa de diarrea endémica en niños después de rotavirus. En la mayoría de los brotes, las cepas más comunes son los genotipos o *clusters* del genogrupo II, especialmente el genotipo GII.4, que es el más frecuente. Este genotipo ha predominado durante los últimos 20 años en todo el mundo, siendo causante de pandemias de gastroenteritis por norovirus. En los últimos 15 años se han descrito seis subtipos o variantes de este genotipo, que han infectado a la población de forma secuencial. Como es lógico, el genotipo más prevalente en España en los últimos años ha sido también el GII.4 (DOMINGUEZ y cols., 2008; BUESA y cols., 2008; TU y cols., 2008).

5.9 Mecanismos de transmisión

Los mecanismos de transmisión para norovirus son usualmente de persona a persona, aunque los alimentos incluyendo los moluscos y el agua, están bastantes implicados en la transmisión (XERRY y cols., 2008) Por tanto se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Transmitidos de persona a persona
- Transmitidos por los alimentos
- Transmitidos por el agua

Transmitidos de persona a persona

Uno de los motivos por los cuales algunos autores consideran que las infecciones por norovirus son un problema emergente es porque, debido a los cambios en el estilo de vida de los países desarrollados y al envejecimiento de la población, existe un mayor número de personas que viven en residencias geriátricas (WIDDOWSON y cols., 2004; GOLLER y cols., 2004).

La infección por norovirus puede ser muy debilitante en personas de edad avanzada y ser motivo de hospitalización.

Dada la baja dosis infectante, y la resistencia del virus en el medioambiente, cuando se produce un caso entre residentes o entre personal cuidador en una institución de este tipo, suelen aparecer casos secundarios. Tanto si el origen del brote en una institución cerrada, es el consumo de algún alimento contaminado, como si es el contacto directo con algún miembro de la comunidad que estuviera excretando el virus, lo cierto es que la transmisión de la infección a los trabajadores, y especialmente a otros internos, es muy frecuente.

Teniendo en cuenta, por un lado, la mayor susceptibilidad a la infección y a la enfermedad que tienen las personas de edad avanzada, y por otro, la ausencia de inmunidad duradera después de enfermar, es muy importante que en las residencias geriátricas se adopten estrictas medidas de higiene tan pronto como aparezcan los primeros caso. Si no se procede de este modo, la infección inevitablemente se expandirá (WU y cols., 2005). La transmisión se produce fundamentalmente por contacto directo de persona a persona pero también debe considerarse la formación de aerosoles con partículas víricas durante el vómito (MORTER y cols., 2011).

Cuando estos brotes se producen en un hospital o centro socio sanitario tienen repercusiones particulares, porque las personas ingresadas tienen mayor riesgo de complicaciones, así como también por la importancia del coste económico que de ello se deriva. Las complicaciones que pueden aparecer son la deshidratación, trastornos electrolíticos y aspiración de vómitos. Algunos estudios relacionan estos procesos con un incremento en la mortalidad (GOODGAME, 2006; OKADA y cols., 2006). En este tipo de instituciones los brotes de gastroenteritis por norovirus se transmiten muy rápidamente, con elevadas tasas de ataque y son especialmente difíciles de controlar. Los gastos económicos que conlleva esta situación avalan la importancia de implementar medidas de prevención de la infección nosocomial por norovirus.

Para los brotes de gastroenteritis que ocurren en otros ámbitos como el familiar, la información disponible es limitada ya que no siempre se incluyen dichos brotes en los trabajos publicados.

En algunos países los brotes familiares no se notifican, pero sería conveniente que siempre fuesen de notificación obligatoria, ya que la magnitud del problema se estimaría mejor.

En los últimos años han adquirido especial atención los brotes en cruceros, debido a un aumento en este tipo de turismos (CRAMER y cols., 2006).

Son brotes que afectan a centenares de personas, que parten de una fuente común generalmente un alimento y su posterior transmisión persona a persona, bien a través de las manos contaminadas, bien a través del medio que les rodea (puertas, superficies contaminadas, etc) (ISAKBAEVA y cols. 2005). Para su prevención por tanto, habrá que tomar medidas tales como, un control sanitario de los alimentos, una manipulación higiénica de los mismos, y desinfecciones ambientales, así como son igualmente fundamentales la higienización de las manos del personal de tripulación y pasajeros, mediante soluciones alcohólicas.

Son varias las dificultades que se plantean ante la investigación y las actuaciones de control de los brotes asociados a cruceros por lo que resulta necesario que se rijan por una normativa de ámbito internacional (WIDDOWSON y cols., 2004; ISAKBAEVA y cols. 2005; TAKKINEN, 2006).

Transmitidos por los alimentos

Existe una gran diversidad de alimentos que pueden ser vehículos para norovirus, entre los cuales tienen especial importancia las ostras y moluscos bivalvos, bocadillos, ensaladas, frambuesas y pasteles (CLIVER y cols., 2006). Estos alimentos pueden estar contaminados en origen o bien pueden haberse contaminado durante un proceso de preparación. Las ostras y bivalvos en general, con su sistema de filtrado concentran partículas virales presentes en el agua y al ser consumidos se implican con frecuencia en la transmisión de virus entéricos como norovirus. Dado que los norovirus son relativamente resistentes a la inactivación por calor y que el tratamiento con vapor de los bivalvos no elimina el riesgo de transmisión, la cocción ha de asegurar que en el interior del molusco se consiga una temperatura superior a 90 °C y que se mantenga como mínimo durante 1.5 minutos (MORMANN y cols., 2010).

Los alimentos que han sido preparados por un manipulador infectado y no se someten a tratamiento térmico posterior, como los bocadillos y ensaladas, o los alimentos que se contaminan por lavado con agua con materia fecal, pueden ocasionar brotes, ya que como se ha señalado anteriormente son suficientes unas decenas de partículas para que se transmita la infección.

La contaminación de los alimentos a partir de un manipulador que no ha cumplido las normas de higiene es muy difícil de demostrar. Estas infecciones pueden ser asintomáticas o con síntomas muy leves y la excreción del virus en una persona infectada puede producirse incluso antes de iniciar los síntomas y prolongarse incluso semanas o meses después de la recuperación. Estudios elaborados por diversos autores indican que el consumo de marisco ocasiona la mayoría de los brotes por norovirus (80 %) (PRATO y cols., 2004). Sin embargo, estos brotes serían evitables si se incorporasen nuevos parámetros como indicadores de seguridad en los alimentos (LOVE y cols., 2010).

Las técnicas de amplificación como la RT-PCR han demostrado ser sensibles y específicas para el diagnóstico, aunque todavía necesitan mejorar en el sentido de poder cubrir la diversidad de estos virus.

Hasta ahora no se ha descrito en estos virus la vía de transmisión de animal a humano, sin embargo sí se abre la posibilidad de una zoonosis o de que estos animales sean el reservorio de la enfermedad (BRUGERE-PICOUX y TESSIER, 2010).

Transmitidos por el agua

Los norovirus transmitidos por el agua son mucho menos frecuentes que los vehicularizados por los alimentos. Se han descrito brotes por consumo de agua procedente de la red de distribución pública, pozos, fuentes, hielos comerciales y también algunos relacionados con el baño en lagos y piscinas.

El primer brote de norovirus documentado se remonta a 1997 (VERHEYEN y cols., 2009), debido a que hasta hace poco los métodos analíticos no permitían detectar la presencia de norovirus en el agua; sin embargo, actualmente, las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa después de la transcripción inversa se pueden aplicar para evaluar la contaminación del agua, pero el problema que se plantea es que es necesaria la concentración de grandes volúmenes de agua para poder detectar la presencia del virus (KITAJIMA y cols., 2012).

Si se sospecha del agua como fuente de infección, hay que clorarla a razón de 10 mg/L durante 30 minutos, aunque incluso estos niveles de cloración pueden resultar ineficaces.

Las contaminaciones de las aguas de consumo pueden ser resultado de filtraciones en el sistema de alcantarillado, inundaciones y lluvias torrenciales, o defectos en el sistema de cloración. En los últimos años se han publicado varios trabajos que muestran que el consumo o el contacto en zonas recreativas con aguas contaminadas es causa de brotes (GALMES y cols., 2011).

5.10 Prevención

A pesar de que el contacto directo de persona a persona es la forma más frecuente de extensión de los brotes, la contaminación de un vehículo común, como el agua o los alimentos, es a menudo el punto de inicio. Por ello, la prevención de la aparición de estos brotes debe centrarse en evitar la contaminación inicial del vehículo implicado y en minimizar la transmisión persona-persona.

Para el control de los brotes de gastroenteritis por norovirus se recomienda la identificación temprana de la fuente de infección, el lavado de manos, la desinfección de materiales contaminados y el uso de guantes con el fin de prevenir la transmisión secundaria.

Respecto a la fuente de infección, los moluscos bivalvos tienden a concentrar en sus tejidos los virus que están contaminando las aguas donde viven. Además, la cocción no siempre asegura su inactivación completa. Por otro lado, los manipuladores de alimentos pueden ser causa de estos brotes, principalmente en aquéllos que manipulan alimentos preparados que no necesitan cocción posterior. Por todo ello, es recomendable tanto la vigilancia de

las condiciones higiénicas del agua de consumo y del agua de las piscinas como la vigilancia de las medidas higiénicas en los manipuladores de alimentos y su exclusión de la manipulación hasta 48-72 horas después de la resolución de los síntomas.

En relación a la prevención de la transmisión persona a persona, ésta es básica en brotes que ocurren en instituciones cerradas y consiste básicamente en el lavado de manos con agua y jabón y desinfección con soluciones alcohólicas y la limpieza de ropas y superficies contaminadas. Además, aquellos pacientes con sospecha de infección por norovirus internados en alguna institución sanitaria deben ser manejados teniendo en cuenta las precauciones universales e incluso con medidas para evitar la transmisión por contacto en aquellos casos que forman parte de un brote, que presentan incontinencia de esfínteres o cuando se pueda producir la contaminación de la ropa del personal.

Según se va haciendo más aparente la importancia de los norovirus tanto a nivel clínico como socioeconómico, va ganando más fuerza la necesidad del desarrollo de una vacuna. La utilización de partículas de norovirus recombinantes orales es prometedora y se plantea el uso de adyuvantes mucosos

para aumentar la inmunogenicidad. No hay vacuna o medicina disponible actualmente que prevenga la gastroenteritis viral. Sin embargo, hay una vacuna en fase experimental que está siendo desarrollada para ofrecer cierta protección contra la diarrea severa en niños pequeños. Según un reciente estudio, la vacuna ofrece protección contra enfermedades e infecciones después del desafío con un virus homólogo (ATMAR y cols., 2011).

5.11 Norovirus y moluscos

La contaminación por norovirus que proviene de restos fecales humanos a los moluscos está considerado como el mayor riesgo para la salud humana (ZAINAZOR y cols., 2010).

Los moluscos se alimentan filtrando grandes cantidades de agua (un mejillón puede filtrar hasta 1.5 litros agua en una hora), las cuales pueden estar contaminadas por aguas residuales por lo que pueden concentrar virus en la carne, especialmente en el estómago y glándulas digestivas, y el tratamiento previo a la comercialización puede no ser suficiente para asegurar su seguridad como alimento. Las bacterias son expulsadas después de un par de días, pero los virus pueden permanecer dentro de los moluscos durante semanas (SAVINI y cols., 2009). Además el consumo de los moluscos en crudo aumenta el riesgo de infección.

Las pruebas estándar de monitoreo de aguas detectan la presencia de bacterias pero no de los virus, por lo que los moluscos pueden estar listos para consumo, pero todavía pueden estar contaminados por norovirus u otros virus entéricos. Por otra parte, el control de la presencia de norovirus en los moluscos

bivalvos se ve dificultado por la falta de métodos estándar de detección en alimentos y por el escaso número de laboratorios que disponen de técnicas para su investigación (GALMES y cols., 2011).

En la última década se han realizado avances considerables hacia el desarrollo de métodos de detección sensibles para determinar norovirus en moluscos bivalvos y hay distintas publicaciones que describen diferentes métodos para probar el virus.

Todos los métodos disponibles están basados en la detección del genoma del virus utilizando técnicas moleculares. La mayoría de los estudios establecen que el genogrupo II es el más común en los moluscos, debido probablemente a que este genogrupo es el que es más frecuente en las muestras fecales. La razón de esto es desconocida aunque algunas explicaciones posibles incluyen diferencias en las propiedades biológicas, virulencia, vía de transmisión, estabilidad del virus en el entorno, probablemente combinando con diferencias en la eficiencia de métodos para la detección del genogrupo (SUFFREDINI y cols., 2011; WOLF y cols., 2010). Sin embargo son menos los estudios que encuentran con más frecuencia el genogrupo I en los moluscos (KITIGUL y cols., 2011).

La legislación actualmente solo establece como único parámetro para tener en cuenta en los moluscos los niveles de *E.coli*, sin embargo ha sido demostrado en repetidas ocasiones que este enfoque resulta inadecuado para evaluar el riesgo por contaminación por virus entéricos humanos. (REGLAMENTO (CE) N° 2074/2005, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) n° 1441/2007, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 853/2004, 29 abril; REGLAMENTO (CE) N° 854/2004, 29 abril; REAL DECRETO 308/1993, 26 febrero; REAL DECRETO 571/1999, 9 abril).

5.12 Norovirus e indicadores de contaminación fecal

Los microorganismos indicadores son aquellos que tienen un comportamiento similar a los patógenos pero son más rápidos, económicos y fáciles de identificar. El grupo de microorganismos coliformes es adecuado como indicador de contaminación bacteriana. Los coliformes fecales y *E.coli* en particular, se han seleccionado como indicadores de contaminación fecal. Los coliformes fecales son un subgrupo de los coliformes totales. Otros grupos de bacterias que se pueden utilizar como indicadores son los clostridios. Algunos virus son más resistentes a la desinfección que todos estos microorganismos por lo que los indicadores tradicionales de contaminación bacteriana no evalúan de manera eficiente la presencia o ausencia del virus en el agua o el alimento. Además de esto, la detección de virus entéricos requiere laboratorios especializados y los resultados tardan varios días. Estas dificultades en el uso de los enterovirus como indicadores de contaminación de origen fecal en el agua han llevado a la búsqueda de indicadores alternativos que sean de rápida y fácil detección y que permitan prever el comportamiento de los enterovirus en el medio ambiente. Estos indicadores son los fagos (SAUER y cols., 2011; ZHANG y FARAHBAKAKHSH, 2010).

JUSTIFICACIÓN

Los países costeros tienen una larga tradición de consumo de productos del mar, con importaciones significativas que completan la producción regional. Productos de alto valor como ostras, almejas, mejillones y vieiras constituyen gran parte de este consumo, por lo que es bastante importante fijar las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos.

La legislación vigente en España establece que todos los moluscos bivalvos destinados al mercado y al consumo humano deben de someterse a un tratamiento en un centro de depuración pues la aplicación de este proceso tiene una importancia fundamental ya que constituye una barrera contra la transmisión de enfermedades bacterianas y víricas de origen acuático.

Además de poseer las características visuales propias de la fresca y la viabilidad, incluida la ausencia de suciedad en las conchas, una reacción a la percusión adecuada y una cantidad normal de líquido intervalvar, el Reglamento (CE) N° 854/2004 y el RD 571/1999. Fijan unos parámetros microbiológicos y

tóxicos a controlar en todos los moluscos bivalvos y productos destinados al consumo humano.

El control de los parámetros mencionados anteriormente no es sólo una labor de los centros de depuración de los moluscos ya que la legislación también establece un sistema de control para comprobar el cumplimiento de las condiciones establecidas en el citado Real Decreto, que lo lleva a cabo las autoridades competentes.

Ante estos argumentos, plenamente fundamentales para garantizar la calidad de los moluscos destinados al consumo humano, surge el modelo de este estudio. Con nuestro trabajo queremos conocer la situación bacteriana y vírica (norovirus) actual de los moluscos que se suministran.

Así pues, creemos que nuestro análisis contribuye fundamentalmente a una aproximación hacia el estado real de los moluscos, y de esta manera poder valorar cuales son los aspectos en los que pudiera haber alguna alteración en su calidad.

OBJETIVOS

Con el propósito de contribuir al mejor conocimiento de la relevancia de la contaminación en los moluscos bivalvos en Granada los objetivos que se plantean en este estudio son:

Objetivo general:

Valorar la prevalencia de contaminación por norovirus es moluscos bivalvos de venta más frecuente en Granada.

Objetivos específicos:

1. Relacionar la prevalencia de contaminación por norovirus en moluscos bivalvos con el tipo de molusco, el lugar de adquisición, la estación del año y el día de la semana en el que se recogió la muestra.
2. Determinar la prevalencia de norovirus en las muestras positivas y negativas para *E.coli* como indicador de calidad según la legislación vigente.
3. Analizar la contaminación por *E.coli*, clostridios y fagos somáticos con otras variables como el tipo de molusco, el lugar de adquisición, la estación del año y el día en el que se recogió la muestra.

4. Estudiar la relación de los distintos indicadores con el objeto de ver si alguno de ellos se adapta mejor como indicador de la presencia de norovirus.
5. Comparar cada indicador de contaminación fecal estudiados con *E.coli* para establecer si existe o no relación, y en caso afirmativo, establecer el tipo de correlación.
6. De todas las variables estudiadas, acordar cuales son las que influyen sobre la presencia de norovirus.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Selección y distribución de las pescaderías

El estudio se ha realizado en establecimientos de venta de pescado en Granada capital. La búsqueda de las pescaderías se llevó a cabo mediante el uso del listado de las *Páginas Amarillas* por Internet, utilizando como palabra clave “pescaderías”. Se encontraron 46 establecimientos y se hizo una selección de manera aleatoria, mediante el programa *SPSS versión 15.0*, obteniéndose 16, de las cuales 12 son de establecimientos particulares y 4 de centros comerciales, con el fin de que fueran representativos de la población de Granada. La distribución y frecuencia de muestreo en cada una de estas pescaderías, se exponen en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Distribución y frecuencia de muestras, procedentes de pescaderías particulares.

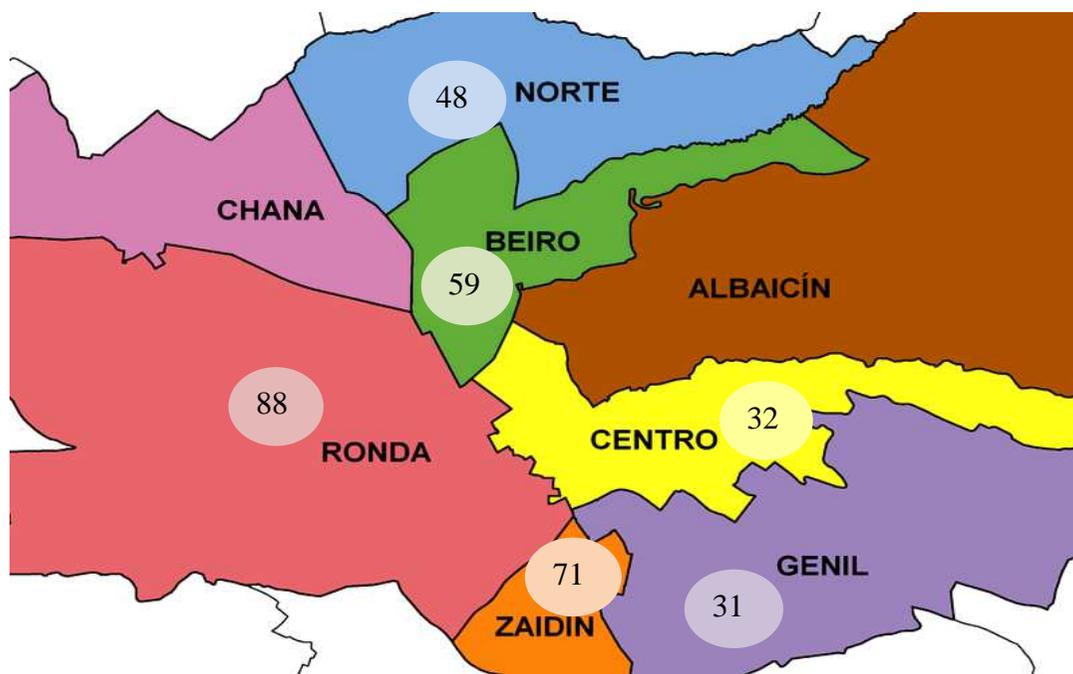
<i>Pescaderías</i>	<i>Nº muestras</i>	<i>Porcentaje</i>
1	17	7.0
2	27	11.2
3	6	2.5
4	24	9.9
5	23	9.5
6	29	12.0
7	26	10.7
8	23	9.5
9	13	5.4
10	18	7.4
11	17	7.0
12	19	7.9
Total	242	100

Tabla 6. Distribución y frecuencia de las muestras tomadas en pescaderías de centros comerciales.

<i>Pescaderías</i>	<i>Nº muestras</i>	<i>Porcentaje</i>
A	27	26.4
B	16	18.4
C	27	31.0
D	21	24.1
Total	87	100

Los 16 establecimientos resultantes, pertenecían a los distritos Centro (32), Ronda (88), Zaidín (71), Genil (31), Norte (48) y Beiro (59), distritos en los que se divide la ciudad de Granada. En la figura 14 exponemos la distribución y frecuencia de las muestras según los distritos.

Figura 14. Distribución geográfica de las pescaderías incluidas en el estudio.



2. Muestras

Hemos realizado el estudio microbiológico en un total de 329 muestras de moluscos (Tabla 7).

Aunque son numerosos los tipos de moluscos bivalvos que se comercializan, en nuestro estudio nos hemos centrado en los cuatro de mayor venta: mejillones (*Mytilus galloprovincialis*), conchas finas (*Callista chione*), chirlas (*Chamelea gallina*) y almejas de carril (*Ruditapes decussatus*) (Tabla 7).

El muestreo se llevó a cabo durante el período comprendido entre febrero de 2009 y octubre de 2010, periodo que abarca las cuatro estaciones del año. Las muestras fueron tomadas durante los tres primeros días de cada semana, para tener en cuenta las distintas posibilidades de recepción y conservación de los productos, y la capacidad de procesamiento de las muestras en el laboratorio (Tabla 7).

Tabla 7. Distribución de las muestras según el tipo de molusco, la procedencia, la estación del año y el día de la semana.

N = 329	N	%
<i>Tipo de molusco</i>		
Mejillones	113	34.3
Conchas finas	45	13.7
Chirlas	113	34.3
Almejas de carril	58	17.6
<i>Procedencia</i>		
Pescadería	242	73.6
Centro Comercial	87	26.4
<i>Estación</i>		
Invierno	69	21.0
Primavera	112	34.0
Verano	71	21.6
Otoño	77	23.4
<i>Día de la semana</i>		
Lunes	36	10.9
Martes	158	48.0
Miércoles	135	41.0

La temperatura media de cada estación que se registraron en Granada capital fueron las indicadas en la tabla 8.

Tabla 8. Temperatura media de Granada.

Estación del año	Temperatura media ° c	Temperatura máxima ° c	Temperatura mínima ° c
Invierno	7.4	19.4	-3.3
Primavera	12.9	23.8	2.2
Verano	24.5	36.6	12.5
Otoño	15.7	31.5	2.5

Fuente: Aeropuerto de Granada

Las muestras de cada establecimiento fueron trasladadas al laboratorio en neveras refrigeradas y se procedió a su análisis microbiológico de forma inmediata. Las determinaciones bacterianas se hicieron a las muestras en crudo y a estas mismas se les realizó un tratamiento térmico y se analizaron. En las muestras sometidas a tratamiento térmico, éste se realizó en horno microondas durante 1 minuto a una temperatura media de 77.3 °C con una desviación típica de ± 8.7 °C.

3. Preparación de las muestras

La preparación de las muestras se llevó a cabo en condiciones asépticas, con material estéril, al igual que la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales, según el procedimiento que se describe a continuación.

3.1 Preparación de la muestra y suspensión inicial

Se preparaban muestras representativas conteniendo al menos 6 individuos y un peso entre 75 g y 100 g (25 g para las especies pequeñas). En los análisis de los bivalvos se incluyó tanto la carne como el agua intervalvar.

Antes de obtener la muestra, los moluscos se lavaban y cepillaban bajo agua potable, principalmente alrededor de la charnela de abertura. Se escurrían y dejaban en un plato con papel absorbente en condiciones asépticas. A continuación se abrían con una espátula estéril y se recogía la carne y el líquido intervalvar en un recipiente estéril. También se incluía en la muestra los bivalvos que habían perdido su líquido intervalvar. Una vez eran abiertos la cantidad adecuada de molusco se mezclaba con agua de peptona tamponada en

el homogenizador (Stomacher blender (Stomacher 400 Circulator, Seward Limited, Norfolk, U.K.)) durante 2 minutos a 150 revoluciones por minuto (rpm) (Figura 15) (CEN, 2004; MORENO y cols., 2011).

Figura 15. Stomacher blender.



Parte de ese preparado se repartió en cinco alícuotas de 8 ml, se añadió 2 ml de glicerol en condiciones asépticas, se agitó, y se conservó a -40°C (tener en cuenta que el volumen se lleva a 10 ml, por lo que el factor de dilución de la muestra es $8/10 = 0.8$).

3.2 Preparación de las diluciones decimales

Para la elaboración de diluciones decimales se tomó 1 ml de la suspensión inicial y se añadió a un tubo con 9 ml de agua de peptona obteniéndose así la dilución 1/10 (CEN, 2004; CEN, 2004).

4. Aislamiento e identificación de indicadores de contaminación fecal

En cada una de las muestras estudiamos los siguientes indicadores de contaminación fecal:

- Aerobios mesófilos
- Coliformes totales
- Coliformes fecales
- *Clostridium* sulfito reductores

La determinación de estos microorganismos se realizó de acuerdo con las Normas AENOR.

4.1 Aislamiento e identificación de Aerobios mesófilos

Procedimiento (AENOR, 2003).

- Mediante pipeta estéril, se transfiere a una placa de agar para recuento, 1 ml de la muestra y a otra placa de agar recuento 1 ml de la dilución 1/10.

- Incubar a 30 °C durante 48 horas.
- Contar las UFC.

4.2 Aislamiento en identificación de coliformes totales: recuento de enterobacterias lactosa positiva

Procedimiento (AENOR,1999).

- Mediante pipeta estéril, se transfiere a una placa de agar Mac Conkey 1 ml de la muestra.
- Incubar a 37 °C durante 48 horas.
- Contar las colonias. Las colonias típicas aparecen con tonalidad rojo púrpura y rodeada de una zona de precipitación de sales biliares.

4.3 Aislamiento e identificación de coliformes fecales: recuento de *E.coli*

Procedimiento (AENOR, 1999).

- Mediante pipeta estéril, se transfiere a una placa de agar Mac Conkey 1 ml de la muestra y 1 ml a una placa de Agar Tryptona bilis x-glucuronido (TBX).

- Incubar a 44 °C durante 48 horas.
- Contar las UFC. Las colonias típicas en Mac Conkey aparecen con tonalidad rojo púrpura y rodeada de una zona de precipitación de sales biliares, y en TBX tienen tonalidad verde.

4.4 Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva

Procedimiento (AENOR, 2000).

- Mediante pipeta estéril, se transfiere a una placa de agar Manitol 1 ml de la muestra.
- Incubar a 37 °C durante 48 horas.
- Contar las colonias. Las colonias típicas aparecen con tonalidad amarilla.

4.5 Aislamiento e identificación de *Clostridium*

-Se funde los tubos del medio que necesitemos y se colocan en el baño a 70 °C.

-Se meten las muestras en el baño a 80 °C durante 5 minutos para eliminar toda forma vegetativa.

-Al medio se le añade 0,25 ml de citrato de hierro amoniacal y 0,5 ml de sulfito sódico.

-Se añade la muestra a cada tubo de medio (5ml) de forma que se evite la entrada de aire. Se agita suavemente.

-Incubar a 37 °C -24 horas

- Contar el número de colonias de color negro (REAL DECRETO 140/2003, 7 febrero).

5. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos

En cada una de las muestras, estudiamos un grupo de microorganismos patógenos:

- *Salmonellas*
- *L.monocytogenes*
- *V. parahaemolitycus*

5.1 Aislamiento e identificación de *Salmonellas*

Se toma del homogenizado, 1 ml y se siembra en 10 ml de caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS) y se incuba a 42° C durante 24 horas. Del mismo homogenizado se toma 1 ml y se siembra en el caldo Muller-Kauffman tetracionato novobiocina (MKTTn) y se incuba a 37 ° C durante 24 horas (AENOR, 2007).

Identificación

Tras la incubación en medio RVS y MKTTn, si aparece turbidez se siembra mediante un asa de platino en placas con medio salmonella - shigella.

Este medio se incuba a 37 ° C durante 24 horas. Las colonias típicas de *Salmonella* son no fermentadoras con o sin sulfhídrico.

Confirmación

Confirmación bioquímica

Se efectúa sembrando mediante agujas de inoculación las colonias seleccionadas en: agar TSI, agar urea, descarboxilación de L- lisina, β-galactosidasa, Voges-Proskauer, e Indol.

Confirmación serológica

La detección de presencia de antígenos O, Vi y H se realiza a partir de las colonias puras sobre portaobjetos y con sueros específicos.

5.2 Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*, método horizontal para la detección y recuento de listeria monocytogenes

Procedimiento (AENOR, 2005).

Se toma del homogenizado 1 ml, se siembra en 10 ml de caldo Frasser y se incuba a 37° C durante 24 horas.

Identificación

Tras la incubación en el caldo de enriquecimiento, si este ennegrece se siembra mediante un asa de platino en placas con medio agar Palcam.

Se incuban a 37 ° C durante 24 horas. Las colonias típicas de listeria tienen un centro negro.

Confirmación del género listeria

Selección de colonias para su confirmación

Las colonias sospechosas de listeria, se siembran sobre agar triptona soja /extracto de levadura (TSYEA).

Incubar a 35 °C- 37 °C.

Las colonias características son de 1,5 a 2 mm de tamaño, convexas, incoloras y opacas. A partir de estas colonias en cultivo puro se realizaran las siguientes pruebas:

- 1) Reacción de catalasa. Prueba positiva
- 2) Tinción de Gram. Bacilos cortos y estrechos gram positivos
- 3) Prueba de movilidad. Listeria es móvil.

5.3- Aislamiento e identificación de Vibrio

Se siembra 1 ml de muestra en medio TCBS y se incuba a 37°C durante 48 horas.

Pasado este tiempo se procede a la lectura de la placa.

Si se observan colonias sospechosas se les realiza pruebas bioquímicas. Las colonias típicas son verdes, pequeñas y no mucosas (KAYSNER y DE PAOLA, 1998).

6. Aislamiento e identificación de fagos somáticos

Procedimiento (AENOR, 2002).

El día anterior a la realización de la técnica sembramos dos placas de Mac Conkey de la cepa indicadora y las incubamos a 37° C para obtener un cultivo de 18 horas.

Tomar varias colonias aisladas (aprox. 10) e inocular un tubo con 10 ml de Caldo de Scholten modificado (MSB). Incubar en baño maría a 37° C para ajustar la suspensión bacteriana a una densidad óptica (D.O) de 0.2 – 0.3 en el espectrofotómetro a 620 nm.

Mientras tanto fundir en ebullición los tubos con 2.5 ml de agar de Scholten modificado semisólido (MSA) y mantenerlos en sobrefusión a 55° C (al menos 2 tubos por muestra o dilución). Añadir a cada tubo, en condiciones de asepsia, 15 µL de solución de cloruro de calcio (precalentada a temperatura ambiente).

Añadir a cada tubo 1 ml de la muestra (concentrada o diluida), precalentada a 37° C.

Se añade 1 ml de cultivo de la cepa indicadora. Agitar cuidadosamente para evitar la formación de burbujas y verter sobre una placa de agar de Scholten modificado (MSA). Distribuir uniformemente y dejar solidificar.

Incubar a 37° C durante 18 horas.

Contar el número de placas de lisis que aparecen (es conveniente observar con la lupa, ya que algunas placas de lisis pueden ser pequeñas). El número de placas de lisis corresponderá al número de colífagos/ml.

7. Normas microbiológicas

Los parámetros utilizados para el análisis microbiológico de las muestras son los especificados por la legislación vigente (tendrán menos de 300 coliformes fecales o menos de 230 “*E. coli*” por cada 100 gramos de carne de molusco y líquido intervalvar).

No habrá salmonella en 25 gramos de carne de molusco (REGLAMENTO (CE) N° 853/2004, 29 abril; REGLAMENTO (CE) N° 854/2004, 29 abril; REGLAMENTO (CE) N° 2074/2005, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 2076/2005, 5 diciembre).

8. Concentración de partículas virales

Procedimiento (CEN, 2004).

Concentración de virus

- 1) Tomar 5 ml del sobrenadante de las alícuotas de muestras conservadas a - 40 ° C descrito en el punto 4.1 y centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos (para la eliminación de las partículas de alimento de mayor tamaño).
- 2) Tomar el sobrenadante de la muestra y añadirle 5 ml de polietilenglicol (PGE) al 16 %.
- 3) Mantener a 4 °C durante la noche (para la precipitación de las partículas virales).
- 4) Centrifugar a $12000 \times g$ durante 30 minutos a 4 °C.
- 5) Eliminar el sobrenadante suavemente aunque se conserven las últimas gotas junto con el sedimento.

6) Resuspender en 0.5 ml de Tris-Tween.

7) Proceder a la extracción de los ácidos nucleicos virales. En caso de no hacerse en el momento, conservar a - 40 °C (tener en cuenta que se toman 5 ml de sobrenadante y se concentran en 0.5 ml, luego se ha concentrado 10 veces).

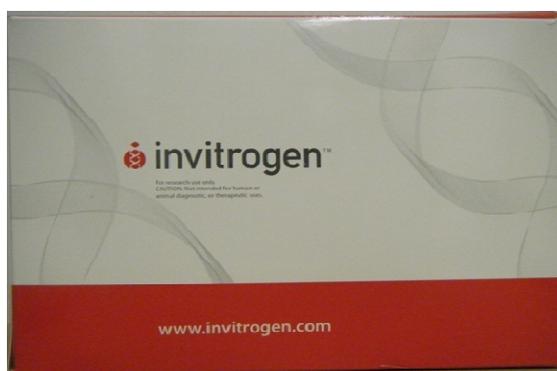
(GUÉVREMONT y cols., 2006; SAIR y cols., 2002; KINGSLEY y RICHARDS, 2001).

9. Extracción del ácido ribonucleico (ARN)

Fundamento

Para la extracción del RNA/DNA se ha utilizado un kit comercial *Purelink Viral RNA/DNA Kit* (Figura 16).

Figura 16. Kit *Purelink Viral RNA/DNA*.



Procedimiento

Es importante extremar las precauciones para evitar la contaminación con RNAsa, por lo que, entre otras medidas, se manipulará siempre con guantes. Para evitar que la RNAsa contamine el medio, previamente a la realización de la

extracción, se limpian con lejía las pipetas automáticas y toda la zona del trabajo.

La extracción se lleva a cabo mediante el siguiente protocolo:

Preparación lisados

El protocolo de preparación del lisado se describe a continuación para 200 µl de material de partida.

- 1.- Añadir 25 µl proteinasa K en un tubo de microcentrífuga estéril.
- 2.- Añadir 200 µl de muestra libre de células en el tubo de microcentrífuga.
- 3.- Añadir 200 µl de tampón de lisis + carrier.
- 4.- Cerrar la tapa del tubo y mezclar con el vórtex durante 15 segundos.
- 5.- Incubar a 56 °C (baño) durante 15 minutos.
- 6.- Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas del interior de la tapa.
- 7.- Proceder inmediatamente al lavado y unión.

Lavado y unión

- 1.- Añadir 250 μ l de etanol 96-100 % en el tubo del lisado para obtener una concentración del 37 %. Cerrar la tapa y mezclar durante 15 segundos.
- 2.- Incubar el lisado-etanol 5 minutos a temperatura ambiente.
- 3.- Centrifugar brevemente el tubo para eliminar las gotas de la tapa.
- 4.- Transferir el lisado anterior (aprox 675 μ l) a un tubo “viral spin columns”.
- 5.- Cerrar y centrifugar a 6800 x g durante un minuto (spin column) y desechar el “collection tube” con el filtrado.
- 6.- Colocar el “viral spin columns” en otro tubo “collection tube” (2 ml) y añadir 500 μ l de tampon de lavado (W5) con etanol en el spin column.
- 7.- Cerrar la tapa y centrifugar a 6800 x g durante un minuto (spin column) y descartar el “collection tube” con el filtrado.
- 8.- Añadir 500 μ l del tampon de lavado (W5) con etanol en el spin column.
- 9.- Cerrar la tapa y centrifugar a 6800 x g durante un minuto y descartar el “collection tube” con el filtrado.
- 10.- Proceder a la extracción.

Extracción

- 1.- Colocar el “viral spin columns” en un tubo limpio (Recovery Tube).
- 2.- Añadir de 10-50 μ l de agua limpia de RNAasa.
- 3.- Incubar a temperatura ambiente un minuto.
- 4.- Centrifugar a 10.000 rpm durante 2 minutos.
- 5.- El purificado viral ARN/ADN se puede guardar a -80 °C.

10. Amplificación del ARN de Norovirus

La amplificación se realiza mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), previa transformación a ADN utilizando una transcriptasa reversa (RT). Se ha utilizado un kit comercial (*Primers Script One Step*, Takara) (Figura 17).

Figura 17. Kit *Primers Script One Step*, Takara.



Los primers utilizados han sido los que se describen en la tabla 9 (BOXMAN y cols., 2006).

Tabla 9. Descripción Primer.

VIRUS	PRIMER	SECUENCIA	FRAGMENTO
	R	5' - 3'	O
Norovirus	JV12	ATACCACTATGATGCAGAYTA	
	JV13	TCATCATCACCATAGAAIGA G	327

Procedimiento

Hacer una limpieza-desinfección de la zona de trabajo y todo el material con lejía. Realizar todas las operaciones en hielo. Utilizar pipetas positivas (o puntas con filtro) para enzimas, muestras y primers.

- 1) Preparar la *mezcla de reacción* (para 23 muestras, 1 control negativo y 1 control positivo, aunque en total se utilizarán 24 tubos):

PrimeScript 1 step Enzyme 50 µl

2×1 step buffer 625 µl

Agua libre de RNasa 275 µl

- 2) Poner en cada uno de los 24 tubos dos gotas de aceite mineral.

3) Tubo de control positivo:

Mezcla de reacción	38 μ l
F-1 primer control	1 μ l
R-1 primer control	1 μ l
Template RNA	1 μ l
Agua libre de RNasa	9 μ l

4) Al resto de mezcla de reacción añadir 25 μ l de cada uno de los primers.

5) Poner en el resto de los tubos:

Control negativo: 10 μ l de RNA libre.

Muestras: 10 μ l en cada tubo.

6) Añadir a todos los tubos, excepto al control positivo, 40 μ l de mezcla de reacción (a la que le hemos incorporado los primers).

7) Centrifugación corta a los 24 tubos.

8) Incubación en el termociclador:

3 minutos a 94 °C

25 ciclos (94°C/30 seg; 37°C/1 min; 72°C/1 min)

7 minutos a 72°C

4 horas a 4°C (para conservar las muestras mientras se retiran)

Realizar electroforesis (utilizar 15 µl de cada muestra), y/o congelar a -80 °C.

11. Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los resultados de la PCR se utilizó técnicas electroforéticas, las cuales se realizaron de acuerdo al siguiente procedimiento:

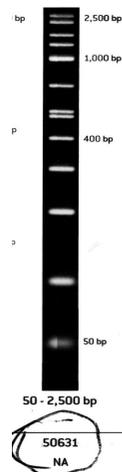
Condiciones de electroforesis

La electroforesis se realiza en las siguientes condiciones:

- Buffer TAE 1x.
- Cantidad de muestra: 20 μ l.
- Solución transportadora para cada muestra: 5 μ l.
- Buffer de electroforesis (1x), al que se puede añadir 100 μ l/L de solución de bromuro de etidio.
- Fuente de alimentación: 30 voltios.
- Desarrollar las muestras una distancia de 1,5 a 2 cm aproximadamente.
- Marcador PM: 15 μ l + 10 μ l de solución transportadora.

Como referencia del peso molecular en uno de los pocillos ponemos un marcador del peso molecular de 100 pares de base. Considerando como positivas a todas aquellas muestras cuyas bandas salgan por debajo del peso molecular del virus estudiado (Figura 18).

Figura 18. Marcador del peso molecular.



Promega

12. Composición de los medios de cultivo y reactivos

Agar Mac Conkey

Para el recuento de enterobacterias lactosa positiva o coliformes y para *E.coli* (44°C).

Composición (g/litro): Peptona (20), Lactosa (10), Sales biliares (5), Cloruro sódico (5), Púrpura de bromo cresol (0.01).

Agar Manitol

Para la detección de *S. aureus*.

Composición (g/litro): Digerido Péptico de Tejido Animal (5), Cloruro de sodio (75), Digerido Pancreático de Caseína (5), D-Manitol (10), Extracto de carne (1), Rojo de fenol (0.025), Agar (15).

Agar Palcam

Para la detección de *Listeria spp.*

Composición (g/litro): Peptona de carne (10), Extracto de carne (1), Extracto de levadura (3), Almidón de maíz (1), Glucosa (0.50), Manitol (10), Cloruro de Litio (15), Cloruro Sódico (5), Mezcla cromogénica A (0.02), Agar-Agar (12).

Agar Recuento (Infusión cerebro-corazón (BHI) + Agar bacteriológico)

Para realizar el recuento de aerobios mesófilos.

-Composición (g/litro): caldo BHI (37), Agar Bacteriológico (15).

-Composición BHI (g/litro): Extracto de cerebro (12.5), Extracto de corazón (5), Peptona (10), Dextrosa (2), Cloruro sódico (5), Fosfato di-sodio (2.5).

Agar Salmonella-Shigella

Para la detección de *Salmonella spp.*

Composición (g/litro): Extracto de carne (5), Citrato de sodio (8.5), Mezcla de Peptonas (5), Tiosulfato de Sodio (8.5), Lactosa (10), Citrato Férrico (1), Mezcla de Sales Biliares (8.5), Rojo Neutro (0.025), Verde Brillante (0.33), Agar (13.5).

Agar de Scholten modificado (MSA)

Para la detección de fagos somáticos.

Composición (g/litro): Peptona (10), Extracto de Levadura (3), Extracto de Carne (12), Cloruro de Sodio (3), Solución de Na₂CO₃ (5 ml), Solución de MgCl₂ (0.3 ml), Agar (15).

Agar de Scholten modificado semisólido (MSA)

Para la detección de fagos somáticos.

Composición (g/litro): Peptona (10), Extracto de Levadura (3), Extracto de Carne (12), Cloruro de Sodio (3), Solución de Na₂CO₃ (5 ml), Solución de MgCl₂ (0.3 ml), Agar (8).

Agar sulfito-cicloserina (SC)

Para la detección de Clostridios spp.

Composición (g/litro): Digerido enzimático de proteínas (15), Digerido enzimático de soja (5), Extracto de levadura (5), Disulfito disódico anhidro (1), Citrato amónico de hierro (III) (1), Agar (9-18).

Agar Tryptona bilis x-glucuronido (TBX)

Para la detección de *E.coli*.

Composición (g/litro): Peptona caseína (20), Sales Biliares (1.5), X-β-D-Glucurónido (0.075), Agar (15).

Agar Triptona soja

Para identificación de *Listeria sp.*

Composición (g/litro): Caldo triptona soja (30), Extracto de levadura (6), Agar (15).

Agar Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarosa (TCBS)

Para la detección de *V. parahaemolyticus*

Composición (g/litro): Peptona de caseína (5), Peptona de Carne (5), Extracto de levadura (5), Citrato Sódico (10), Tiosulfato Sódico (10), Bilis de Buey desecado (5), Colato Sódico (3), Sacarosa (20), Cloruro Sódico (10), Citrato de Hierro (III) (1), Azul de Timol (0.04), Azul de Bromotimol (0.04), Agar (14).

Agarosa

Composición: Agarosa (2 g), Buffer de electroforesis TAE (1x) (100 ml), Solución de bromuro de etidio (10 µl).

Buffer de electroforesis TAE (40x)

Composición: Tris base (1.6 M) (193.6 g), Acetato sódico trihidratado (0.8 M) (108.9 g), EDTA (Na)₂ · 2 H₂O (40 mM) (15.2 g), H₂O c.s.p.1000 ml. Ajustar a pH 7.2 con ácido acético.

Buffer de electroforesis TAE (1x)

Composición: Buffer de electroforesis TAE (40x) (6.25 ml), H₂O c.s.p.250 ml.

Caldo Frasser

Para el enriquecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Composición (g/litro): Esculina (1), Extracto de levadura (5), Cloruro de litio (3), Potasio di-hidrógeno (1.35), Peptona de carne (5), Cloruro sódico (20), Fosfato di-sodio (12), Tristona (5), Extracto de carne (5), Citrato de hierro III (0.5), Ácido Nalidixico (0.02), Acriflavina (0.025).

Caldo Muller-Kauffman

Para el enriquecimiento de *Salmonella spp.*

Composición (g/l): Bilis de buey (4.75), Carbonato de calcio (25), Extracto de carne (0.9), Extracto de levadura (1.8), Peptona carne (4.5), Cloruro de sodio (4.5), Tiosulfato de sodio (40.7).

Caldo Rappaport-Vassilladis

Para el enriquecimiento de *Salmonella spp.*

Composición (g/l): Peptona soja (4.5), Cloruro de sodio (7.2), Fosfato monopotásico (1.26), fosfato dipotásico (0.18), Cloruro de magnesio (13.5), Verde malaquita (0.036).

Caldo de Scholten modificado (MSB)

Para la detección de fagos somáticos.

Composición (g/litro): Peptona (10), Extracto de Levadura (3), Extracto de Carne (12), Cloruro de Sodio (3), Solución de Na₂CO₃ (5 ml), Solución de MgCl₂ (0.3 ml).

Disolución salina de peptona

Composición: Digestato enzimático de caseína (1 g), Cloruro sódico (8.5 g), Agua (1000 ml).

Disolver los componentes en agua, calentando si fuese necesario

Ajustar el pH si fuese necesario, de forma que tras la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25 °C.

Disolución tamponada de peptona

Composición: Digestato enzimático de tejidos animales (10 g), Cloruro sódico (5 g), Fosfato de hidrogeno disódico dodecahidrato ($\text{Na HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$) (9 g), Fosfato de hidrógeno dipotásico (KH_2PO_4) (1.5 g), Agua (1000 ml).

Disolver los componentes en agua, calentando si fuera necesario.

Ajustar el pH si fuese necesario, de forma que tras la esterilización sea 7.0 ± 0.2 a 25°C .

Medio de Kligler

Identificación de *Salmonella spp* y *E.coli*.

Composición (g/litro): Peptona (20), Lactosa (10), Glucosa (1), Citrato férrico amónico (0.5), Tiosulfato sódico (0.5), Rojo fenol (0.025).

Solución de bromuro de etidio

Disolver 100 mg de bromuro de etidio en 10 ml de buffer TAE. Almacenar en oscuridad a 4 °C.

Solución de cloruro de calcio

Composición: CaCl₂ · 2H₂O (14.6 g), Agua destilada (100 ml).

Se disuelve calentando ligeramente y se esteriliza por filtración sobre membrana de 0.2 µm de tamaño de poro. Conservar a 5 °C en oscuridad durante un periodo no superior a 6 meses.

Solución de polietilenglicol (PEG 16 %)

Composición: Polietilenglicol 6000 (16 g), Cloruro sódico (0,6 M) (3.506 g), Agua (100 ml).

Solución transportadora para electroforesis

Composición: Azul de bromofenol (10 μg), TAE (40x) (250 μl), Glicerol (5 ml), Agua destilada (4.75 ml).

Se pesa el azul de bromofenol y se disuelve en el agua. A continuación se añade el TAE y finalmente el glicerol.

Solución de Tris – Tween

Composición: Tris (50 mM), Tween 20 (0.2 g), Agua (100 ml).

13. Análisis estadístico

Con objeto de cubrir los objetivos del estudio se llevó a cabo un análisis estadístico que se puede dividir en dos partes:

1. Se realizó en primer lugar un análisis descriptivo de las diferentes variables de estudio; para las variables categóricas o cualitativas hemos utilizado la distribución de frecuencias absolutas y relativas (%); y para las variables continuas o cuantitativas se calculó la media y la desviación estándar.
2. En segundo lugar se realizaron tablas de contingencia y el test de chi-cuadrado de Pearson. Para analizar la asociación bivalente entre cada variable y la prevalencia de norovirus y *E.coli* se aplicó el análisis de la varianza (ANOVA); y el test de Kruskal-Wallis cuando las variables no seguían una distribución normal o no había homogeneidad de las varianzas.

Para explorar la asociación entre *E.coli* y las variables estudiadas se empleo el coeficiente de correlación de *Pearson* para el caso de *E.coli*. Para aquellas variables que presentaron nivel de significación < 0.05 se les realizo una estimación curvilínea obteniendo la ecuación que describe el modelo y el coeficiente de determinación (R^2).

Posteriormente, se aplicaron análisis multivariantes. Para determinar las variables que estaban asociadas de manera independiente con la presencia de norovirus, se realizaron análisis de regresión logística en la muestra al completo a través del procedimiento de introducir, el cual da lugar a un modelo con todas las variables seleccionadas en el cajón de covariables. El modelo de regresión logística presentado fue apropiado de acuerdo con la prueba de “Hosmer-Lemeshow”. La fuerza de asociación de las variables independientes con la presencia de norovirus fue expresada como la OR con sus intervalos de confianza del 95 % (MARTIN y LUNA, 2004).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

Como comentamos en material y métodos, se ha analizado un total de 329 moluscos bivalvos, procedentes de diferentes establecimientos de Granada durante el periodo de febrero de 2009 a octubre de 2010.

De estas muestras hemos realizado el estudio de los indicadores de contaminación fecal más frecuentes en moluscos bivalvos de venta en establecimientos de Granada.

En la tabla 10 se muestra la estadística básica de los indicadores de contaminación fecal estudiados.

Tabla 10. Valores medios de los indicadores microbiológicos de contaminación fecal de moluscos bivalvos.

	Media	DT	Min.	Máx.
<i>E.coli</i>	229.26	974.47	0	10783
<i>Clostridios</i>	10.29	22.04	0	110
<i>Fagos somáticos</i>	84.02	115.79	0	924
<i>Aerobios mesófilos</i>	650625,91	3288763,34	0	52123077
<i>Enterobacterias</i>	146,85	437,46	0	5756

Para estos parámetros se corrigieron los valores para conseguir que las varianzas fueran homogéneas. Empleándose el logaritmo decimal de la medida más uno como transformación más usual, puesto que con ella se estabilizan las varianzas. Con estos valores se realizan los diagramas de cajas, para determinar los estadísticos descriptivos para cada parámetro según tuviesen o no Norovirus.

En la figura 19 se observa que el recuento de *E.coli* es más alto en las muestras positivas para Norovirus que en las muestras negativas.

Y en el caso de los clostridios (Figura 20) se observa que en el percentil 50 el valor para ambos casos (norovirus negativo y norovirus positivo) es prácticamente igual.

En cambio para el caso de los fagos (Figura 21) se muestra que la el percentil 50 es mas elevado para las muestras positivas en norovirus.

Para los demás casos (Figura 22 y 23) se observa lo mismo que comentábamos para el caso de los clostridios.

Figura 19. Estadísticos descriptivos del logaritmo de *E.coli* versus prevalencia de norovirus.

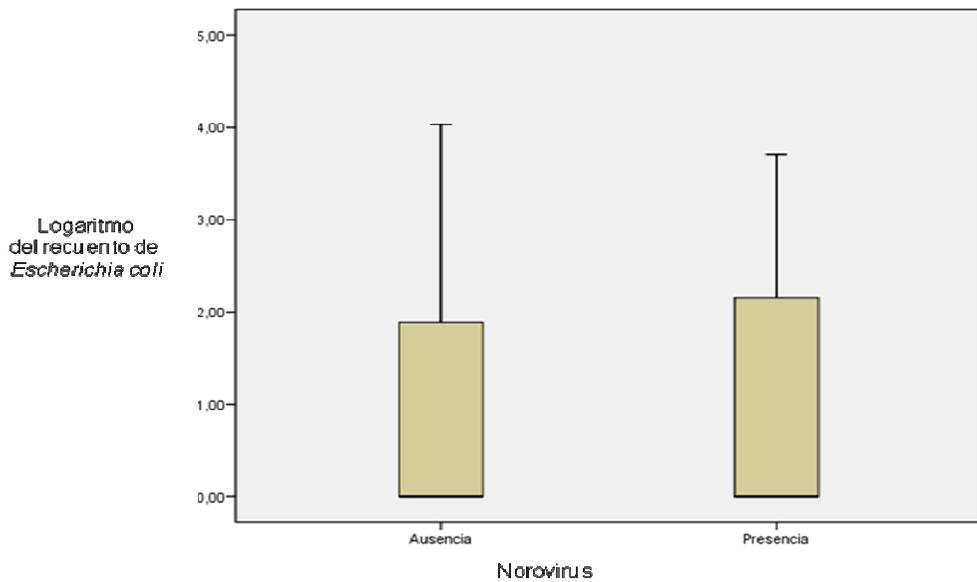


Figura 20. Estadísticos descriptivos del logaritmo de Clostridios versus prevalencia de norovirus.

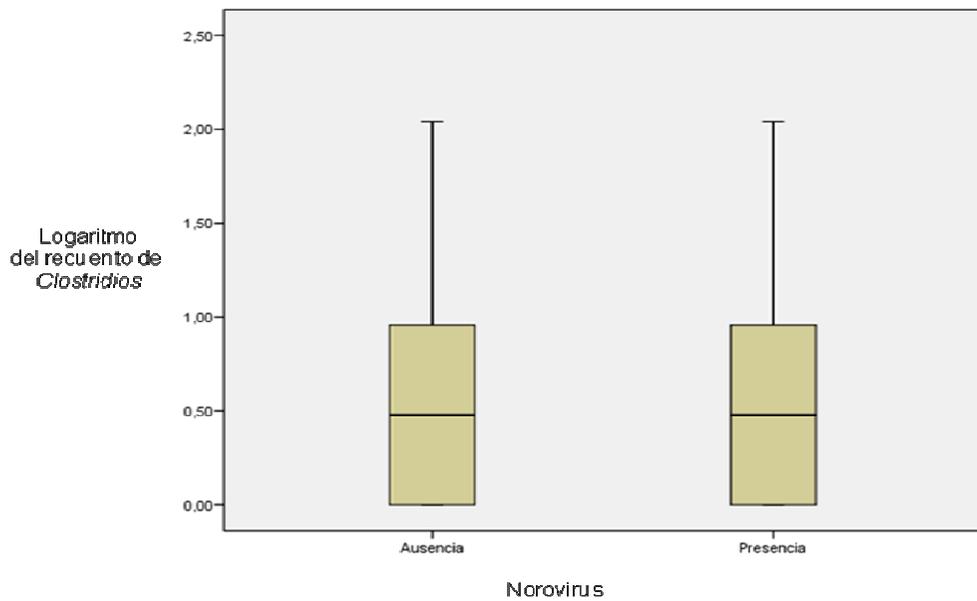


Figura 21. Estadísticos descriptivos del logaritmo de Fagos somáticos versus prevalencia de norovirus.

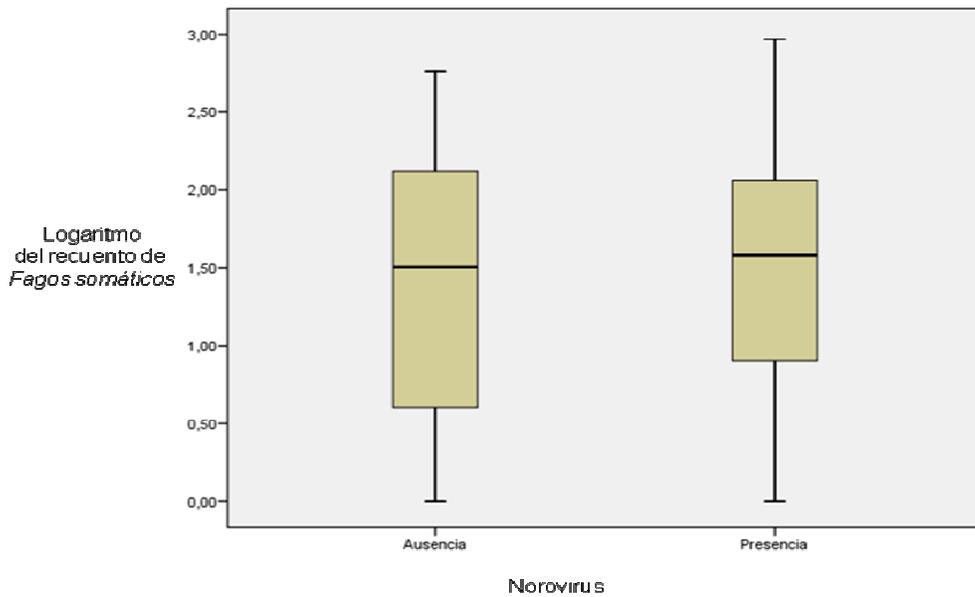


Figura 22. Estadísticos descriptivos del logaritmo de Aerobios mesófilos versus prevalencia de norovirus.

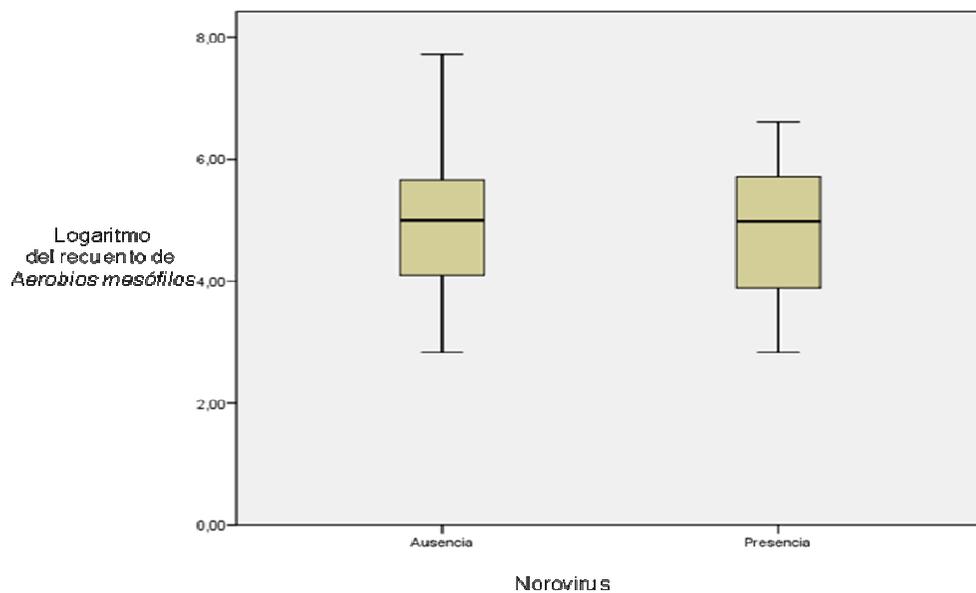
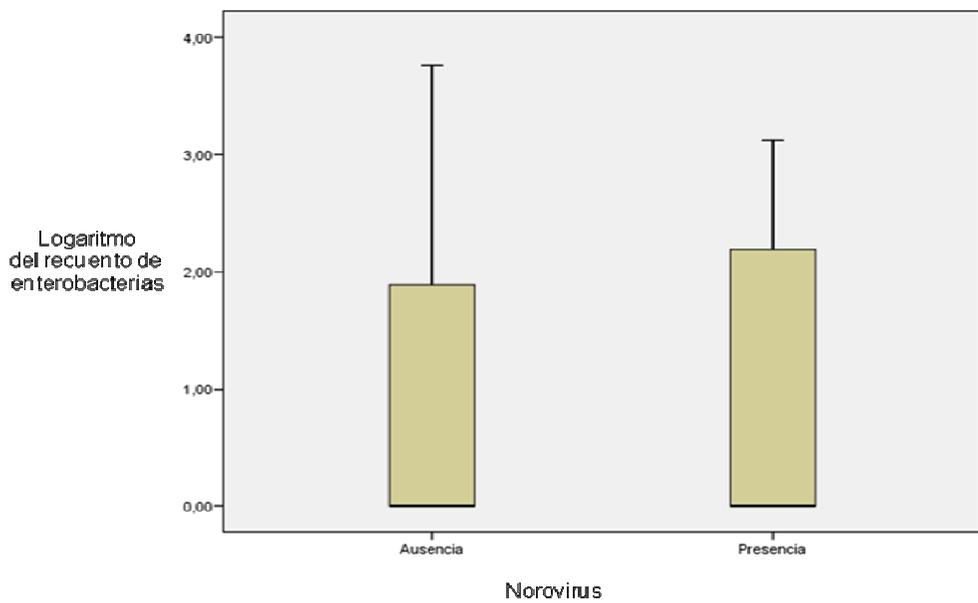


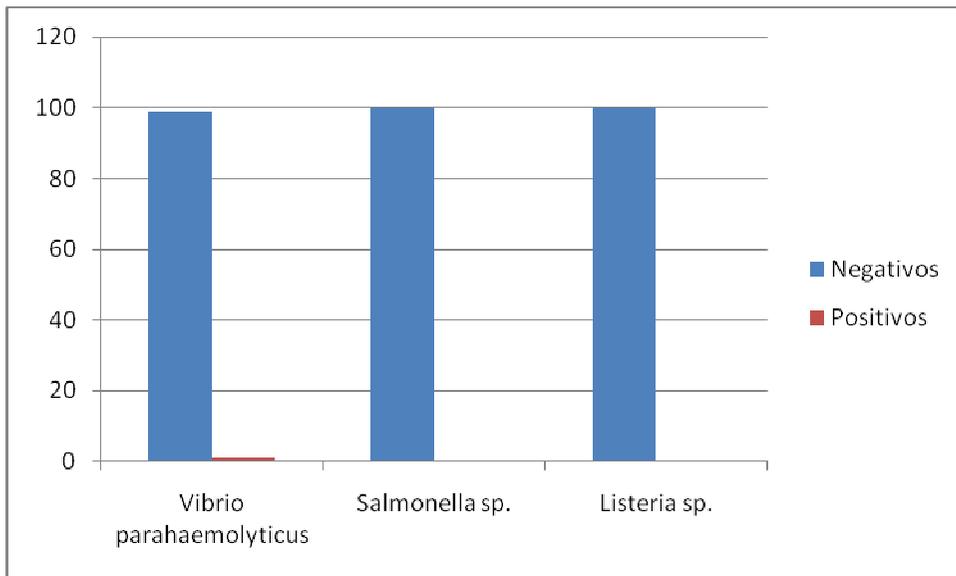
Figura 23. Estadísticos descriptivos del logaritmo de Enterobacterias versus prevalencia de norovirus.



En la Figura 24 se observa la prevalencia en las muestras de moluscos analizadas de los microorganismos patógenos determinados.

Los resultados muestran que tal como establece la legislación no se ha encontrado *Salmonella* en ninguna de las muestras analizadas, al igual que ocurre en el caso de *Listeria*. En cambio si hemos obtenido un porcentaje bajo [1.22 %; IC 95 % (0.39-3.29)] de *Vibrio parahaemolyticus* en los moluscos procedentes de establecimientos de Granada (Figura 24).

Figura 24. Prevalencia de los microorganismos patógenos en los moluscos bivalvos de venta en Granada.



2. PREVALENCIA DE NOROVIRUS EN MOLUSCOS BIVALVOS

Tras la extracción del ácido ribonucleico y realización de RT- PCR y posterior visualización en gel de agarosa, se detectó la presencia de norovirus en 76 (23.10 %; IC 95 % (18.73-28.10)) de las muestras estudiadas (Figura 25).

En la figura 26 se observa una muestra positiva en la posición 6 ya que aparecen bandas por debajo de la línea que limita las 327 pares de bases del marcaje del peso molecular.

Figura 25. Distribución de muestras en función de la presencia de norovirus.

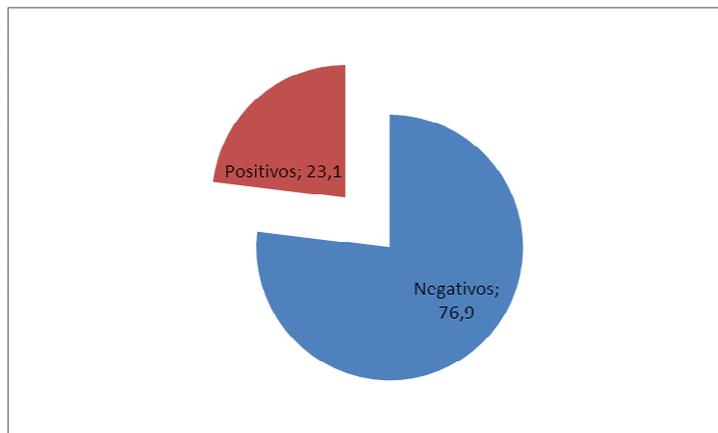
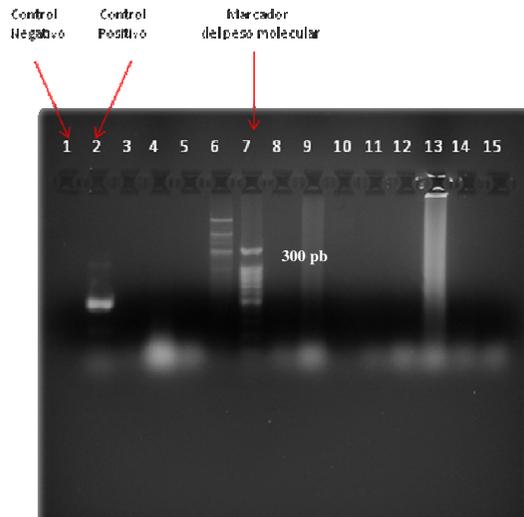


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa mostrando los resultados obtenidos por PCR para la detección de norovirus.



3. PREVALENCIA DE NOROVIRUS
EN FUNCIÓN DE
DISTINTAS
VARIABLES

Para relacionar la presencia de norovirus con las variables incluidas en el estudio, hemos realizado tablas de contingencia obteniéndose el valor de la chi cuadrado de Pearson y el nivel de significación para cada una.

En la relación de muestras positivas y negativas para norovirus según el tipo de molusco estudiado (Tabla 11), se observa que existen diferencias significativas, siendo las almejas de carril el molusco que mayor contaminación por este tipo de virus presentaba [34.48 %; IC 95 % (22.82-48.20)], mientras que las menos contaminadas fueron las conchas finas con un 8.89 % [IC 95 % (2.89-22.13)].

En la Figura 27 exponemos la distribución de muestras positivas y negativas según procedan de una pescadería tradicional o de un centro comercial. En el podemos observar que es en las pescaderías tradicionales donde mayor contaminación por norovirus encontramos con un 24.02 % [IC 95 % (18.83-29.94)].

Como hemos comentado anteriormente, el estudio de la muestra se realizó durante los meses de febrero de 2009 a octubre de 2010. La relación de

muestras positivas y negativas las hemos agrupado según las estaciones del año: invierno, otoño, primavera y verano (Tabla 12), en la cual se puede observar que existen diferencias significativas entre las distintas estaciones, sin embargo, si bien aparecen en todas las estaciones, se aprecia que el mayor porcentaje de muestras positivas apareció en verano [32.39 %; IC 95 % (22.05-44.66)], seguido de la primavera [29.46 %; IC 95 % (21.42-38.94)], es decir es en la época de temperaturas más elevadas cuando se detectó una mayor presencia de norovirus.

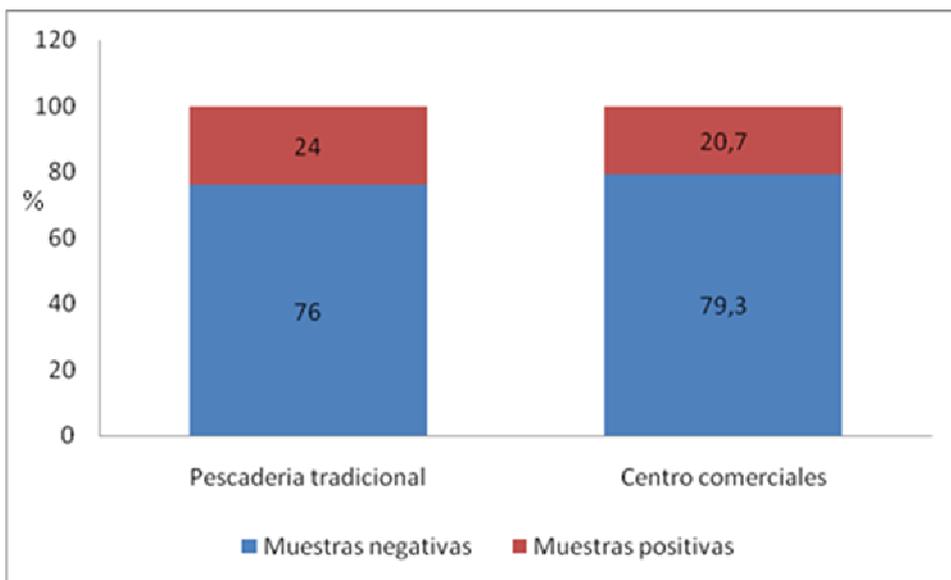
En la tabla 13 se muestra el porcentaje de muestras positivas y negativas en norovirus en los distintos días de la semana en los que se tomaron la muestra. Podemos observar que aunque no existen diferencias significativas, es el martes el día que mas porcentaje de muestras positivas se obtuvo [25.95 %; IC 95 % (19.46-33.63)], mientras que los lunes el día que menos contaminación por este virus se encontró [16.66 %; IC 95 % (6.96-33.47)].

Tabla 11. Prevalencia de norovirus según el tipo de molusco.

	Norovirus					
	Ausencia			Presencia		
Tipo de molusco	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Conchas finas	41	91.12	77.87-97.11	4	8.89	2.89-22.13
Chirlas	90	79.64	70.82-86.41	23	20.35	13.59-29.18
Mejillones	84	74.33	65.11-81.88	29	25.66	18.12-34.89
Almejas de carril	38	65.52	51.79-77.18	20	34.48	22.82-48.20

$$\chi^2 = 10.24; 3 \text{ g.l.}; p = 0.017$$

Figura 27. Prevalencia de norovirus según la procedencia.



n.s

Tabla 12. Prevalencia de norovirus según la estación del año.

	Norovirus					
	Ausencia			Presencia		
Estación del año	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Invierno	60	86.96	76.18-93.50	9	13.04	6.50-23.82
Otoño	66	85.71	75.45-92.31	11	14.29	7.69-24.55
Primavera	79	70.54	61.06-78.58	33	29.46	21.42-38.94
Verano	48	67.61	55.34-77.95	23	32.39	22.05-44.66

$$\chi^2 = 13.30; 3 \text{ g.l.}; p = 0.004$$

Tabla 13. Prevalencia de norovirus según el día de toma de la muestra.

	Norovirus					
	Ausencia			Presencia		
Día de toma de muestra	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Lunes	30	83.33	66.53-93.04	6	16.66	6.96-33.47
Martes	117	74.05	66.37-80.54	41	25.95	19.46-33.63
Miércoles	106	78.52	70.45-84.92	29	21.48	15.07-29.55

n.s

4. PREVALENCIA DE NOROVIRUS
EN RELACIÓN A
ESCHERICHIA
COLI

De acuerdo con los criterios establecidos por la Unión Europea y la legislación española, el porcentaje de muestras no aptas para el consumo sería de un 15 % [IC 95 % (11.05-18.97)] ya que superaron los niveles bacterianos máximos para ser considerados aptos para el consumo (Figura 28), lo que supone un valor inferior a un 8.1 % con respecto a norovirus.

En la Tabla 14 se relaciona la prevalencia de norovirus con *E.coli* según establece la legislación.

De las 281 muestras que no superaron los 230 ufc *E.coli* / 100 gramos de molusco en 61 de ellos [21.71 %; IC 95 % (17.13-27.08)] se detectó norovirus, por lo que la presencia de estos virus en moluscos bivalvos cuyo consumo humano está permitido legalmente, puede suponer un riesgo potencial para la salud.

Para ver si existía relación entre la presencia de norovirus y el recuento de *E.coli* hemos categorizado dichos recuentos en cinco categorías de acuerdo con los porcentajes acumulados en dichos recuentos (Figura 29), observándose que no existen diferencias significativas en contra de lo que podría pensar.

En la figura 29 podemos observar que en presencia de norovirus a medida que aumenta el recuento de *E.coli* aumenta el porcentaje de este virus.

Figura 28. Distribución de muestras en función de la presencia de *E.coli*.

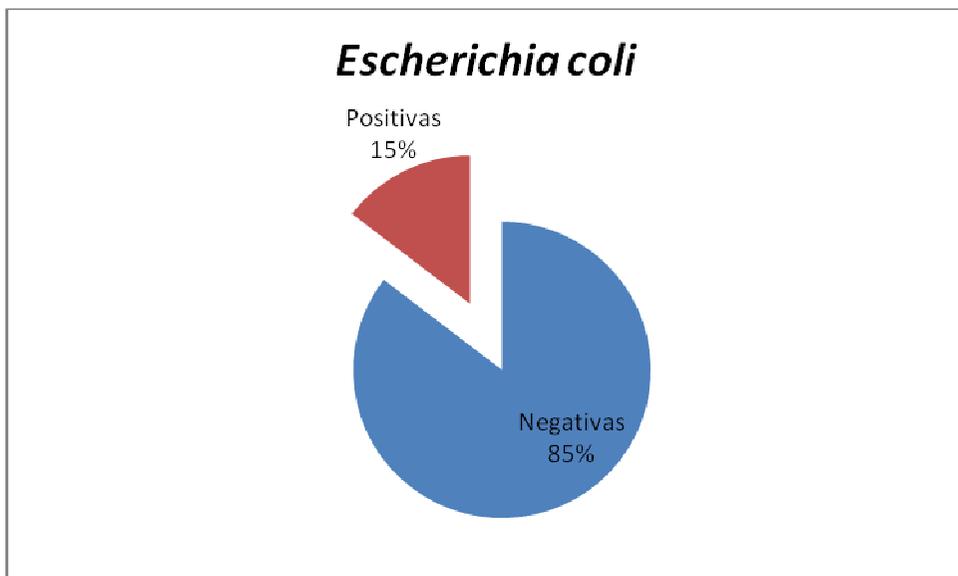
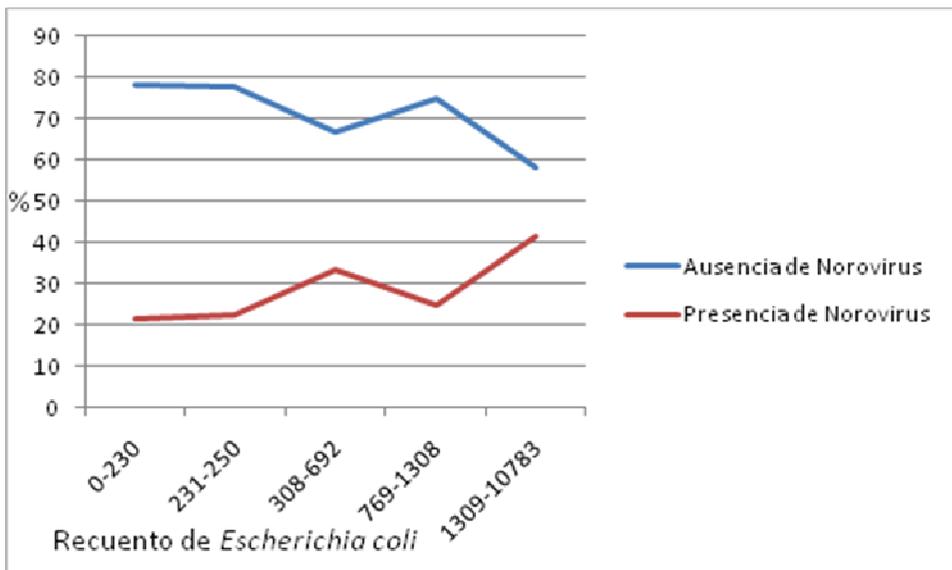


Tabla 14. Prevalencia de norovirus según la clasificación de *E.coli* de acuerdo a la legislación vigente.

	Norovirus					
	Ausencia			Presencia		
<i>E.coli</i>	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Negativas	220	78.29	72.92-82.87	61	21.71	17.13-27.08
Positivas	33	68.75	53.60-80.91	15	31.25	19.09-46.40

n.s

Figura 29. Prevalencia de norovirus según la clasificación de *E.coli* de acuerdo a las categorías establecidas.



n.s

5. PREVALENCIA DE *E. COLI*, CLOSTRIDIOS Y
FAGOS EN RELACIÓN A DISTINTAS
VARIABLES

Hemos realizado un análisis bivalente para relacionar la prevalencia de los indicadores de contaminación fecal estudiados con las distintas variables presentes en nuestro trabajo.

5.1 Prevalencia de *E.coli* según distintas variables.

Al relacionar la presencia *E.coli*, según el tipo de molusco, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas, siendo las chirlas las que presentaban mayor contaminación [19.47 %; IC 95 % (12.86-28.20)] frente a un 7.96 % [IC 95 % (3.94-14.99)] en los mejillones (Tabla 15).

Sin embargo, estos valores no son coincidentes con los obtenidos en el caso de norovirus ya que en este caso los mejillones presentaban más contaminación con un 25.66 % [IC 95 % (18.12-34.8)], mientras que los menos contaminados fueron las conchas finas [8.89 %; IC 95 % (2.89-22.13)].

En la figura 30 exponemos la relación de *E.coli* con la procedencia del molusco.

Aunque no resultaron diferencias significativas, se observa que son los moluscos procedentes de centros comerciales los que mayor contaminación por *E.coli* presentan, con un 19.5 % [IC 95 % (12.11-29.71)].

En el caso de la estación del año, se observa que al igual que pasa con norovirus, se obtienen diferencias significativas al relacionar este indicador con la época del año y es en verano donde más muestras positivas determinamos [22.53 %; IC 95 % (13.81-34.28)] (Tabla 16).

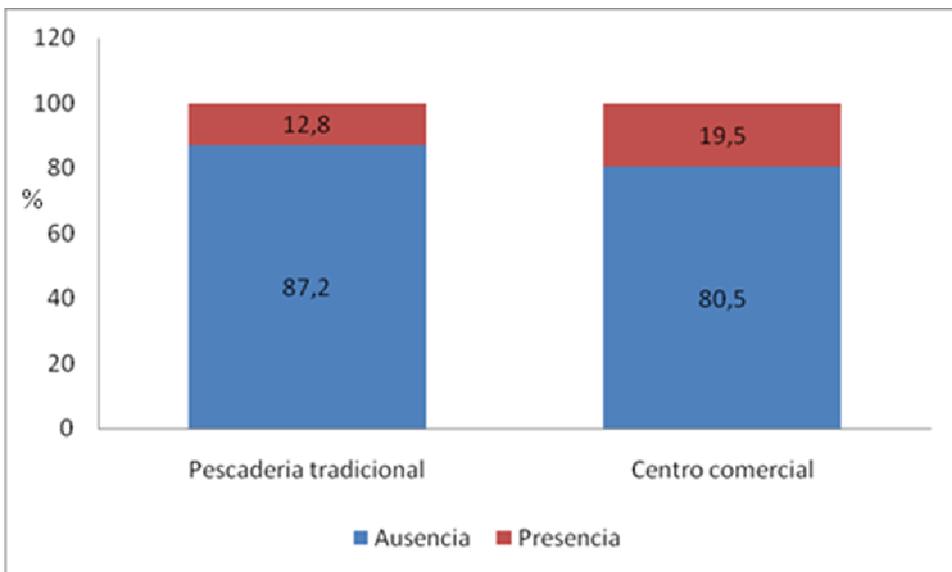
En cambio la presencia de *E.coli* no está influida con el día de la semana, ya que lo que resulta al establecer esta comparación no es significativo (Tabla 17). Aunque si se puede observar que son los lunes el día que más muestras positivas para esta variable obtuvimos. Esto puede ser debido a que las muestras que se recogieron este día son únicamente de centros comerciales ya que las pescaderías tradicionales este día no abren, puesto que el domingo no hay pesca. Lo que ocurre en los centros comerciales, es que estos disponen de cámaras frigoríficas para mantener el pescado sobrante del sábado y ponerlo a la venta el lunes.

Tabla 15. Prevalencia de *E.coli* según el tipo de molusco.

	<i>E.coli</i>					
	Ausencia			Presencia		
Tipo de molusco	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Conchas finas	39	86.66	72.51-94.46	6	13.33	5.34-27.49
Chirlas	91	80.53	71.79-87.15	22	19.47	12.86-28.20
Mejillones	104	92.04	85.01-96.06	9	7.96	3.94-14.99
Almejas de carril	47	81.03	68.19-89.71	11	18.97	10.29-31.81

$$\chi^2 = 7.09; 3 \text{ g.l.}; p = 0.069$$

Figura 30. Prevalencia de *E.coli* según la procedencia del molusco.



n.s

Tabla 16. Prevalencia de *E.coli* según la estación del año.

	<i>E.coli</i>					
	Ausencia			Presencia		
Estación del año	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Invierno	68	98.55	91.11-99.92	1	1.45	0.08-8.88
Otoño	62	80.52	69.59-88.34	15	19.48	11.66-30.40
Primavera	96	85.71	77.54-91.36	16	14.29	8.64-22.46
Verano	55	77.47	65.72-86.19	16	22.53	13.81-34.28

$$\chi^2 = 14.65; 3 \text{ g.l.}; p = 0.002$$

Tabla 17. Prevalencia de *E.coli* según el día de toma del molusco.

	<i>E.coli</i>					
	Ausencia			Presencia		
Día de toma	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Lunes	29	80.55	64.44-91.19	7	19.45	8.81-36.56
Martes	136	86.08	79.46-90.88	22	13.92	9.12-20.54
Miércoles	116	85.93	78.64-91.01	19	14.07	8.90-21.36

n.s

5.2 Prevalencia de clostridios según distintas variables.

Quisimos relacionar también este parámetro con las distintas variables estudiadas, ya que es un indicador de contaminación fecal.

En la tabla 18 se observa que el mayor porcentaje de presencia de clostridios fue en las chirlas con un 72.57 % [IC 95 % (63.23-80.33)], coincidiendo con los resultados obtenidos para *E. coli* pero no para la presencia de norovirus.

Para ver qué tipo de establecimiento (pescaderías tradicionales o centros comerciales) tenían moluscos más contaminados por clostridios se ha representado gráficamente (Figura 31) y se observa que la mayor prevalencia para este indicador es en moluscos que proceden de pescaderías tradicionales [67.8 %; IC 95 % (61.43-73.53)], al igual que ocurría al relacionar esta variable con la prevalencia del virus estudiado.

Como ocurre con los parámetros anteriormente comentados se obtienen diferencias estadísticamente significativas cuando se relaciona el indicador

microbiológico con la estación del año. En este caso la época donde mayor prevalencia de este indicador determinamos es en invierno [79.71 %; IC 95 % (67.98-88.08)] (Tabla 19), sin embargo con *E. coli* y norovirus era en verano.

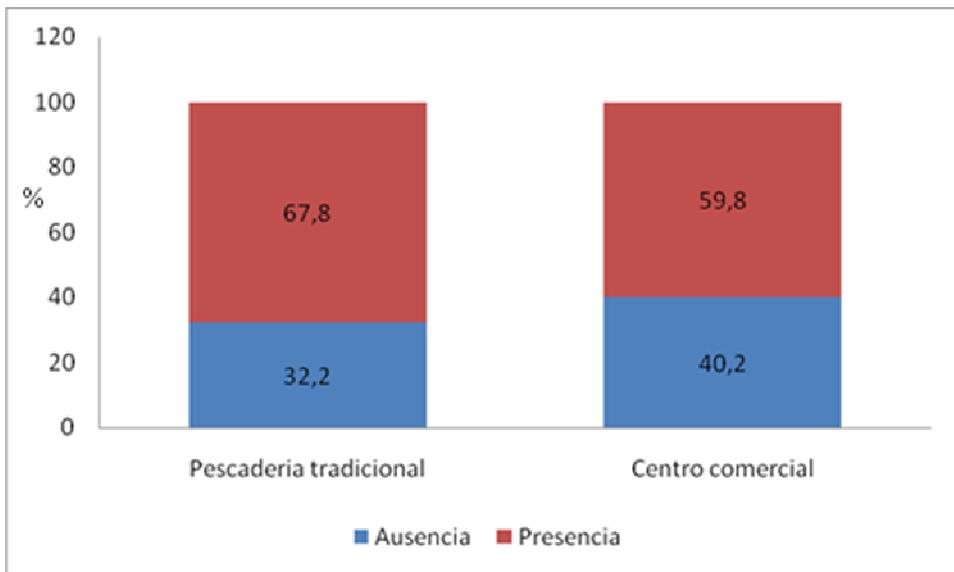
Por último al asociar el día en el que se compró el molusco y la prevalencia de clostridios no se obtuvo resultados significativos, aunque si se puede observar que son los martes cuando mas contaminación se determinó [67.09 %; IC 95 % (59.10-74.22)] (Tabla 20).

Tabla 18. Prevalencia de clostridios según el tipo de molusco.

	<i>Clostridios</i>					
	Ausencia			Presencia		
Tipo de molusco	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Conchas finas	22	48.89	33.94-64.02	23	51.11	35.98-66.06
Chirlas	31	27.43	19.66-36.77	82	72.57	63.23-80.33
Mejillones	44	38.94	30.04-48.59	69	61.06	51.40-69.96
Almejas de carril	16	27.59	17.05-41.11	42	72.41	58.89-82.95

$$\chi^2 = 8.85; 3 \text{ g.l.}; p = 0.031$$

Figura 31. Prevalencia de clostridios según la procedencia del molusco.



n.s

Tabla 19. Prevalencia de clostridios según la estación del año.

	<i>Clostridios</i>					
	Ausencia			Presencia		
Estación del año	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Invierno	14	20.29	11.92-32.02	55	79.71	67.98-88.08
Otoño	44	57.14	45.37-68.19	33	42.86	31.81-54.63
Primavera	28	25.00	17.51-34.23	84	75.00	65.77-82.49
Verano	27	38.03	26.99-50.36	44	61.97	49.64-73.00

$$\chi^2 = 28.56; 3 \text{ g.l.}; p = 0.000$$

Tabla 20. Prevalencia de clostridios según el día de toma del molusco.

	<i>Clostridios</i>					
	Ausencia			Presencia		
Día de toma	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Lunes	14	38.89	23.62-56.47	22	61.11	43.53-76.37
Martes	52	32.91	25.78-40.89	106	67.09	59.10-74.22
Miércoles	47	34.81	26.96-43.54	88	65.19	56.45-73.04

n.s

5.3 Prevalencia de fagos somáticos según distintas variables

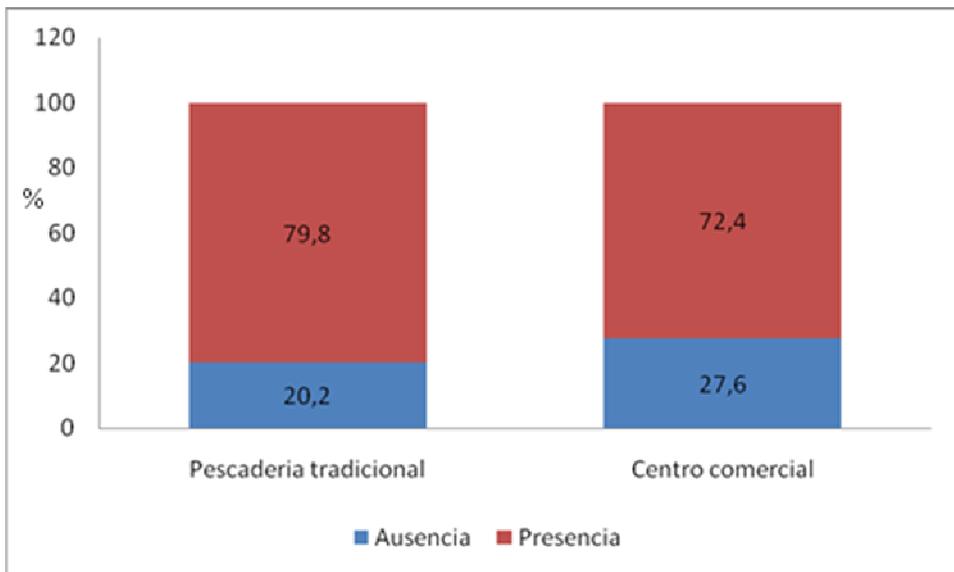
Pretendimos relacionar finalmente la asociación entre fagos somáticos con las variables presentes en nuestro estudio, pero no se obtuvo diferencias estadísticamente significativas con ninguna de ellas. Aunque si se puede observar que son los mejillones los que presentaron más contaminación por fagos [77.88 %; IC 95 % (68.90-84.91)] (Tabla 21); las pescaderías tradicionales las que presentaron mayor prevalencia de este indicador con un 79.80 % [IC 95 % (74.02-84.51)] (Figura 32); en primavera se determinó un 82.14 % [IC 95 % (73.52-88.49)] de muestras que resultaron positivas para fagos somáticos (Tabla 22) y los miércoles dieron el mayor porcentaje para este indicador (82.22 %; IC 95 % (74.50-88.06)) (Tabla 23).

Tabla 21. Prevalencia de fagos somáticos según el tipo de molusco.

	Fagos somáticos					
	Ausencia			Presencia		
Tipo de alimento	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Conchas finas	7	15.56	6.99-30.06	38	84.44	69.94-93.00
Chirlas	28	24.78	17.35-33.95	85	75.22	66.04-82.64
Mejillones	25	22.12	15.08-31.10	88	77.88	68.90-84.91
Almejas de carril	13	22.41	12.92-35.59	45	77.59	64.40-87.08

n.s

Figura 32. Prevalencia de fagos somáticos según la procedencia del molusco.



n.s

Tabla 22. Prevalencia de fagos somáticos según la estación del año.

	Fagos somáticos					
	Ausencia			Presencia		
Estación del año	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Invierno	15	21.74	13.06-33.60	54	78.26	66.39-86.93
Otoño	23	29.87	20.25-41.52	54	70.13	58.47-79.75
Primavera	20	17.86	11.51-26.47	92	82.14	73.52-88.49
Verano	15	21.13	12.68-32.74	56	78.87	67.25-87.32

*n.s***Tabla 23. Prevalencia de fagos somáticos según el día de toma del molusco.**

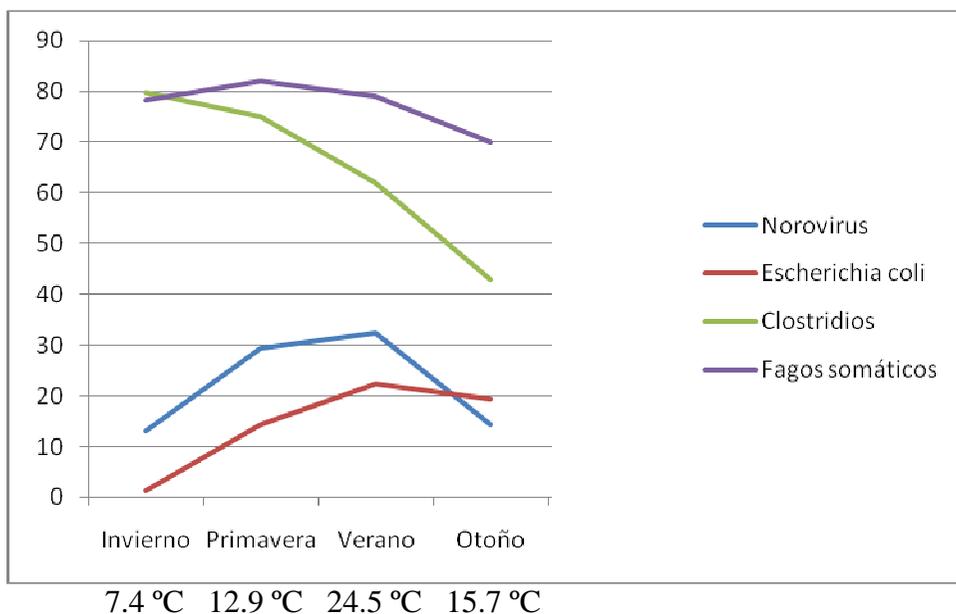
	Fagos somáticos					
	Ausencia			Presencia		
Día de toma	N	%	IC 95 %	N	%	IC 95 %
Lunes	8	22.22	10.73-39.58	28	77.78	60.41-89.27
Martes	41	25.94	19.46-33.63	117	74.06	66.37-80.54
Miércoles	24	17.78	11.94-25.50	111	82.22	74.50-88.06

n.s

En la figura 33 se han representado los distintos indicadores con objeto de ver conjuntamente la variación que presentaban en función a la estación del año.

De la figura podemos deducir que para el caso de los norovirus y *E. coli* se establece una tendencia similar, es decir aumentan cuando lo hacen las temperaturas y disminuyen con la disminución de estas. En cambio, para clostridios y fagos somáticos observamos que los porcentajes más altos los encontramos a bajas temperaturas.

Figura 33. Prevalencia de los distintos parámetros de acuerdo a la época del año.



6. RELACIÓN DE LOS
DISTINTOS
INDICADORES

Hemos realizado un test de comparación de medias de muestras independientes para relacionar la prevalencia de norovirus con los distintos indicadores de contaminación estudiados. En la tabla 24 se observa que aunque no existen diferencias estadísticamente significativas para ningún indicador, en el caso de *E. coli*, clostridios y fagos somáticos los valores más elevados los presentan las muestras con presencia de norovirus.

Tabla 24. Test estadístico de comparación de dos medias para muestras independientes, de norovirus frente a los distintos indicadores.

Indicadores	NorV +		NorV -		Signif. estadis.
	Media	D.S.	Media	D.S.	
<i>Escherechia coli</i>	257.64	731.41	220.73	1037.52	<i>n.s</i>
Clostridios	12.71	27.18	9.56	20.25	<i>n.s</i>
Fagos somáticos	94.95	146.83	80.74	104.83	<i>n.s</i>
Aerobios mesófilos	390505.24	647653.48	728764.93	3731829.01	<i>n.s</i>
Enterobacterias	115.89	228.66	156.15	482.85	<i>n.s</i>

Puesto que la legislación solo establece como parámetro a controlar en los moluscos bivalvos *E. coli*, hemos realizado otro test de comparación de medias de muestras independientes para relacionar la prevalencia de este indicador con los otros parámetros estudiados. Observamos que los valores medios de todos los microorganismos estudiados son mayores en el caso de que sean positivos para *E. coli*, aunque no existan diferencias estadísticamente significativas (Tabla 25).

Tabla 25. Test estadístico de comparación de dos medias para muestras independientes, de *E. coli* frente a los distintos indicadores.

Indicadores	E.coli +		E.coli -		Signif. estadis .
	Media	D.S.	Media	D.S.	
Clostridios	13.63	30.41	9.72	20.29	<i>n.s</i>
Fagos somáticos	98.08	164.30	81.62	105.52	<i>n.s</i>
Aerobios mesófilos	849996.4 8	1417893.4 0	646569.7 3	3510653.4 9	<i>n.s</i>
Enterobacterias	233.42	425.43	132.06	438.51	<i>n.s</i>

7. RELACIÓN ENTRE LOS
INDICADORES DE
CONTAMINACIÓN FECAL
Y E.COLI

Como hemos comentado anteriormente, la legislación establece como único parámetro a controlar en los moluscos bivalvos destinados al consumo humano *E. coli*. A continuación queremos ver la correlación que existe entre el parámetro que contempla el Reglamento (CE) N° 2074/2005 y los demás microorganismos analizados en nuestro estudio. Para ello hemos calculado el coeficiente de correlación de *Pearson* (Tabla 26).

En la tabla se observa que con todos los parámetros *E. coli* presenta una correlación positiva, la cual resulta estadísticamente significativa para el caso del recuento de *clostridios* y para recuento de enterobacterias.

Tabla 26. Asociación entre variables de carácter cuantitativo: coeficiente de correlación de Pearson.

Indicador	Coeficiente de correlación (significancia)
	<i>E.coli</i>
Clostridios	0.129 (0.020*)
Fagos somáticos	0.070 (0.203)
Aerobios	0.006 (0.920)
Enterobacterias	0.142 (0.010*)

*Indica los valores que son significativos, mostrando la dependencia entre los indicadores.

Por último hemos realizado una regresión lineal para los dos casos en los que la correlación que se establecía era significativa obteniendo los resultados que mostramos en la tabla 27.

Tabla 27. Estimación lineal para el recuento de *E. coli* y el recuento de clostridios.

	Recuento de <i>E.coli</i>		
	R^2	p	ecuación
Recuento de Clostridios	0.017	<0.05	Recuento <i>E.Coli</i> = 170.73 + 5.69 x Recuento Clostridios
Recuento de enterobacterias	0.020	<0.05	Recuento <i>E.Coli</i> = 182.86 + 0.32 x Recuento Enterobacterias

8. ¿QUÉ VARIABLES INFLUYEN EN
LA PRESENCIA
DE NOROVIRUS?

Para determinar de qué depende la presencia de norovirus en los moluscos bivalvos de venta en Granada se realiza una regresión logística binaria. Para ello se tomó una muestra de 329 moluscos bivalvos de venta en pescaderías de Granada y se consideraron las siguientes variables: día de toma, especie de molusco, *E. coli*, clostridios, fagos somáticos, procedencia, y estación del año. Se desea determinar mediante un análisis de regresión logística cuáles de esas variables influyen en la presencia o ausencia de norovirus, cuando se consideran actuando de manera conjunta. Las variables introducidas en el modelo son día de toma, tipo de alimento, estación del año, *E. coli*, clostridios y fagos somáticos.

En la tabla 28 se muestran las variables que pueden estar asociadas con la presencia o ausencia de norovirus. Se han tomado como categorías de referencia las variables menos contaminadas por norovirus.

Como se puede observar, controlando por el efecto del tipo de molusco y la estación del año, las demás variables que figuran no están asociadas con el riesgo de tener o no norovirus, y el tipo de alimento y la estación si lo están.

Las almejas de carril presentan 6.40 veces más probabilidad de estar contaminadas por norovirus que las conchas finas. En verano la probabilidad de encontrar norovirus en una muestra de moluscos es 2.8 veces superior que invierno.

Tabla 28. Regresión logística de las variables que pueden estar asociadas con la presencia o ausencia de norovirus entre las 329 muestras de moluscos estudiados.

VARIABLES	OR ^a AJUSTADA	IC 95 %	p
<i>DÍA DE TOMA</i>			
Lunes	1		0.223
Martes	1.75	0.55-5.57	0.341
Miércoles	1.10	0.32-3.83	0.883
<i>TIPO DE MOLUSCO</i>			
Conchas finas	1		0.017
Chirlas	3.08	0.95-9.92	0.060
Mejillones	4.21	1.33-13.34	0.015
Almejas de carril	6.40	1.90-21.56	0.003
<i>E.COLI</i>			
Ausencia	1		
Presencia	1.57	0.74-3.30	0.237
<i>CLOSTRIDIOS</i>			
Ausencia	1		
Presencia	0.698	0.38-1.27	0.240
<i>FAGOS SOMÁTICOS</i>			
Ausencia	1		
Presencia	1.63	0.80-3.29	0.176

→

<i>PROCEDENCIA</i>			
Pescadería tradicional	1		
Centro comercial	1.20	0.55-2.65	0.648
<i>ESTACIÓN</i>			
Invierno	1		0.004
Otoño	0.785	0.28-2.17	0.641
Primavera	2.533	1.10-5.84	0.029
Verano	2.855	1.15-7.08	0.024

^aEn la regresión logística, por el procedimiento de introducir, el test de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow indica que el modelo fue apropiado ($\chi^2=6.286$; 8 g.l. ; $p = 0.615$).

DISCUSIÓN

La repercusión de las enfermedades transmitidas por los alimentos en la salud pública y el fuerte impacto económico que ocasionan hacen que la seguridad alimentaria sea uno de los objetivos prioritarios de los organismos competentes en las distintas administraciones. El reciente incremento de estas enfermedades se relaciona estrechamente con los cambios sociales experimentados en los últimos años y que pueden sintetizarse en los siguientes aspectos:

- Aumento de poblaciones susceptibles, entre las que se incluyen los ancianos y los enfermos inmunocomprometidos.
- Cambios experimentados en los hábitos alimenticios.
- Existencia de un cierto relajamiento en el control sanitario de productos alimentarios importados, algunos de ellos procedentes de regiones endémicas.
- Desplazamientos de la población a zonas de alto riesgo.

Consecuentemente, es prioritario diseñar y desarrollar programas que abarquen todas las fases de la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta la transformación, distribución y venta de los alimentos, sin obviar la educación sanitaria del consumidor.

Los moluscos bivalvos son muy apreciados en la alimentación, constituyendo una excelente fuente de nutrientes al aportar proteínas de alto valor biológico (similares a las de la carne y los huevos), un contenido variado en minerales, oligoelementos y vitaminas y lípidos poliinsaturados. Con el fin de garantizar la salubridad de estos alimentos, su producción y comercialización están estrictamente legisladas debido a que estos organismos se alimentan por filtración, pudiendo concentrar agentes tóxicos y/o infecciosos existentes en el ambiente en el que se desarrollan. No obstante, episodios auto limitados de gastroenteritis de etiología no determinada continúan siendo habituales entre los consumidores.

En el proceso de alimentación normal, los moluscos bombean y filtran grandes cantidades de agua a través del cuerpo. Durante este acto concentran

microorganismos, tanto inocuos como patógenos, así como otras sustancias dañinas como metales pesados o biotoxinas. El grado de concentración de las mismas depende de las especies de moluscos, salinidad, temperatura del agua y de la condición fisiológica.

Las enfermedades infecciosas ocasionados por virus entéricos de transmisión hídrica, como norovirus, han sido asociadas con diversos brotes de transmisión por consumo de moluscos (MARTÍNEZ y cols., 2008). Con el propósito de controlar esta problemática, se ha establecido en Europa y España, normativas para vigilar la calidad sanitaria de las aguas destinadas a la producción, así como la reglamentación técnico-sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos destinados al consumo humano directo o a la transformación previa a su consumo. (REGLAMENTO (CE) N° 2074/2005, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 2076/2005, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 1441/2007, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 853/2004, 29 abril; REGLAMENTO (CE) N° 854/2004, 29 abril; REAL DECRETO 308/1993, 26 febrero; REAL DECRETO 571/1999, 9 abril). Sin embargo esta legislación únicamente contempla parámetros bacterianos, que no son de ningún modo descriptivos de la calidad

virológica de las muestras en cuestión. (SERRACA y cols., 2010). Pero los virus en general y en concreto los norovirus son capaces de resistir la depuración normal de los moluscos y en condiciones óptimas pueden sobrevivir durante tiempo en el ambiente (DUBOIS y cols., 2002).

Aunque son numerosos los estudios sobre contaminación de moluscos bivalvos, bien en las áreas de cultivo, bien en las áreas depuración, son pocos los autores que estudian la contaminación de los moluscos bivalvos en los mercados ya listos para ser consumidos. Por ello, en el presente estudio, se describe la contaminación por norovirus de los genogrupos I y II, en diferentes especies de moluscos bivalvos destinados al consumo humano adquiridos en distintos establecimientos de Granada (España). Estos hallazgos nos proporcionan datos para evaluar el riesgo que conlleva el consumo de estos alimentos contaminados por norovirus.

Nuestros resultados muestran una prevalencia para este virus de un 23.10 % [IC 95 % (18.73-28.10)]. (Figura 25). Datos similares a los nuestros son

los encontrados en un estudio en el sur de Francia (23 %) (LE GUYADER y cols., 2000) y los mostrados en un trabajo de la universidad de Barcelona (20 %) (HENROTH y cols., 2002).

Sin embargo valores inferiores a los nuestros fueron obtenidos en moluscos procedentes de mercados de Italia (GABRIELI y cols., 2007), que encuentran 2.3% en 67 muestras analizadas y los obtenidos en 29 muestras de moluscos estudiadas en el centro de depuración (SAVINI y cols., 2009) con un porcentaje de muestras positivas de un 3.4%. Otros autores informan de resultados similares a estos (MESQUITA y cols., 2011; BOXMAN y cols., 2006). Este bajo número de muestras positivas puede ser explicado por la limitada circulación del virus o por la baja estandarización de los métodos aplicados para identificarlos; ya que en un estudio realizado entre diciembre de 2005 y septiembre de 2006 en Japón, se obtuvo una prevalencia del 54 % en 57 muestras de moluscos analizadas (HANSMAN y cols., 2008). Resultados similares a los obtenidos en Japón son los reportados en un trabajo con muestras procedentes de pescaderías, en el cual se obtiene que 6 de las 11 muestras analizadas presentaban norovirus (54.5 %) (PRATO y cols., 2004). Estos datos

también están en concordancia a los obtenidos en muestras tomadas de restaurantes y pescaderías en Sicilia, que informan de una prevalencia de norovirus en los moluscos analizados del 55 % (LA ROSA y cols., 2012); a los determinados en 2008 por Le Guyader (LE GUYADER y cols., 2008) y al estudio reciente en Nápoles con un 57.7 % de contaminación (PEPE y cols., 2012).

Al evaluar la presencia de norovirus según las distintas especies de moluscos, éstos se detectaron en todos ellos, aunque la mayor contaminación tuvo lugar en las almejas de carril con un 34.48 % [IC 95 % (22.82-48.20)], seguido de los mejillones con un 25.66 % [IC 95 % (18.12-34.89)]. Varios autores obtienen en estudios realizados en distintos tipos de moluscos, que los mejillones son los más contaminados (GABRIELI y cols., 2007; BOXMAN y cols., 2006), al igual que los datos que podemos extraer de un trabajo en sur de Italia, donde se obtiene que 31 de 90 muestras de mejillones analizadas (34.4 %), fueron positivas para norovirus (SUFFREDINI y cols., 2011).

Son varios los autores que establecen que la prevalencia de norovirus es mayor durante los meses más fríos (VILARIÑO, y cols., 2009; CROCI, y cols., 2007; LE GUYADER y cols., 2006). La disminución del virus en los meses cálidos se puede explicar porque durante este periodo se reduce la circulación del virus (SVRAKA y cols., 2007), o porque a temperaturas elevadas la degradación de las partículas virales sea más rápida (METCALF y cols., 1995).

Sin embargo en nuestro trabajo aunque se detectó la presencia de norovirus durante todos los meses de estudio, fue en el verano donde el porcentaje era mayor [32.39 % IC 95 % (22.05-44.66)]. Una posible explicación para esto podría ser que, aunque el virus sea excretado por la población durante todo el año, y en verano debido a las elevadas temperaturas sea más rápidamente degradado como hemos comentado anteriormente, haya aumentado la concentración de virus excretado por la población en las aguas en las cuales han crecido los moluscos de nuestro estudio durante los meses cálidos (SHIEH y cols., 2003; LE GUYADER y cols., 2000).

Cuando estudiamos la contaminación de los moluscos según lugar de procedencia; centros comerciales y pescaderías tradicionales, se aprecia que en las pescaderías el porcentaje de contaminación es aproximadamente un 23.97 % [IC 95 % (18.83-29.94)] frente a un 20.69 % [IC 95 % (13.03-30.98)] en centros comerciales. Aunque se detecto un menor porcentaje de norovirus en las muestras obtenidas de las grandes cadenas, las diferencias no eran estadísticamente significativas. Por consecuencia esta aparente diferencia debe ser interpretada con cautela y evaluar conjuntos de datos mayores. De hecho, una posible explicación es que los sistemas más eficientes de control son promulgados por los productores de moluscos y los proveedores de las grandes cadenas de distribución, mientras que los pequeños puntos de venta, como pescaderías tradicionales o mercados al aire puede ser sometido a cambios incontrolados en los proveedores o en los procedimientos por lo que pueden aumentar los riesgos para la salud humana.

En un estudio realizado en la universidad de Bari (TERIO y cols., 2010), igualmente obtiene que la contaminación en las pescaderías (16,2%) es mayor que en los centros comerciales (8,1%) aunque con valores inferiores a los nuestros.

Dicha contaminación está íntimamente relacionada con el día en que se tomó la muestra ya que el menor porcentaje de muestras contaminadas tuvo lugar los lunes, con un 16.66 % [IC 95 % (6.96-33.47)] y es precisamente, en este día de la semana donde las muestras que se recogieron solo corresponden a los centros comerciales ya que en las pescaderías particulares este día no abren y el primer día de venta son los martes, que es justamente donde mayor es la contaminación por este tipo de virus [25.95 % IC 95 % (19.46-33.63)].

Como ya hemos expuesto anteriormente, la legislación actual establece el uso de programas de monitorización bacteriológica basados en *Escherichia coli* como indicador, para determinar la calidad sanitaria de los moluscos (REGLAMENTO (CE) N° 2074/2005, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 2076/2005, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 1441/2007, 5 diciembre; REGLAMENTO (CE) N° 853/2004, 29 abril; REGLAMENTO (CE) N° 854/2004, 29 abril; REAL DECRETO 308/1993, 26 febrero; REAL DECRETO 571/1999, 9 abril). Sin embargo, varios estudios han demostrado que aunque tales controles han sido eficaces para reducir el riesgo de la enfermedad bacteriológica a niveles mínimos, los moluscos bivalvos que cumplan las normas de *Escherichia coli* pueden no obstante, contener virus entéricos y por lo

tanto actuar como vectores de enfermedades virales humanas (PINTO y BOSCH, 2008; CHENG y cols., 2005).

En nuestro trabajo de las 329 muestras de moluscos analizados 281 no superaron los 230 ufc *Escherichia coli* / 100 gramos de molusco, sin embargo, en 61 de ellos, [21.71 % IC 95 % 19.06-46.40] que si cumplían la legislación, se detectó norovirus, por lo que la presencia de estos virus en moluscos bivalvos cuyo consumo humano está permitido legalmente, puede suponer un riesgo potencial para la salud. Resultados acordes con los nuestros se muestran en varios estudios (MESQUITA y cols., 2011; HWANG y cols., 2004; FORMIGA-CRUZ y cols., 2003; HENROTH y cols., 2002; DORÉ y cols., 2000), aunque algunos resultados difieren ligeramente de los nuestros, esta diferencia puede ser debida a los distintos enfoques experimentales empleados, a una mejora en las condiciones sanitarias de la zona de estudio y/o a una menor endemicidad de los virus en la población local.

Esta falta de correlación entre el indicador establecido por la legislación y la presencia/ausencia de patógenos víricos entéricos, entre ellos norovirus, ha sido bien documentado (LE GUYADER y cols., 2000; ROMALDE y cols., 2002; MYRMEL y cols., 2004; LE GUYADER y cols., 2006; CROCI y cols., 2007; SVRAKA y cols., 2007; LE GUYADER y cols., 2008; LOWTHER y cols., 2008; VILARIÑO y cols., 2009).

De acuerdo con nuestros datos, el factor que más influye con la presencia de *Escherichia coli* es la temperatura, ya que en verano el número de muestras positivas es mucho mayor que las obtenidas en la estación más fría, por lo que un fallo en la cadena del frío puede ser crucial y resulta recomendable la formación en cuanto a los aspectos de higiene del personal encargado. Estos mismos resultados obtienen en un estudio en Taiwan (HWANG y cols., 2004).

En un trabajo en el sur de Inglaterra (DORÉ y cols., 2000) se demuestra que los fagos son indicadores de contaminación por norovirus. Sin embargo en nuestro estudio, aunque si se obtiene que la media de este indicador es más elevada en las muestras con norovirus, las diferencias no son estadísticamente

significativas. Esto se confirma con la regresión logística (Tabla 28). Resultados similares a los nuestros son los obtenidos en Francia (VILARIÑO y cols., 2006). Sin embargo Doré y cols., demuestran que los fagos si son indicadores de contaminación por norovirus (DORÉ y cols., 2000).

Por otro lado al relacionar los fagos con la presencia de *Escherichia coli* tampoco obtenemos relación (Tabla 26). Valores en concordancia a los nuestros, son expuestos en varios estudios (LODDER-VERSCHOOR y cols., 2005; FORMIGA-CRUZ y cols., 2003; HENROTH y cols., 2002).

De acuerdo con los datos obtenidos por Formiga-Cruz y cols. (2003), los fagos son más frecuentes en invierno, sin embargo en la figura 33 observamos que nuestros resultados son contradictorios con los de este autor.

Se ha informado previamente que la viabilidad y estabilidad de las partículas virales en el agua del mar está muy influenciada por la temperatura y por la exposición prolongada a la radiación ultravioleta. Algunos autores

sugieren que los colifagos somáticos se pueden multiplicar en distintas circunstancias en el medio ambiente por lo que esto puede influir en las concentraciones de fagos determinadas (GUERRERO-LATORRE y cols., 2011).

En cambio en nuestro trabajo encontramos que existe una correlación positiva que es estadísticamente significativa, del parámetro *Escherichia coli* con el recuento de Clostridios. En la normativa aplicada a moluscos no se contemple el uso de otros indicadores distintos a *Escherichia coli*, por lo que no disponemos de un valor paramétrico del clostridios a partir del cual podamos decir que la muestra no es apta. Sin embargo para aguas de consumo se establece que *Clostridium prefringens* debe ser 0 ufc/100 ml (REAL DECRETO 140/2003, 7 febrero). Aunque hayamos encontrado una débil correlación entre ambos grupos de bacterias, esto no es así para el caso de norovirus, ya que nuestros resultados demuestran que los clostridios no indican la presencia de este virus. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores (MUNIAIN-MUJICA y cols. 2003).

Se ha comprobado que la depuración de los moluscos no elimina los virus entéricos ya que son más persistentes (SCHWAB y cols., 1998), pero si es efectiva frente a los indicadores bacterianos, por lo que resulta necesario llevar a cabo exámenes para garantizar la seguridad microbiológica de los moluscos (KITIGUL y cols., 2011).

En lo que respecta a los microorganismos patógenos, hemos determinado en todas las muestras la presencia de salmonelas, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*, al igual que un trabajo realizado con muestras de moluscos del río Misisipi (MORENO y cols., 2011; BURKHARDT y CALCI 2000).

En ninguna muestra estudiada aislamos salmonela ni *Listeria monocytogenes*, resultados que no concuerdan con los de otros autores. Por ejemplo, en un estudio realizado en la Universidad de Pamplona (HERRERA y SANTOS, 2005), en el que analizaron muestras de pescado fresco expandido en esta ciudad encontraron muestras positivas en el 12 % (50 muestras analizadas de las que 6 fueron positivas para *Salmonella* spp).

Estos resultados concuerdan con los reportados por Hatha y Lakshmanaperumalsamy, quienes encontraron una prevalencia del 12.25 % en muestras de pescaderías del sur de la India (HATHA y LAKSHMANAPERUMALSAMY, 1997).

La bibliografía consultada indica una alta incidencia a nivel mundial de infecciones humanas debidas a esta bacteria ocasionadas por el consumo de alimentos de origen animal. En muchos países, *Salmonella* spp. es la principal causa de infecciones de origen alimentario y brotes (MALORNY y cols., 2004).

Como se ha expuesto anteriormente, de las 329 muestras analizadas, solamente aislamos *Vibrio parahaemolyticus* en un 1.22 % [IC 95 % (0.39-3.29)]. Aunque se encontró en baja prevalencia es muy importante su presencia por la transcendencia clínica de dicho microorganismo.

Yi-Cheng Su y Chengchu Liu en un estudio con ostras, observa que la mayoría estaban contaminadas por *Vibrio parahaemolyticus* por encima de 1000 UFC/g (YI-CHENG y CHENGCHU., 2007).

Con respecto a todo lo expuesto con anterioridad (Tabla 28), observamos que ninguna de las variables presentes en el estudio puede predecir la presencia de norovirus por lo que el mejor indicador según nuestro estudio es el tipo de molusco y la temperatura ambiental. Por esto lo mejor para garantizar la seguridad del consumo de moluscos sería tener en cuenta factores como la temperatura ambiental y por supuesto investigar sobre tratamientos previos, como la adecuada preparación del bivalvo antes de su consumo para disminuir el contenido de patógenos (HENROTH y cols., 2002).

CONCLUSIONES

Del estudio de la contaminación por norovirus en moluscos bivalvos comercializados en Granada y su relación con los indicadores de contaminación fecal y otras variables de interés epidemiológico, se pueden obtener las conclusiones que se exponen a continuación.

1. El número de muestras no aptas porque sobrepasaron los límites para *Esherichia coli*, indicador establecido por la legislación vigente, fue de un 15 % por lo que la calidad microbiológica de los moluscos bivalvos, comercializados en Granada, y destinados al consumo humano supone cierto riesgo para el consumidor.
2. Del total de las muestras estudiadas, aproximadamente una cuarta parte presentaba contaminación por norovirus. En las muestras de moluscos que fueron aptas según el parámetro *Esherichia coli*, se obtuvo un 21.7 % de contaminación por este virus. Esto nos muestra que no es suficiente este indicador bacteriano para garantizar la seguridad de molusco.

3. Se ha comprobado que el plan de autocontrol, el cual incluye planes generales de higiene y plan de análisis de control y puntos críticos, resulta menos eficaz en los establecimientos de venta de pescado tradicionales ya que la contaminación por norovirus y/o *Esherichia coli* es mayor que en aquellas grandes cadenas de distribución de venta que disponen de sistemas más eficientes de autocontrol, mientras que los pequeños puntos de venta, como pescaderías tradicionales o mercados al aire puede ser sometido a cambios incontrolados en los proveedores o en los procedimientos por lo que pueden aumentar los riesgos para la salud humana.

4. Se han observado diferencias en el patrón estacional de la contaminación por norovirus y por *Esherichia coli*. En ambos casos la mayor prevalencia ocurrió durante la estación más cálida. Esto puede deberse a que en las aguas en las cuales crecen los moluscos haya habido un aumento en la contaminación fecal durante esta época, elevando por tanto la concentración del virus. Otra posible hipótesis es que la metodología empleada al ser de menor sensibilidad que el método que amplifica ORFI/II junction estime por lo bajo el nivel de contaminación.

5. El estudio de la contaminación por norovirus en muestras de distintos tipos de moluscos bivalvos, nos ha permitido constatar que la mayor prevalencia tiene lugar en las almejas de carril. Esto podría ser debido a que este tipo de molusco necesite períodos de depuración más prolongados en el tiempo.

6. La presencia de norovirus en muestras de moluscos se ha comparado con otros indicadores propuestos (*E.coli*, slostridios, fagos somáticos, aerobios mesófilos y enterobacterias) no encontrando ninguna asociación estadísticamente significativa.

7. El parámetro que fija la legislación, se ha relacionado con otros microorganismos (clostridios, fagos somáticos, aerobios mesófilos y enterobacterias) encontrando correlación significativa positiva entre *E.coli* y clostridios, y entre *E.coli* y enterobacterias.

8. Al comprobar la ineficacia del proceso de depuración y la existencia de norovirus en los moluscos bivalvos, que de acuerdo con la legislación vigente pueden ser destinados al consumo humano, creemos necesaria la inclusión de otros parámetros microbiológicos con el fin de garantizar la calidad sanitaria de estos alimentos.

9. Ante la gravedad que adquiere la enfermedad causada por norovirus en ciertos grupos de la población y la baja dosis mínima infectante, es necesario que este tipo de población disponga de la suficiente información para ser consciente del riesgo que supone la ingestión de moluscos bivalvos crudos.

10. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de una coordinación entre los distintos organismos responsables con el fin de vigilar la presencia de estos virus en el molusco y establecer las medidas preventivas y de control adecuadas para minimizar el riesgo de infección en la población humana.

BIBLIOGRAFÍA

AENOR (1999): Calidad del agua. Detección y recuento de *Escherichia coli* y bacterias coliformes. Parte 3: Método miniaturizado (Número Más Probable) para la detección y recuento de *E. coli* en aguas superficiales y aguas residuales. ISO 9308-3:1998.

AENOR (2000): Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de *Staphylococcus aureus* coagulasa positiva y otras especies. UNE- EN-ISO 6888-1:1999.

AENOR (2002): Calidad del agua. Detección y recuento de bacteriófagos. Parte 2: Recuento de colífagos somáticos. UNE-EN ISO 10705-2:2000.

AENOR (2003): Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para el recuento de microorganismos. Técnica de recuento de colonias a 30°C. UNE-EN-ISO 4833:2003.

AENOR (2005): Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para detección y recuento de *Listeria monocytogenes*. Método de recuento. Modificación del medio de recuento. UNE-EN-ISO 11290-2:1998/AM 1: 2004.

AENOR (2007): Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Método horizontal para la detección de *Salmonella* spp. UNE-EN ISO 6579-2003.

ALLEN D.J., GRAY J.J., GALLIMORE CH.I., XERRY J. y ITURRIZAGOMARA M. (2008): Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes. *PLoS ONE*. **3(1)**: 1485.

ATMAR R.L. y ESTES M.K. (2001): Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human calicivirus. *Clin Microbiol Rev*. **14**: 15-37.

ATMAR R.L., BERNSTEIN D.I., HARRO C.D., AL-IBRAHIM M.S., CHEN W.H., FERREIRA J., ESTES M.K., GRAHAM D.Y., OPEKUN A.R., RICHARDSON C. y MENDELMAN P.M. (2011): Norovirus vaccine against experimental human Norwalk Virus illness. *N Engl J Med.* **365(23)**: 2178-87.

BAGGI F., DEMARTA A. y PEDUZZI R. (2001): Persistence of viral pathogens and bacteriophages during sewage treatment: Lack of correlation with indicator bacteria. *Res Microbiol.* **152(8)**: 743-51.

BOXMAN I.L., TILBURG J.J., TE LOEKE N.A., VENNEMA H., JONKER K., DE BOER E. y KOOPMANS M. (2006): Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.* **108 (3)**: 391-396.

BRUGERE-PICOUX J. y TESSIER P. (2010): Viral gastroenteritis in domestic animals and zoonoses. *Bull Acad Natl Med.* **194(8)**:1439-49.

BUESA J., MONTAVA R., ABU-MALLOUH R., FOS M., RIBES J.M., BARTOLOME R. (2008): Sequential evolution of genotype GII.4 norovirus variants causing gastroenteritis outbreaks from 2001 to 2006 in Eastern Spain. *J Med Virol.* **80**:1288-95.

BURKHARDT W. y CALCI K. (2000): Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl Environ Microbiol.* **66(4)**: 1375-1378

CEN (2004): Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de análisis, suspensión inicial y diluciones decimales para el examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales. Parte 3: Reglas específicas para la preparación de pescados y productos de la pesca. ISO 6887-1:2004; ISO 6887-3:2004.

CHENG P.K., WONG D.K., CHUNG T.W. y LIM W.W. (2005): Norovirus contamination found in oysters worldwide. *J Med Virol.* **76**: 593-597.

CLIVER D.O., MATSIU S.M. y CASTEEL M. (2006): Infections with viruses and prions. In Riemann H.P., Cliver D.O., editors. *Foodborne Infections and Intoxications*. Pp: 367-448. 3ª ed. Elsevier. Amsterdam.

CRAMER E.H., BLANTON C.J., BLANTON L.H., VAUGHAN G.H., BOPP CH.A. y FORNEY D.L. (2006): Epidemiology of Gastroenteritis on Cruise Ships, 2001–2004. *Am J Preventive Med.* **30(3)**: 252–257.

CROCI L., LOSIO M., SUFFREDINI E., PAVONI E., DI PASQUALE S., FALLACARA F. y ARCANGELI G. (2007): Assessment of human enteric viruses in shellfish from the northern Adriatic sea. *Int J Food Microbiol.* **114**: 252–257.

D'ANCONA H. (1960): Tratado de Zoologías. *In Zoología Especial. Tomo II.* Pp: 729-755. 3ª ed. Labor. Barcelona.

DOMINGUEZ A., TORNER N. RUIZ L., MARTINEZ A., BARRABEIG I., CAMPS N. y cols. (2008): Etiology and epidemiology of viral gastroenteritis outbreaks in Catalonia (Spain) in 2004- 2005. *J Clin Virol.* **43**:126-31.

DORÉ W.J., HENSHILWOOD K. y LEES D.N. (2000): Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol.* **66(4)**: 1280-1285.

DUBOIS E., AGIER C., TRAORÉ O., HENNECHART C., MERLE G., CRUCIÈRE C. y LAVERAN H. (2002): Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J Food Prot.* **65(12)**: 1962-1969.

DUIZER E., BIJKERK P., ROCKY B., DE G.A., TWUIJK F. y KOOPMANS M. (2004): Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol.* **70(8)**: 4538-43.

ESPIGARES GARCÍA M., FERNÁNDEZ-CREHUET NAVAJAS M., MORENO ABRIL O. y GUILLÉN SOLVAS F. (2008): Aspectos sanitarios del agua. In Piédrola Gil *Medicina Preventiva y Salud Pública*. Pp: 349-360. 11ª ed. Elsevier Masson. Barcelona.

FALLAHI S. y MATTISON K. (2011): Evaluation of murine norovirus persistence in environments relevant to food production and processing. *J Food Prot.* **74(11)**: 1847-1851.

FARKAS T., SESTAK K., WEI C. y JIANG X. (2008): Characterization of a rhesus monkey calicivirus representing a new genus of Caliciviridae. *J. Virol.* **82**: 5408–5416.

FARKAS T., CROSS R.W., HARGITT III E., LERCHE N.W., MORROW A.L. y SESTAK K. (2010): Genetic diversity and histo-blood group antigen interactions of rhesus enteric caliciviruses. *J Virol.* **84(17)**: 8617–8625.

FAYER R., GRACZYK T.K., LEWIS E.J., TROUT J.M. y FARLEY C.A. (1998): Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 1070-1074.

FAYER R., DUBEY J.P. y LINDSAY D.S. (2004): Zoonotic protozoa: from land to sea. *Trends Parasitol.* **20(11)**: 531-6.

FERGUSON C., COOTE B., ASHBOLT L. y STEVENSON I. (1996): Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Res.* **30**: 2045-2054.

FORMIGA-CRUZ M., ALLARD A.K., CONDÉN-HANSSON A.C., HENSHILWOOD K., HERNROTH B.E., JOFRE J. y cols. (2003): Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl Environ Microbiol.* **69(3)**:1556-63.

FROM (2010): Ministerio de medio ambiente, rural y marino. Gobierno de España.

GABRIELI R., MACALUSO A., LANNI L., SACCARES S., DI GIAMBERARDINO F., CENCIONI M., PETRINCA A.R. y DIVIZIA M. (2007): Enteric viruses in molluscan shellfish. *New Microbiologica*. **30**: 471-475.

GALMÉS TRUYOLS A., GIMÉNEZ DURAN J., RIUTORT A., ARBONA CERDÁ G., BOSCH ISABEL C., PORTELL ARBONA M. y VANRELL BERGA J. (2011): Brote de norovirus en Mallorca asociado al consumo de ostras. *Gaceta Sanitaria*. **25(2)**: 173-175.

GARCÍA G. y SÁNCHEZ P. (1998): Riesgos sanitarios del pescado y marisco. I. Infecciones e intoxicaciones bacterianas. *Alimentaria*. **35(293)**: 93-96.

GIL SÁNCHEZ J. (2004): Toxiinfecciones alimentarias: ¿una patología emergente? Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca. Control de Calidad, SEIMC.

GIAMMANCO G.M., ROTOLO V., MEDICI M.C., TUMMOLO F., BONURA F., CHEZZI C., MARTELLA V. y DE GRAZIA S. (2011): Recombinant norovirus GII.g/GII.12 gastroenteritis in children. *Infect Genet Evol.* **12(1)**: 169-74.

GIOVANNI M., GIAMMANCO, V.R., MEDICI M.C., TUMMOLO F., BONURA F., CHEZZI C., MARTELLA V., y DE GRAZIA S. (2011): Recombinant norovirus GII.g/GII.12 gastroenteritis in children. *Infect Genet Evol.* **12(1)**: 169-74.

GLASS R.I., NOEL J., ANDO T., FANKHAUSER R.L., BELLLOT G., MOUNTS A., PARASHAR U.D., BRESEE J.S. y MONROE S.S. (2000): The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics. *J Infect Dis.* **181 (2)**: 254-261.

GLASS R.I., PARASHAR U.D. y ESTES M.K. (2009): Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med.* **361**: 1776-1785.

GOLLER J.L., DIMITRIADIS A., TAN A., KELLY H. y MARSHALL J.A. (2004): Long-term features of norovirus gastroenteritis in the elderly. *J Hosp Infect.* **58(4)**: 286-291.

GOODGAME R. (2006): Norovirus gastroenteritis. *Curr Gastroenterol Rep.* **8(5)**: 401-408.

GRABOW W.O.K. (2001). Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water SA.* **27(2)**: 251–268.

GRACZYK T.K., CONN D.B., MARCOGLIESE D.J., GRACZYK H. y DE LAFONTAINE Y. (2003): Accumulation of human waterborne parasites by zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*). *Parasitology Research.* **89**:107-112.

GRAY J.J., KOHLI E., RUGGERI F.M., VENNEMA H., SANCHEZ-FAUQUIER A., SCHREIER E. y cols. (2007): European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol.* **14**: 1349-55.

GUERRERO-LATORRE L., CARRATALA A., RODRIGUEZ-MANZANO J., CALGUA B., HUNDESA A. y GIRONES R. (2011). Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in Eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. *J Water Health*. **9(3)**: 515-24.

GUÉVREMONT E., BRASSARD J., HOUDEB A., SIMARD C. y TROTTIER Y.L. (2006): Development of an extraction and concentration procedure and comparison of RT-PCR primer systems for the detection of hepatitis A virus and norovirus GII in green onions. *J Virol Meth*. **134**: 130-135.

HANSMAN G.S., OKA T., LI T.C., NISHIO O., NODA M. y TAKEDA N. (2008): Detection of human enteric viruses in Japanese clams. *J Food Prot*. **71(8)**: 1689-95.

HARRIS J.P., ALLEN D.J. y ITURRIZA-GOMARA M. (2011): Norovirus: changing epidemiology, changing virology. The challenges for infection control. *J Infect Prev*. **12(3)**: 102-106.

HATHA M. y LAKSHMANAPERUMALSAMY A.A. (1997): Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiol.* **14**: 111-116.

HERNROTH B.E., CONDEN-HANSSON A.C., REHNSTAM-HOLM A.S., GIRONES R. y ALLARD A.K. (2002): Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *mytilus edulis*: the first scandinavian report. *Appl Environ Microbiol.* **68(9)**: 4523–4533.

HERRERA ARIAS F.C. y SANTOS BUELGA J.A. (2005): Prevalencia de *Salmonella* spp en pescado fresco expandido en Pamplona. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*. Universidad de Pamplona. **3(2)**: 34-42.

HWANG D.F., HUANG Y.R., CHEN T.Y., LIN S.J., CHEN L.H. y HSIEH H.S. (2004): Investigation of hygienic quality and freshness of marketed fresh seafood in northern Taiwan. *J Food Hyg Soc Japan.* **45(5)**: 225-230.

ISAKBAEVA E.T., WIDDOWSON M.A., BEARD R.S., BULENS S.N., MULLINS J., MONROE S.S., BRESEE J., SASSANO P., CRAMER E.H., y GLASS R.I. (2005): Norovirus transmission on cruise ship. *Emerg Infect Dis.* **11(1)**: 154-157.

KAPLAN J.E., GARY G.W., BARON R.C., SINGH N., SCHONBERGER L.B., FELDMAN R. y cols. (1982): Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute non bacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med.* **96**: 756-61.

KHAMRIN P., TAKANASHI S., CHAN-IT W., KOBAYASHI M., NISHIMURA S., KATSUMATA N. y cols. (2009): Immunochromatography test for rapid detection of norovirus in fecal specimens. *J Virol Methods.* **157**: 219-22.

KAYSNER C.A. y DE PAOLA A. (1998): *Vibrio cholera, Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus and other Vibrio spp.* In FDA (Ed). *Bacteriological Analytical Manual. Food and Drug Administration.* Pp:1-27. 8ª ed. FDA. Washington, DC.

KHAN Z., HUYNCKE M., WILLS T. y JAWORSKI M. (2010): Norwalk Virus. *Medscape Infectious Diseases*. **9(8)**: 1742-51.

KINGSLEY D.H. y RICHARDS G.P. (2001): Rapid and efficient extraction method for reverse transcription-PCR detection of hepatitis A and Norwalk-like viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol*. **67**: 4152-4157.

KITAJIMA M., HARAMOTO E., PHANUWAN C., KATAYAMA H. y FURUMAI H. (2012): Molecular detection and genotyping of human Noroviruses in influent and effluent water at a wastewater treatment plant in Japan. *J Appl Microbiol*. **10**: 1365-2672.

KITTIGUL L., POMBUBPA K., SUKONTHALUX S., RATTANATHAM T. y UTRARACHKIJ F. (2011): Noroviruses in oysters from local markets and oyster farms in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. **42(1)**: 105-13.

LA ROSA G., FRATINI M., SPURI VENNARUCCI M., GUERCIO A., PURPARI G. y MUSCILLO M. (2012): GIV noroviruses and other enteric viruses in bivalves: a preliminary study. *New Microbiologica*. **35**: 27-34.

LEE S.H., LEVY D.A., CRAUN G.F., BEACH M.J. y CALDERON R.L. (2002): Surveillance for waterborne-disease outbreaks-United States, 1999-2000. *MMWR Surveill Summ.* **51(8)**: 1-47.

LEES D. (2000): Viruses and bivalve shellfish. *Int. J. Food Microbiol.* **59(1-2)**: 81-116.

LE GUYADER F.S., HAUGARREAU L., MIOSSEC L., DUBOIS E. y POMMEPUY M. (2000): Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 3241–3248.

LE GUYADER F.S., BON F., DE MEDICI D., PARNAUDEAU S., BERTONE A., CRUDELI S., DOYLE A., ZIDANE M., SUFFREDINI E., KOHLI E., MADDALO E., MONINI M., GALLAY A., POMMEPUY M., POTHIER P. y RUGGERI F.M. (2006): Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol.* **11**: 3878-3882.

LE GUYADER F.S., LE SAUX J.C., AMBERT-BALAY K., KROL J., SERAIS O., PARNAUDEAU S., GIRAUDON H., DELMAS G., POMMEPUY M., POTHIER P. y ATMAR R.L. (2008): Aichi Virus, Norovirus, Astrovirus, Enterovirus, and Rotavirus involved in clinical cases from a french oyster-related gastroenteritis outbreak. *J Clin Microbiol.* **46(12)**: 4011-4017.

L'HOMME Y., SANSREGRET R., PLANTE-FORTIER E., LAMONTAGNE A.M., OUARDANI M., LACROIX G., y SIMARD C. (2009): Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae. *Virus Genes.* **39**: 66–75.

LODDER-VERSCHOOR F., DE RODA HUSMAN A.M., VAN DEN BERG H.H., STEIN A., VAN PELT-HEERSCHAP H.M. y VAN DER POEL W.H. (2005): Year-round screening of noncommercial and commercial oysters for the presence of human pathogenic viruses. *J Food Prot.* **68(9)**: 1853-1859.

LOPMAN B.A., ADAK G.K., REACHER M.H. y BROWN D.W.G. (2003): Two epidemiologic patterns of Norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000. *Emerg Infect Dis.* **9**: 71-77.

LOVE D., LOVELACE G. y SOBSEY M. (2010): Removal of *Escherichia coli*, *Enterococcus fecalis*, coliphage MS2, poliovirus, and hepatitis A virus from oysters (*Crassostrea virginica*) and hard shell clams (*Mercinaria mercinaria*) by depuration. *Int J Food Microbiol.* **143**: 211–217.

LOWTHER J.A., HENSHILWOOD K. y LEES D.N. (2008): Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J Food Prot.* **71**: 1427-1433.

MALORNY B., PACCASSONI E., FACH P., BUNGE C., MARTIN A. y HELMUTH R. (2004): Diagnostic Real-Time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl Environm Microbiol.* **70**: 7046-7052.

MANDELL G.L., BENNETT J.E. y DOLIN R. (2006): Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 6ª ed. Elsevier. Madrid. España.

MANSFIELD L.S. y GAJADHAR A.A. (2004): *Cyclospora cayetanensis*, a food- and waterborne coccidian parasite. *Vet Parasitol.* **126(1-2)**: 73-90.

MARTÍN ANDRES, A. y LUNA DEL CASTILLO J. de D. (2004). Bioestadística para las ciencias de la salud. Pp: 332-396. 5ª ed. Norma Capital. Madrid.

MARTÍN GRANADO A., VARELA MARTÍNEZ M.C., TORRES FRÍAS A., ORDÓÑEZ BANEGAS P., MARTÍNEZ SÁNCHEZ E.V., HERNÁNDEZ DOMÍNGUEZ M., HERNÁNDEZ PEZZI G. y TELLO ANCHUELA O. (2008): Vigilancia epidemiológica de brotes de transmisión hídrica en España. 1999-2006. *B.E.S.* **16(3)**: 25-36.

MARTÍNEZ E.V., VARELA M.C., CEVALLOS C., HERNÁNDEZ-PEZZI G., TORRES A. y ORDÓÑEZ P. (2008): Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). *B.E.S.* **16(21)**: 241-252.

METCALF T.G., MELNICK J.L. y ESTES M.K. (1995): Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annu Rev Microbiol.* **49**: 461-487.

MESQUITA J.R. ,VAZ L., CERQUEIRA S., CASTILHO F., SANTOS R., MONTEIRO S., MANSO C.F., ROMALDE J.L., SÃO M. y NASCIMENTO J. (2011): Norovirus, hepatitis A virus and enterovirus presence in shellfish from high quality harvesting areas in Portugal. *Food Microbiology*. **28**: 936-941.

MILLER W.A., ATWILL E.R., GARDNER I.A., MILLER M.A., FRITZ H.M., HEDRICK R.P., MELLI A.C., BARNES N.M. y CONRAD P.A. (2005): Clams (*Corbicula fluminea*) as bioindicators of fecal contamination with *Cryptosporidium* and *Giardia* spp. in freshwater ecosystems in California. *Int J Parasitol*. **35**: 673-684.

MELNICK J.L. (1984): Viruses in Water. In Melnick J.L. ed. *Monographs in Virology*. Vol. 15. Pp: 1-16. Karger Basel. Nueva York.

MORENO ROLDÁN E., ESPIGARES RODRÍGUEZ E., NAVARRO VICENTE C., FERNÁNDEZ-CREHUET NAVAJAS M. y MORENO ABRIL O. (2011): Microbial contamination of bivalve mollusks used for human consumption. *J Food Saf*. **31**: 257-261.

MORMANN S., DABISCH M. y BECKER B. (2010): Effects of technological processes on the tenacity and inactivation of norovirus genogroup II in experimentally contaminated foods. *Appl Environ Microbiol.* 2010. **76(2)**: 536-45.

MORTER S., BENNET G., FISH J., RICHARDS J., ALLEN D.J., NAWAZ S., y ITURRIZA-GOMARA M. (2011): Norovirus in the hospital setting; virus introduction and spread within the hospital environment. *J Hosp Infect.* **77**: 106-112.

MUNIAIN-MUJIKA I., CALVO M., LUCENA F. y GIRONES R. (2003): Comparative analysis of viral pathogens and potential indicators in shellfish. *Int J Food Microbiol.* **83(1)**: 75-85.

MYRMEL M., BERG E.M.M., RIMSTAD E. y GRINDE B. (2004): Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 2678-2684.

OKADA M., TANAKA T., OSETO M., TAKEDA N. y SCHINOZAKI K. (2006): Genetic analysis of noroviruses associated with fatalities in healthcare facilities. *Arch Virology*. **151(8)**: 1635-1641.

OKOH A.I., SIBANDA T. y SIYABULELA S.G. (2010): Inadequately treated wastewater as a source of human enteric viruses in the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **7**: 2620-2637.

ONU (2005): Medidas adoptadas para organizar las actividades del Decenio Internacional para la Acción. “El agua, fuente de vida”, 2005-2015.

PEPE T., VENTRONE I., SUFFREDINI E., CERUSO M., CROCI L., ANASTASIO A. y CORTESI M.L. (2012): Norovirus monitoring in bivalve molluscs harvested and commercialized in southern Italy. *J Food Prot*. **75(5)**: 976-81.

PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J. y GIRONES R. (1998): Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl Environ Microbiol*. **64(9)**: 3376-82.

PINTÓ R.M. y BOSCH A. (2008): Rethinking virus detection in food. *In* Koopmans M.P.G., Cliver D.O. y Bosch A. *Food-borne viruses: progress and challenges*. Pp: 171-188. ASM Press. Washington DC.

PRATO R., LOPALCO P.L., CHIRONNA M., BARBUTI G., GERMINARIO C. y QUARTO M. (2004): Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in South Italy. *BMC Infect Dis.* **4**:37.

REAL DECRETO 308/1993, de 26 de febrero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico- Sanitaria que fija las normas aplicables a la comercialización de moluscos bivalvos vivos. *B.O.E.* de 30 de marzo de 1993.

REAL DECRETO 571/1999, de 9 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la producción y comercialización de moluscos bivalvos vivos. *B.O.E.* de 10 de abril de 1999.

REAL DECRETO 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *B.O.E.* de 21 de febrero de 2003.

REGLAMENTO (CE) N° 853/2004 del parlamento europeo y del consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 139/55.

REGLAMENTO (CE) N° 854/2004 del parlamento europeo y del consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 139/206.

REGLAMENTO (CE) N° 2074/2005 de la comisión, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) N° 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) N° 853/2004 y (CE) N° 854/2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 338.

REGLAMENTO (CE) N° 2076/2005 de la comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen disposiciones transitorias para la aplicación de los Reglamentos (CE) N° 853/2004, (CE) N° 854/2004 y (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) N° 853/2004 y (CE) N° 854/2004. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 338.

REGLAMENTO (CE) N° 1441/2007 de la Comisión de 5 de diciembre de 2007 que modifica el Reglamento (CE) no 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 322/12-29.

REGLAMENTO (CE) N° 1021/2008 de la Comisión de 17 de octubre de 2008 que modifica los anexos I, II y III del Reglamento (CE) no 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, y el Reglamento (CE) no 2076/2005 en lo que respecta a los moluscos bivalvos vivos, determinados productos de la pesca y el personal que presta asistencia en los controles oficiales en los mataderos. *Diario Oficial de la Unión Europea*. L 277/15-17.

RIBES FERNÁNDEZ J.M. y BUESA GÓMEZ J. (2010): Infecciones por Norovirus. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* **28(1)**: 51-55.

ROCKX B., DE WIT M., VENNEMA H., VINJE J., DE BRUIN E., VAN DUYNHOVEN Y. y cols. (2002): Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* **35**: 246-53.

ROGER I., GLASS M.D., UMESH D., PARASHAR M.D. y ESTES M.K. (2009): Norovirus Gastroenteritis. *N Engl J Med.* **361**: 1776-1785.

ROMALDE J.L., AREA E., SÁNCHEZ G., RIBAO C., TORRADO I., ABAD X., PINTÓ R.M., BARJA J.L. y BOSCH A. (2002): Prevalence of enterovirus and hepatitis A virus in bivalve mollusks from Galicia (NW Spain): inadequacy of the EU standards of microbiological quality. *Int J Food Microbiol.* **74**: 119-130.

RZEZUTKA A. y COOK N. (2004): Survival of human enteric viruses in the environment and food. *FEMS Microbiol Rev.* **28(4)**: 441-53.

SAIR A.I., D'SOUZA D.H., MOE C.L. y JAYKUS L.A. (2002): Improved detection of human enteric viruses in foods by RT-PCR. *J Virol Meth.* **100**: 57–69.

SAUER E.P., BOWER P.A., BOOTSMA M.J. y MCLELLAN S.L. (2011): Detection of the human specific *Bacteroides* genetic marker provides evidence of widespread sewage contamination of stormwater in the urban environment. *Water Res.* **45**: 4081-4091.

SAVINI G., CASACCIA C., BARILE N., PAOLETTI M. y PINONI C.H. (2009): Norovirus in bivalve molluscs: a study of the efficacy of the depuration system. *Vet Ital.* **45(4)**: 535-539.

SCHWAB K.J., NEILL F.H., ESTES M.K., METCALF T.G. y ATMAR R.L. (1998): Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J Food Prot.* **61**: 1674–1680.

SERRA MAJEM L. y MATA ALBERT E. (2006): Peligros y riesgos sanitarios asociados a los alimentos. In Serra Majem L. y Aranceta Bertrina J. *Nutrición y Salud Pública*. Pp: 499-509. 2ª ed. Elsevier. Barcelona.

SERRACCA L., VERANI M., BATTISTINI R., IROSSINI I.A., CARDUCCI A. y ERCOLINI C. (2010): Evaluation of Adenovirus and E. coli as indicators for human enteric viruses presence in mussels produced in La Spezia Gulf (Italy). *Lett Appl Microbiol.* **50**: 462-467.

SHIEH C., BARIC R., WOODS J. y CALCI K. (2003): Molecular surveillance of enterovirus and Norwalk-Like virus in oysters relocated to a municipal-sewage-impacted gulf estuary. *Appl Environ Microbiol.* **69(12)**: 7130–7136.

SUFFREDINI E., TIZIANA P., VENTRONE I., y CROCI L. (2011): Norovirus detection in shellfish using two Real-Time RT-PCR methods. *New Microbiologica.* **34**: 9-16.

SVRAKA S., DUIZER E., VENNEMA H., DE BRUIN E., VAN DER VEER B., DORRESTEIJN B. y KOOPMANS M. (2007): Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in The Netherlands from 1994 through 2005. *J Clin Microbiol.* **45**: 1389-1394.

TAKKINEN J. (2006): Recent norovirus outbreaks on river and seagoing cruise ships in Europe. *Euro Surveill.* **11(6)**: 606-615.

TERIO V., MARTELLA P., MOSCHIDON P., DI PINTO P., TAUTILLO G. y BUONAVOGLIA C. (2010): Norovirus in retail shellfish. *Food Microbiology.* **27**: 29-32.

TSAN-YUK LAM T., ZHU H., SMITH D.K., GUAN Y., HOLMES E.C. y PYBUS O.G. (2012): The recombinant origin of emerging human norovirus GII.4/2008: intra-genotypic exchange of the capsid P2 domain. *J Gen Virol.* doi:10.1099/vir.0.039057-0.

TU E., BULL R.A., GREENING G.E., HEWITT J., LYON M.J., MARSHALL J.A., MCIVER C.J., RAWLINSON W.D. y WHITE P.A. (2008): Epidemics of Gastroenteritis during 2006 Were Associated with the Spread of Norovirus GII.4 Variants 2006a and 2006b. *Clin Infect Dis.* **46**: 413–20.

VENNEMA H., DE BRUIN E. y KOOPMANS M. (2002): Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol.* **25**: 233-5.

VERHEYEN J., TIMMEN-WEGO M., LAUDIEN R., BOUSSAAD I., SEN S., KOC A., UESBECK A., MAZOU F. y PFISTER H. (2009): Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa. *Appl Environ Microbiol.* **75(9)**: 2798-801.

VILARIÑO M.L., LE GUYADER F.S., POLO D., SCHAEFFER J., KRÖL J. y ROMALDE J.L. (2009): Assessment of human enteric viruses in cultured and wild bivalve molluscs. *Int Microbiol.* **12**: 145-15.

VILLALOBOS L. B. y ELGUEZABAL A. (2000): Detección de posible *Escherichia coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada Imbricata* comercializado en Cumaná (Venezuela). Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias. Postgrado de Biología Aplicada. Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná. Laboratorio de Alimentos de Humedad Intermedia.

VIVIER J.C., EHLERS M.M. y GRABOW W.O. (2004): Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Res.* **38**: 2699-705.

WIDDOWSON M.A., CRAMER E.H. y HADLEY L. (2004): Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus, united states, 2002. *J Infect Dis.* **190(1)**: 27-36.

WOOD C. P. (1980): Manual de Higiene de los Mariscos. 1ª ed. Acribia. Zaragoza.

WOLF S., HEWITT J. y GREENING G.E. (2010): Viral Multiplex Quantitative PCR Assays for Tracking Sources of Fecal Contamination. *Appl Environ Microbiol.* **76(5)**: 1388–1394.

WU H.M., FORNEK M. y SCHWAB K.J. (2005): A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. *Infect Control Hospital Epidemiology*. **26(10)**: 802-810.

YI-CHENG S. y CHENGCHU L. (2007): *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiology*. **24**: 549-558.

XERRY J., GALLIMORE CH.I, ITURRIZA-GOMARA M., ALLEN D.J. y GRAY J.J. (2008): Transmission events within outbreaks of gastroenteritis determined through analysis of nucleotide sequences of the P2 Domain of Genogroup II Noroviruses. *J Clin Microbiol*. **46**: 947-953.

ZAINAZOR T., NOOR HIDAYAH M.S., CHAI L.C., TUNUNG R., GHAZALI F.M. y SON R. (2010): The scenario of Norovirus contamination in food and food handlers. *J Microbiol Biotechnol*. **20(2)**: 229–237.

ZHANG K. y FARAHBAKHS K. (2007): Removal of native coliphages and coliform bacteria from municipal wastewater by various wastewater treatment processes: Implications to water reuse. *Water Res*. **41**: 2816-2824.

ANEXOS

MICROBIAL CONTAMINATION OF BIVALVE MOLLUSKS USED FOR HUMAN CONSUMPTION

ELENA MORENO ROLDÁN, ELENA ESPIGARES RODRÍGUEZ, CARMEN NAVARRO VICENTE, MILAGROS FERNÁNDEZ-CREHUET NAVAJAS and OBDULIA MORENO ABRIL

Department of Preventive Medicine and Public Health, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

¹Corresponding author. TEL: +34 958 24 96 15; FAX: +34 958 24 99 58; EMAIL: elmorol@correo.ugr.es

Accepted for Publication November 8, 2010

doi:10.1111/j.1745-4565.2010.00294.x

ABSTRACT

We studied 127 samples of bivalve mollusks (Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*; smooth clam, *Callista chione*; grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus*; and striped venus clam, *Chamelea gallina*) obtained in the winter and spring of 2009 from retail fish and shellfish vendors in Granada, Spain. Samples were analyzed (raw and after steaming) to determine the prevalence of *Escherichia coli*, mesophilic aerobes, *Staphylococcus aureus* and the disease-causing microorganisms *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus*. *E. coli* was found in 25% of raw samples and 4% of cooked samples. Aerobes were found in 89% of raw samples (more than 1,000 cfu/g), and *S. aureus* was found in 37.0%. Only one raw sample was positive for *V. parahaemolyticus*. The percentage of positive findings was fourfold as high in the spring sample as in the winter sample. Contamination was most frequent in the smooth clam, and samples obtained on Mondays were more frequently contaminated than those obtained on other days of the week.

PRACTICAL APPLICATIONS

Current Spanish legislation establishes that all bivalve mollusks intended for commercial sale and human consumption must be treated at a detoxification center. The application of detoxification is of fundamental importance because it constitutes a barrier against the transmission of bacterial and viral diseases of aquatic origin. We analyzed possible differences in contamination parameters in this type of shellfish, indicated characteristics that may be affected by alterations in quality, and discussed the potential effects of these alterations on human health.

INTRODUCTION

Bivalve Mollusks as Transmitters of Infectious Diseases

Seafood makes up a large part of the diet in many areas around the world. In the European Union, substantial economic activity is connected with the exploitation of natural bivalve shellfish beds and shellfish farms. Bivalve mollusks are especially prone to act as transmitters of disease-causing enteral bacteria and viruses, because the waters they inhabit are often exposed to contamination by fecal matter from sewer drains or from infected individuals. It has been widely shown that the consumption of contaminated seafood can cause diseases in humans.

Large increases in population and industrial activity have compromised sanitary conditions in coastal areas. This situation has led to considerable changes in the physicochemical and biological characteristics of marine ecosystems, and thus creates a potential public health risk from the consumption of marine organisms. Bivalve mollusks growing in coastal waters can become contaminated because they feed by filtering microscopic material from the water around them.

If seafood products from contaminated sites are consumed raw or only slightly cooked, or are stored or handled inappropriately, they can cause outbreaks of diseases that can lead to public health challenges (Wood 1980; García and Sánchez 1998). Outbreaks of infections associated with bivalve mollusks have been notified in only 12 countries in Europe, Asia, North America and Australia. Most reports have come from

the U.S.A., although the largest outbreak to date occurred in Shanghai in 1988, when 290,000 persons contracted hepatitis A after eating clams. In contrast with other bivalve-associated infections, this epidemic stood out because it caused 47 deaths. Other large outbreaks occurred in Australia, where 1,800 persons became ill in 1979, in the U.S.A. in 1986 and in Japan in 1991 (Potasman *et al.* 2002).

Food safety is guaranteed mainly by preventive measures and the application of procedures based on hazard analysis and critical control points (HACCP). For the production and processing of molluscan shellfish, HACCP should include the following practices: (1) appropriate selection of harvesting areas; (2) water quality monitoring programs; (3) final product inspection; and (4) hygiene control for product manipulators.

Bacterial Indicators

Bacteriological tests are the most sensitive method to detect recent fecal contamination. Bacteria are excreted at a constant rate of approximately 10^8 per gram of fecal matter and are found in human feces and those of other warm-blooded animals. In light of these characteristics and the survival capacities of different species, contamination limits in water for human consumption have been established for the following groups: total coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci and sulfur-reducing clostridia. Some enteroviruses become resistant in certain aquatic environments and under conventional treatment processes, including disinfection. This is the main reason for including sulfur-reducing clostridia as a microbiological parameter in quality standards, and for using coliphage bacteria in the microbiological control of water quality.

Viral Indicators

Most water-borne viruses are exceptionally resistant to natural inactivation, water treatment and disinfection processes that eliminate or inactivate more sensitive pathogens, and are thus more persistent in the environment (Nasser *et al.* 1993). These viruses are excreted during brief periods in amounts that can reach 10^{12} per gram of fecal matter (Melnick 1984). Somatic coliphages are adsorbed on receptors on the cell wall of *Escherichia coli* strains. They vary in morphology and are present in human feces and feces from most animals at concentrations of less than 10.108^{10} cfu/g. These viruses are more abundant in wastewaters, where they have been found in concentrations up to 10^4 cfu/mL. Exceptionally, somatic coliphages can multiply in uncontaminated waters by using indigenous bacterial species as hosts. From a methodological standpoint, these forms are the easiest to detect and count.

Their persistence in the environment is similar to that of human viruses although they are more sensitive to water treatment processes.

METHODS

Sampling Method and Sample Collection

Fresh bivalve mollusks (Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*; smooth clam, *Callista chione*; grooved carpet-shell clam, *Tapes decussatus*; striped venus clam, *Chamelea gallina*) were obtained from retail vendors that were located by searching the online Yellow Pages in Spanish with the terms "pescaderías" (fish and seafood stores) in the city of Granada in southern Spain. This located 46 vendors, and SPSS v. 15.0 software (Chicago, IL) was used to randomly select 16 of them (12 specialty stores and 4 fish and seafood sections in large supermarkets), which were considered representative of all vendors in the city. Shellfish samples were obtained during February (winter) and during the period from April to June (spring) 2009. All samples were transported to the laboratory under refrigeration and microbiological analyses were done as soon after reception as possible. Each sample was analyzed raw and after cooking (steaming at $77.3\text{C} \pm 8.7\text{C}$ for 1 min) to reproduce the usual cooking methods in our setting.

Microbiological Analysis

Microbiological analysis was done under aseptic conditions with sterilized materials. Suspensions and decimal dilutions were prepared in accordance with Spanish standard Norma UNE consistent with International Organization for Standardization (ISO) standard 6887-1-2000 (Wood 1980). To ensure that samples for microbiological analysis were representative, we used at least six individual mussels or clams weighing 75 to 100 g each (or 25 g for smaller animals). The flesh and intervalve water were used together. Under aseptic conditions, we weighed 25 g of each sample and homogenized it in a Stomacher blender (Stomacher 400 Circulator, Seward Limited, Norfolk, U.K.) for 2 min at 150 revolutions/min with 200 mL of 0.1% peptone water ($\text{pH } 7.0 \pm 0.2$). Each sample was tested for microorganisms indicative of fecal contamination of the water, including mesophilic aerobes, total coliforms, fecal coliforms and sulfur-reducing clostridia. We also looked for the pathogenic microorganisms *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus*.

Detection methods for different organisms were based on the following Spanish and international standards:

- *Recuento de aerobios mesófilos* [Mesophilic aerobe counts] (UNE EN ISO 4833:2003).
- *Recuento de enterobacterias lactosa positiva y recuento de Escherichia coli* [Lactose-positive enterobacteria and *Escherichia coli* counts] (Reference method UNE 556 83).

- *Recuento de Staphylococcus aureus coagulasa positiva* [Coagulase-positive *Staphylococcus aureus* counts] (UNE EN ISO 6888-1-1999).
- *Listeria monocytogenes* (método horizontal para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*) [Horizontal method for the detection and counting of *Listeria monocytogenes*] (UNE EN ISO 11290-2:1998).
- *Determinación de Salmonellas. Método* [Determination of *Salmonella* species. Method] (UNE EN ISO 6579:2007).
- *Determinación de Clostridios* [Determination of clostridia] (UNE EN ISO 7937:2005).
- *Determinación de fagos somáticos* [Determination of somatic phages] (UNE EN ISO 10705-2; 2000).

Bacterial Contamination Criteria

In raw samples, contamination was considered to exist on the basis of criteria established by the current legislation: more than 300 fecal coliforms or more than 230 *E. coli* per 100 g of mollusk flesh and intervalve water, and any *Salmonella* bacteria in 25 g of mollusk flesh (Real Decreto 571/1999). In cooked samples, the criterion for contamination, according to current legislation, was more than 10 cfu/g flesh (Real Decreto 202/2000).

Statistical Analysis

All results were analyzed with SPSS version 15.0 software (SPSS Inc. 2005). Categorical and qualitative variables were recorded as absolute and relative (percentage) frequencies. Correlations between variables were sought with contingency tables and Pearson's chi-squared test (Martín Andres and Luna del Castillo 2004).

RESULTS AND DISCUSSION

We studied a total of 127 samples of bivalve mollusks collected in the spring and summer of 2009: 89 (70.1%) from specialty stores and 38 (29.9%) from supermarket fish and seafood departments. This material was used to prepare 127 raw samples and 118 cooked samples so they were treated under heat in a similar way as the fish are cooked for consumption in our setting.

The four species analyzed here were Mediterranean mussel (47 samples, 37.0%), smooth clam (16 samples, 12.6%), striped venus clam (46 samples, 36.2%) and grooved carpet-shell clam (18 samples, 14.2%).

Current Spanish legislation sets limits only for contamination by *E. coli*. In general, the maximum allowable limit is 230 *E. coli* cells per 100 g raw flesh and intervalve water (Real Decreto 571/1999). European Commission Regulation EC 1441/2007 of December 5, 2007 (Reglamento (CE) N° 1441/2007) regarding the microbiological criteria to be applied to foodstuffs sets

TABLE 1. PRESENCE OF *ESCHERICHIA COLI* CONTAMINATION IN RAW AND COOKED SAMPLES OF BIVALVE MOLLUSKS

Type of sample		<i>Escherichia coli</i>		Total
		Negative	Positive	
Raw	N	95	32	127
	%	74.80	25.20	100
	95% CI	66.18–81.89	18.11–33.82	
Cooked	N	114	4	118
	%	96.61	3.39	100.00
	95% CI	91.03–98.91	1.09–8.97	
Total	N	209	36	245
	%	85.31	14.69	100
	95% CI	80.10–89.37	10.63–19.90	

Pearson chi-squared (1) = 23.2058; Pr = 0.000.

the maximum allowable limit for *E. coli* contamination in cooked mollusks at 10 cfu/g (Real Decreto 202/2000).

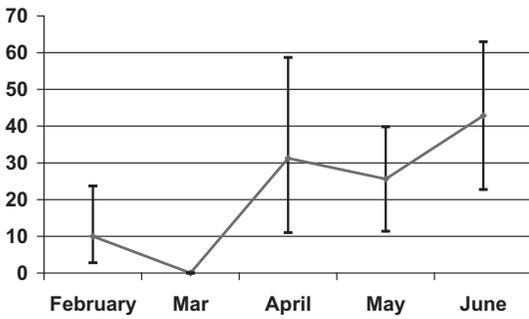
We therefore analyzed raw and cooked samples separately.

Among raw samples, 25% surpassed the legal limit for *E. coli* contamination, and among cooked samples, only 4% were positive for *E. coli*. Comparisons of raw and cooked shellfish (Table 1) showed that the higher rate of contamination in the former was statistically significant. Among the 127 raw samples, 32 (25.2%, 95% confidence interval [CI]: 17.92–33.67%) were positive for *E. coli*, which suggests that the mollusks were harvested from waters exposed to direct fecal contamination. Among the 118 cooked samples, *E. coli* was found in 4 (3.39%, 95% CI: 0.93–8.45%). In their study of 72 samples of bivalve mollusks, Villalobos and Elguezabal (2000) analyzed fecal coliforms with the most probable number per gram (MPN/g) method and obtained values below the limit considered to indicate contamination.

In our analyses to detect mesophilic aerobes, we found that 89.76% (95% CI: 83.13–94.44%) of the raw samples had more than 1,000 cfu/g. However, none of our cooked samples had more than 1,000 cfu/g. In a study of 63 samples of raw mollusks, Torres (2008) detected a higher rate of contamination with mesophilic aerobes: 100% of the samples had more than 1,000 cfu/g.

Our tests for *S. aureus* showed that 55.91% (95% CI: 46.82–64.70%) of the samples were negative. In the study by Torres (2008), 75.5% of the samples were negative for this microorganism. More than one third of our raw samples were positive (37.0%, 95% CI: 28.61–46.02%), with more than 100 cfu/g. In contrast, Torres (2008) reported that none of the samples had more than 100 cfu/g. The contamination rate in our cooked samples was similar to the figure we found in raw samples.

We tested all samples for the pathogenic microorganisms *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus*. In contrast to earlier studies, all our samples were negative for *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. For example, Herrera



Pearson chi-squared (3) = 9.8489 Pr = 0.020

FIG. 1. PERCENTAGE OF SAMPLES POSITIVE FOR *ESCHERICHIA COLI* ACCORDING TO MONTH OF SAMPLING
Percentage, positive samples. February, March, April, May, June.

Arias and Santos Buelga (2005) studied samples of fresh fish sold in Pamplona (northern Spain) and found that 12% (6 of their 50 samples (12%) were positive for *Salmonella* spp. This figure is similar to the prevalence of *Salmonella* of 12.25% found by Hatha and Lakshmanaperumalsamy (1997) in samples of fish from commercial fish vendors in southern India.

Only 1 of our 127 samples was positive for *V. parahaemolyticus*, which was isolated in a raw sample of striped venus clam. In contrast, Yi-Cheng and Chengchu (2007)

found that most of their sample of oysters was contaminated by more than 1,000 cfu/g of *V. parahaemolyticus*.

The difference in contamination rates between spring and summer samples was statistically significant. In February, 10% of the samples were positive (95% CI: 3.25–24.60%) whereas in June 42.86% of the samples were positive (95% CI: 25.03–62.57%; Fig. 1). We also found significant differences between bivalve species obtained at different times of the year, as shown in Fig. 2. Smooth clams were contaminated more frequently than the other three species. Other studies also reported seasonal and species-related differences in contamination rates. For example, Butt *et al.* (2004) found that most infections caused by mollusks were due to the consumption of raw oysters. Differences in contamination rates depending on the day of the week when we obtained the shellfish from retail vendors approached statistical significance, as shown in Fig. 3. Samples obtained on Mondays had the highest rates of contamination. Samples obtained on Mondays had the highest rates of contamination. We believe that the main part of the pollution on Mondays is produced probably by the fact that in the capital city of Granada (Spain), there is no fresh fish on Mondays. The fish that is sold on Mondays is the one that exceed from Saturdays.

ACKNOWLEDGMENT

We thank K. Shashok for translating the original manuscript into English.

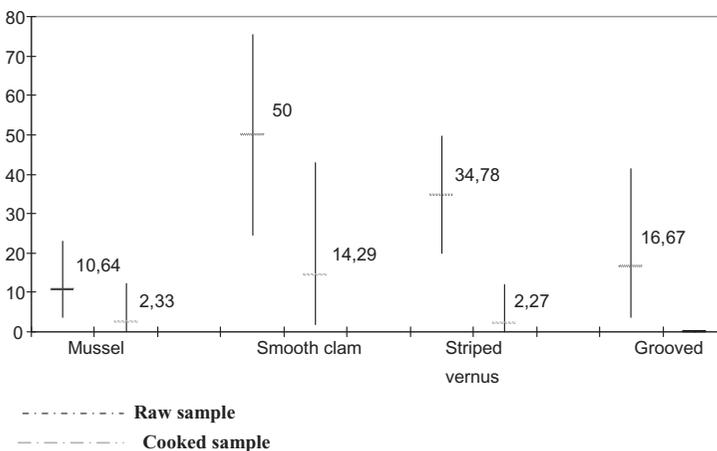


FIG. 2. PERCENTAGE OF SAMPLES POSITIVE FOR *ESCHERICHIA COLI* ACCORDING TO SPECIES

Raw samples, cooked samples. *Mytilus galloprovincialis*. *Callista chione*. *Chamelea gallina*. *Tapes decussates*.

Raw sample: Pearson chi-squared (3) = 13.4451 Pr = 0.004

Cooked sample: Pearson chi-squared (3) = 5.9881 Pr = 0.112

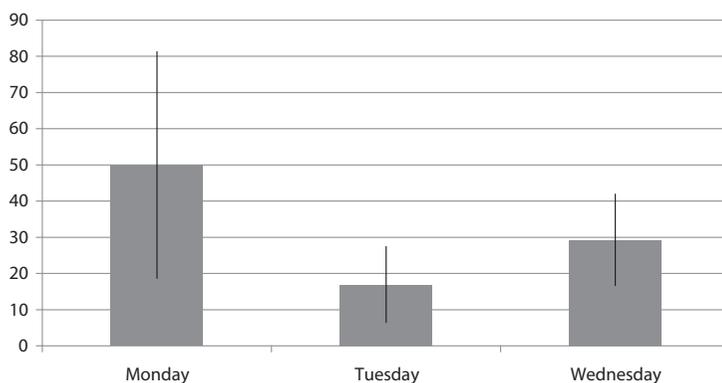


FIG. 3. PERCENTAGE OF SAMPLES POSITIVE FOR *ESCHERICHIA COLI* ACCORDING TO DAY OF THE WEEK

Percentage, positive samples. Monday, Tuesday, Wednesday.

Pearson chi-squared (2) = 5.9140 Pr = 0.052

REFERENCES

- BUTT, A.A., ALDRIDGE, K.E. and SANDERS, C.V. 2004. Infections related to the ingestion of seafood. Part I: Viral and bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* 4, 201–212.
- GARCÍA, G. and SÁNCHEZ, P. 1998. Riesgos sanitarios del pescado y marisco. I. Infecciones e intoxicaciones bacterianas. *Alimentaria* 35, 93–96.
- HATHA, M. and LAKSHMANAPERUMALSAMY, A.A. 1997. Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiol.* 14, 111–116.
- HERRERA ARIAS, F.C. and SANTOS BUELGA, J.A. 2005. Prevalencia de *Salmonella* spp en pescado fresco expandido en Pamplona. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Pamplona* 3, 34–42.
- MARTÍN ANDRES, A. and LUNA DEL CASTILLO, J. DE D. 2004. *Bioestadística Para Las Ciencias De La Salud. Bioestadística Para Las Ciencias De La Salud*, 5th Ed., pp. 332–396, Norma Capital, Madrid, Spain.
- MELNICK, J.L. 1984. Viruses in the water environment: A review. *Monogr. Virol.* 15, 1–16.
- NASSER, A.M., TCHORCH, Y. and FATTAL, B. 1993. Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Water Sci. Technol.* 27, 401–407.
- Real Decreto 571/1999, de 9 de abril, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria que fija las normas aplicables a la comercialización de moluscos bivalvos vivos. B.O.E. de 10 de abril de 1999, num. 86, pp. 13522–13531.
- Real Decreto 202/2000, de 11 de febrero, por el que se establecen las normas relativas a los manipuladores de alimentos. B.O.E. de 25 de febrero de 2000, núm. 48, pp. 8294–8297.
- Reglamento (CE) N°1441/2007 de la comisión de 5 de diciembre de 2007 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Madrid, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2007, num. 322, pp. 12–29.
- POTASMAN, I., PAZ, A. and ODEH, M. 2002. Infectious outbreaks associated with bivalve shellfish consumption: A worldwide perspective. *Clin. Infect. Dis.* 35, 921–928.
- SPSS Inc. 2005. Manual del usuario de SPSS Base 14.0. Editorial u Organism, Chicago.
- TORRES, M. 2008. Evaluación microbiológica y detección de enterotoxinas estafilococcicas en ensaladas de moluscos y vegetales. *Rev. Cient.* 6, 739–744.
- VILLALOBOS, L.B. and ELGUEZABAL, A. 2000. Detección de posible *Escherichia coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná (Venezuela). Universidad de Oriente, Cumaná, Escuela de Ciencias. Postgrado de Biología Aplicada. Instituto Universitario de Tecnología de Cumaná. Laboratorio Alimentos Humedad Intermedia 7, 17–23.
- WOOD, C.P. 1980. *Manual De Higiene De Los Mariscos*, 1st Ed., Acribia, Zaragoza, Spain. pp. 308–319.
- YI-CHENG, S. and CHENGCHU, L. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.* 24, 549–558.