

Estudio bacteriológico de sushi preparado y comercializado en San José, Costa Rica

Bacteriological study of prepared and commercialized sushi in San Jose, Costa Rica

Ana Patricia Madrigal¹, Ceverine López², María Laura Arias³, Pilar Salas⁴ y Carolina Chaves⁵.

1 Microbióloga. Caja Costarricense de Seguro Social. anne466@hotmail.com

2 Microbióloga. Laboratorio Clínico San Sebastián. San José C.R. ceve_lv@hotmail.com

3 Microbióloga. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica
maria.ariasechandi@ucr.ac.cr

4 Microbióloga. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica maria.salas@ucr.ac.cr

5 Microbióloga. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica
evelyn.chaves@ucr.ac.cr

Recibido: 14 diciembre 2012

Aprobado: 01 marzo 2013

RESUMEN

Objetivo: Conocer la calidad bacteriológica de muestras de sushi expendidas en diferentes restaurantes de la provincia de San José en Costa Rica.

Materiales y Método: Se analizaron 60 muestras de éste producto, a las cuales se les realizó mediante los procedimientos descritos en el Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos, los siguientes análisis: recuento total aerobio mesófilo, número más probable de coliformes termotolerantes, fecales y *E. coli*, recuento de *S. aureus* y número más probable de *B. cereus*. Adicionalmente se investigó la presencia de patógenos relacionados con el sushi como: *L. monocytogenes*, *Salmonella sp.* y *V. parahaemolyticus*.

Resultados: El 6 (46%) establecimientos presentaron positividad por *E. coli*, aunque en poca cantidad (1 a 10 NMP/g en promedio). Siete establecimientos (54%) mostraron presencia de *S. aureus*, la mayoría en el orden de 10² UFC/g. Adicionalmente, se logró aislar 2 cepas de *B. cereus* y 2 de *L. monocytogenes*. No fue posible establecer la presencia de *Salmonella sp.* ni *Vibrio parahaemolyticus* en ninguna de las muestras evaluadas.

Discusión: Según el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08, en su sección 17.1 el 62% (8) de los establecimientos incluidos en el estudio incumplen con la norma establecida para este tipo de alimento. Esta no conformidad se da en la mayoría de los casos por la presencia de cantidades de *S. aureus* superiores a las 100 UFC/g.

Palabras clave: Coliformes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* (fuente: DeCS/BIREME).

ABSTRACT

Objective: Knowing the bacteriological quality of samples issued at different sushi restaurants in the province of San José in Costa Rica.

Methods: Sixty sushi samples, acquired from different restaurants from the province of San José, Costa Rica were analyzed in order to determine their bacteriological quality. Methodology followed was that described in the Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food and included total aerobic plate count, *Staphylococcus aureus* plate count, Most Probable Number of total and fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *B. cereus*. Also, the presence of potential pathogens found in sushi including *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* and *Vibrio parahaemolyticus* was analyzed.

Results: That 6 (46%) of the restaurants were positive for *E. coli*, even though in small quantities (1 to 10 NMP/g average). *S. aureus* was isolated from seven restaurants (54%) also in small concentrations (10²CFU/g). In addition, two strains of *B. cereus* and two of *L. monocytogenes* were isolated. Neither *Salmonella sp.* nor *Vibrio parahaemolyticus* were isolated from the samples evaluated.

Discussion: According to the Central American Technical Regulation RTCA 67 04 50 08 sections 17.1 62% (8) of the restaurants included in this study do not comply with the regulations established for this kind of food. This non-conformity is due, mainly, to the presence of *S. aureus* in concentrations greater than 100 CFU/g.

Key words: Coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* (source: MeSH/ NLM).

El sushi, es un producto hecho a base de arroz cocido frío que se acidifica con vinagre y se cubre con pescado crudo o cocido. También puede formarse en un rollo de pescado, huevo, o verduras envuelto en algas (1). La inocuidad de este producto, depende en gran medida de la calidad microbiológica inicial de los componentes utilizados en su preparación, además de la aplicación de buenas prácticas higiénicas y de control del proceso, para asegurar que no se produzca contaminación durante su preparación. La falta de control sobre cualquiera de estos factores puede contribuir a un aumento en el riesgo de contaminación del producto final. Esta contaminación, puede ocasionar brotes importantes y es bien conocido que las enfermedades de transmisión alimentaria constituyen uno de los problemas de Salud Pública más frecuentes, reconociéndose cada vez más la importancia de sus repercusiones sobre la salud y la economía (2-4).

El pescado y otros alimentos marinos utilizados en la preparación del sushi, están sujetos a operaciones primarias de manipulación y procesamiento, que varían desde unas altamente sofisticadas hasta otras primitivas; de una higiene impecable a una suciedad que potencialmente representa un peligro. La frecuente descarga de desechos humanos en aguas de estuarios, proximidades de la costa, lagos y ríos y el aumento constante de las poblaciones de las ciudades, hace que la peligrosidad del consumo de la carne del pescado sea mayor, sobre todo si este se consume crudo o poco cocido (5).

Entre las bacterias que se involucran más frecuentemente con brotes de origen alimentario asociados a sushi se citan *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* (6).

El objetivo de esta investigación fue analizar la calidad bacteriológica de muestras de sushi expendidas en diferentes restaurantes de la provincia de San José en Costa Rica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 60 muestras de sushi obtenidas en 13 distintos restaurantes ubicados en la provincia de San José, Costa Rica. Se recolectaron muestras semanales en los diferentes establecimientos y cada muestra se transportó en frío al Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Universidad de Costa Rica. Los análisis practicados se realizaron dentro de las siguientes 24 horas.

Se aplicaron los procedimientos descritos en el

Compendio de Métodos para el Examen Microbiológico de Alimentos (7). Brevemente, se pesaron 25 g de la muestra, se añadieron 225 ml de agua peptonada estéril 0,1 % (APE) y se mezclaron con ayuda del homogenizador Stomacher®400 Circulator de la marca Seward. A partir de esta suspensión se prepararon diluciones decimales hasta 10⁻⁶ en tubos con 9 ml de APE.

Para el recuento total aerobio mesófilo se tomó 1 ml de dilución y se colocó en placas de Petri. Posteriormente se vertieron de 12 a 15 ml de agar estándar fundido al cual se le agregó 2,3,5-cloruro trifeníltetrazolium al 0,5 % (TTC). Los platos fueron incubados por 48h a 35 °C.

Se realizó también, la técnica de Número más probable (NMP) para la determinación de coliformes totales, termotolerantes y *E. coli*. Para ello se transfirió 1 ml de las diluciones mencionadas, a cada uno de 3 tubos de Caldo Lactosado Simple (CLS), se incubaron a 35 °C y luego de 48 h, se consideraron positivos los tubos que presentaban gas en la campana de Durham. Los tubos positivos fueron subcultivados a Caldo Bilis Verde Brillante (CBVB) y a Caldo *Escherichiacoli* (CEC). Se incubaron por 48 h a 35 °C y 24 h a 44,5 °C para la determinación de coliformes totales y coliformes termotolerantes respectivamente.

Los tubos incubados a 44,5 °C por 24 horas que resultaron positivos fueron repicados en caldo triptona y luego se confirmó la presencia de *E. coli* evaluando la producción de indol.

Para la determinación de *B. cereus*, se utilizó la técnica de NMP. Se inocularon series de tres tubos de Caldo tripticasa soya-polimixina con 1 ml de cada dilución. Estos tubos se incubaron a 35 °C por 48 h. Posteriormente se rayaron los tubos que mostraron turbidez en agar MYP (Yema de Huevo-Polimixina). Se consideraron colonias sospechosas las colonias rosadas que presentaron un precipitado a su alrededor. Con el fin de confirmar la identidad de las colonias se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: Gram, hidrólisis de gelatina, hidrólisis de almidón, movilidad, fermentación de glucosa y oxidasa.

Para la determinación de *S. aureus*, se emplearon placas de agar Baird Parker sobre las cuales se depositó asépticamente 0,1 mL de cada dilución, posteriormente se esparció el inóculo con un asa sobre toda la superficie del agar. Los platos así tratados se incubaron por 48 h a 35 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se seleccionaron las colonias que tuvieran morfología acorde con *S. aureus* y se les realizó Gram, catalasa, crecimiento en Manitol Sal y

coagulasa para su confirmación.

Para la determinación de *L. monocytogenes*, se pesaron 25 g del alimento y se añadieron 225 ml de caldo Listeria, luego se colocaron en una bolsa estéril y se homogenizaron utilizando el Stomacher® 400Circulator de la marca Seward. Se incubó por 48 h a 35 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se inoculó en caldo Frazier 0.1 ml del caldo Listeria y se incubó a 35 °C por 48 h. Los cultivos que presentaron oscurecimiento fueron rayados en placas de agar Oxford e incubados a 35 °C, por 24-48 h. Se procedió a confirmar las colonias sospechosas por *Listeria monocytogenes*, mediante las siguientes pruebas: Luz de Henry, Gram, catalasa, prueba Christie Atkins Munch Peterson (CAMP), movilidad a 25 °C y fermentación de glucosa, xilosa y ramnosa.

Para la determinación de *Salmonella sp.*, se pesaron 25 g de alimento en una bolsa y se agregaron 225 ml de Caldo Lactosado estéril, la mezcla se homogenizó en el Stomacher® 400 Circulator. Se procedió a incubar por 24 horas a 35 °C, posteriormente se transfirió 1 ml a un tubo con caldo Selenito Cistina y otro caldo Tetraciónato + Yodoyoduro. Ambos permanecieron en incubación durante 24 horas a 35 y 43 °C respectivamente. A partir de estos caldos se rayaron placas de agar Hektoen (HE) y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) los cuales se incubaron durante 24-48 horas a 35 °C.

Para la determinación *V. parahaemolyticus*, se inoculó 1 ml de las diluciones en tubos con 10 mL de Agua Peptonada+ 3 % de NaCl. Todos los tubos se incubaron 24 horas a 35 °C, se tomó una asada de cada tubo y se rayó en agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS). Las placas se incubaron a 35 °C por 24 h. Se evaluó la presencia de *V. parahaemolyticus* buscando colonias redondas, opacas, verdes o azuladas, de 2 a 3 mm de diámetro. A las colonias sospechosas se les realizó Gram, oxidasa, movilidad, ureasa y lisina descarboxilasa para su confirmación.

RESULTADOS

Se visitaron un total de 13 diferentes restaurantes ubicados en la provincia de San José y se obtuvieron un total de 60 muestras, los resultados promedio obtenidos a partir del recuento total, número más probable de coliformes, *E. coli* y recuento de *S. aureus* se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 1. Promedio de resultados del recuento total, NMP de coliformes totales, NMP de coliformes termotolerantes, NMP de *E. coli* y recuento de *S. aureus* de muestras de sushi

Código muestra	Recuento total aerobio mesófilo (UFC/g)	NMP coliformes totales (NMP/g)	NMP coliformes termo tolerantes (NMP/g)	NMP <i>E. coli</i> (NMP/g)	Recuento <i>S. aureus</i> (UFC/g)
A	8,1 x 10 ⁶	9,6 x 10 ³	5,5 x 10 ³	2,2	1,2 x 10 ⁴
B	5,6 x 10 ⁵	6,2 x 10 ¹	4	2,5	2,2 x 10 ²
C	3,1 x 10 ⁷	1,0 x 10 ²	1,2 x 10 ¹	<3	4,2 x 10 ²
D	3,0 x 10 ⁷	2,9 x 10 ³	3,7 x 10 ²	1	<100
E	1,0 x 10 ⁷	7,5 x 10 ²	1,1 x 10 ¹	4	<100
F	2,9 x 10 ⁷	1,6 x 10 ⁴	8,7 x 10 ³	10 x 10 ¹	5,5 x 10 ¹
G	4,4 x 10 ⁵	2,2 x 10 ³	2,0 x 10 ²	<3	<100
H	3,2 x 10 ⁶	4,5 x 10 ²	1,2 x 10 ¹	3	3,0 x 10 ¹
I	1,8 x 10 ⁶	1,7 x 10 ³	1,1 x 10 ²	<3	<100
J	1,7 x 10 ⁷	7,1 x 10 ²	3,8 x 10 ²	<3	<100
K	1,2 x 10 ⁵	7,5 x 10 ²	1,2 x 10 ¹	<3	6,7 x 10 ²
L	4,7 x 10 ⁴	5,3 x 10 ²	7	<3	1,7 x 10 ²
M	2,7 x 10 ⁵	8,9 x 10 ²	3,4 x 10 ¹	<3	<100

Fuente: Elaboración propia.

De los trece establecimientos en los cuales se obtuvieron muestras, 6 (46 %) presentaron positividad por *E. coli*, aunque en poca cantidad (1 a 10NMP/g en promedio). Siete establecimientos (54 %) mostraron presencia de *S. aureus*, la mayoría en el orden de 10² UFC/g. También fue posible aislar 2 cepas de *B. cereus* y 2 de *L. monocytogenes*. No fue posible establecer la presencia de *Salmonella sp.* ni *Vibrio parahaemolyticus* en ninguna de las muestras evaluadas.

DISCUSIÓN

Durante la investigación realizada se evidenció que en el 62 % de los restaurantes estudiados se ofrecía sushi con un recuento total aerobio mesófilo menor al orden de 10⁷ UFC/g. Estos datos resultan elevados si

se comparan con los hallazgos hechos por Atanassova y colaboradores quienes reportan que solamente en el 16 % del sushi analizado, los recuentos totales estuvieron en el orden de 10^7 . Otro estudio realizado en Hong Kong por la autoridad encargada de higiene y alimentación (http://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_haccp/files/ss_ras2_eng.pdf) determinó que el 11,1 % de muestras de sushi fueron insatisfactorias para el recuento total. De manera contrastante, la Autoridad de Alimentos Nueva Gales del Sur (NSW por sus siglas en inglés) reportó que sólo el 0,2 % de las muestras de sushi analizadas alcanzaron recuentos en el orden de 10^7 UFC/g (1).

Por otro lado, la presencia de *E. coli* en el alimento, permite inferir que existe una mayor probabilidad de encontrar algún microorganismo potencialmente patógeno de origen entérico (7). La positividad de *E. coli* en el sushi analizado (N= 60) fue de un 43 %. Este hallazgo es comparable con los resultados reportados por Atanassova y colaboradores (6) quienes encontraron 19,2 % de positividad por *E. coli* en sushi fresco comercializado en Alemania. De la misma manera, Millard y Rockliff, en su informe sobre calidad microbiológica del sushi (<http://health.act.gov.au/health-services/population-health/health-protection-service/food-survey-reports/food-survey-reports-2002-03/microbiological-quality-of-sushi>) reportan contaminación fecal en el 15 % de las muestras de su estudio, mientras que Autoridad de alimentos Nueva Gales del Sur reporta únicamente un 2,5 %. Adams y colaboradores tampoco logran detectar la presencia de *E. coli* en sushi de la zona de Seattle (8). Por lo tanto se puede observar que al comparar los resultados de este trabajo con los estudios realizados en Europa, Australia y Estados Unidos el porcentaje de muestras positivas por *E. coli* resulta alto.

Con respecto a los resultados obtenidos para el recuento de *S. aureus* (Tabla 1), siete restaurantes (54 %) resultaron positivos, no obstante, los recuentos obtenidos fueron más bajos que los reportados por Fang y colaboradores (9), quienes encontraron cantidades de 10^5 UFC/g en el 0,7% de las muestras de sushi provenientes de Taiwán. Atanassova y colaboradores encontraron este microorganismo en el 11,2 % de las muestras, de las cuales la mitad mostraron recuentos muy similares a los obtenidos en el presente trabajo (10^3 - 10^4 UFC/g). También la Autoridad de alimentos NSW notifica porcentajes de aislamiento para esta bacteria de 1,2 % cuando se analizaron muestras de sushi recolectadas en Australia.

Los bajos recuentos obtenidos durante la investigación

podrían explicarse tomando en cuenta que el arroz utilizado en la elaboración del sushi es previamente acidificado con vinagre en una concentración de ácido acético que oscila entre el 3 % y el 5 % y suele ir acompañado de otras sustancias como el ácido tartárico y el cítrico (10). Dependiendo de la concentración de los ácidos, el pH puede variar entre 2,0 y 3,5 acidez restrictiva para el crecimiento del *S. aureus* ya que éste puede crecer en un ámbito de pH que varía entre 4,2 y 9,3 (11).

Por otra parte, para *L. monocytogenes*, la literatura reporta porcentajes de positividad en sushi que van desde 2,4 hasta 12,7 % (6) lo cual concuerda con lo obtenido en esta investigación (3 % de positividad (N=60)). Los bajos niveles de positividad de este microorganismo en sushi aparentemente se deben al pH del producto ya que durante las primeras horas posterior a la preparación del rollo la acidez estimula el crecimiento de bacterias ácido tolerantes como las lácticas que pueden inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* (12). Sin embargo, conforme transcurre el tiempo y dependiendo de la temperatura de almacenamiento (4 °C), se estimula en *L. monocytogenes* la transcripción de factores sigma (13) que contribuyen a la tolerancia de esta bacteria al ácido. Dado lo anterior algunos investigadores (1) recomiendan no consumir sushi que haya sido almacenado por mucho tiempo a 4 °C o más.

En lo referente a *B. cereus*, se encontró que en dos muestras provenientes del mismo restaurante (3 % (N=60)) fue posible aislar e identificar presuntivamente este microorganismo, aunque en cantidades muy bajas (4 NMP/g). La dosis infectante de *B. cereus* es alta (10^5 - 10^8 UFC/g) (14); por lo tanto, como la cantidad encontrada en las muestras que resultaron positivas no alcanza estos valores, se infiere que este sushi no deja de ser apto para consumo; sin embargo se debe tener en cuenta que conforme aumente el tiempo entre la preparación y el consumo del alimento, podría aumentar la cantidad de la bacteria y por ende, la probabilidad de alcanzar su dosis infectante, produciendo cuadros de vómito y/o diarrea.

En otros estudios realizados en sushi, este microorganismo se ha encontrado en porcentajes que van desde el 0,4 % al 49,8 % de las muestras con recuentos elevados, comprendidos en los órdenes de 10^5 y 10^3 UFC/g, respectivamente según la Autoridad de alimentos NSW; también Fang y colaboradores (9) encontraron dicha bacteria en niveles potencialmente peligrosos, en el 1,8 % de las muestras.

Para concluir, al contrastar los resultados obtenidos con

lo indicado para este tipo de alimentos en la sección 17.1 del Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 (*E. coli*<3, recuento de *S. aureus* de 10 hasta 100 UFC/g y ausencia en 25 gramos de *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes*) el 62 % (6) de los establecimientos incluidos en el estudio incumplen con la norma establecida para este tipo de alimento. El incumplimiento se da en la mayoría de los casos por la presencia de cantidades de *S. aureus* superiores a las 100 UFC/g.

Con base en los resultados obtenidos se concluye que el sushi expendido en los establecimientos analizados, no representa un riesgo para la salud del consumidor, siempre y cuando se cumpla con las buenas prácticas higiénicas en la elaboración del producto y se respeten al máximo el tiempo y temperatura de almacenamiento recomendado para este tipo de alimento.

REFERENCIAS

1. Lorentzen, G., Wesmajervi Breiland, M., Cooper, M., Herland, H. Viability of *Listeria monocytogenes* in an experimental model of nigiri sushi of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and salmon (*Salmo salar*). Food Control 2012; 25:245-248.
2. Rodríguez, A., Guzmán, E., Escalona, A., y Otero, M. Peligros biológicos e inocuidad de alimentos. Revista electrónica de veterinaria REDVET 2005; 6(9).
3. Ávila G, Amador N, Reniery E., et al. Brote de gastroenteritis por *Salmonella enteritidis* entre trabajadores de maquila en Naco, Honduras. Rev. Med. Hond. 2004; 72(1):85-91.
4. Uribe C, Suárez M. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colomb Med 2006; 37(2):151-158.
5. Arias, M. L., Chaves, C., Antillón, F., y Villalobos, L. Microbiología de aguas y alimentos. Primera edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica 2008.
6. Atanassova, V., Reich, F. and Klein, G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. Journal of Food Protection 2008; 71(4):860-864.
7. Pouch, D. F. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4a ed. 2001. Estados Unidos: American Public Health Association.
8. Adams A, Leja L, Jinneman K, Beeh J, Yuen G, Wekell M. Anisakid Parasites, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in Sushi and Sashimi from Seattle Area Restaurants. Journal of Food Protection 1994; 57 (84):311-317.
9. Fang T, Wei Q, Liao C, Hung M, Wang T. Microbiological quality of 18 °C ready-to-eat food products sold in Taiwan. Int J Food Microbiol 2003; 80(3):241-50.
10. Diplock K. The potential of sushi rice to serve as a medium for bacterial growth. Environmental Health Review 2003; 1:109-116.
11. Seo, K, Bohach, G. Staphylococcal Food Poisoning. En Juneja, V. K, Sofos, J. N. Pathogens and Toxins in Foods. Washington, DC: American Society for Microbiology. 2010; 119-130.
12. Tomé, E., Gibbs, P. A., & Teixeira, P. C. Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. Int. J. Food. Microbiol. 2008; 121(3):285-294.
13. Ferreira, A., O'Byrne, C. P., & Boor, K. J. Role of σ_B in heat, ethanol, acid, and oxidative stress resistance and during carbon starvation in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67(10):4454-4457.
14. Rosas R. Contaminaciones alimentarias. Cuadros principales, tratamiento y prevención. Offarm 2007; 26 (6):95-100.