

***Escherichia coli* ENTEROPATOGENA EN MOLUSCOS CRUDOS Y COCIDOS**

Enteropathogenic *Escherichia coli* in Raw and Cooked Molluscs

Rosa Elena Martínez Nazaret y Luz Bettina Villalobos de Bastardo

*Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Escuela de Ciencias, Departamento de Biología, Cumaná, Venezuela.
E-mail: rosamnazaret@hotmail.com. Telf: 0293-4302270, 4332146.*

RESUMEN

El consumo de ostras crudas (*Pinctada imbricata*) y pepitonas (*Arca zebra*), representa un alimento tradicional en Cumaná, estado Sucre, Venezuela, y ellos son preparados sin control sanitario. Muestras de esos bivalvos para estudios bacteriológicos, fueron tomadas con el fin de determinar su condición sanitaria. Los coliformes fecales (CF) fueron determinados mediante el recuento en placa (COVENIN 1086-84) y la presencia de *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) de acuerdo a Hitchins y col. La serología de cepas sospechosas a ECEP se realizó por la técnica de aglutinación en lámina con antisueros polivalentes. Los ensayos mostraron los siguientes valores de CF: las ostras $1,2 \times 10^3 - 3,9 \times 10^7$ UFC/g y las pepitonas $1,2 \times 10^4 - 1,2 \times 10^8$ UFC/g. Fueron aisladas 80 cepas de *E. coli*, de las cuales un 67,5% fueron cepas comensales y un 32,5% aglutinable con los antisueros. La presencia de posibles *E. coli* enteropatógenas en ambas muestras, y el elevado conteo de coliformes, evidencia prácticas inadecuadas durante la preparación, venta al detal y consumo de los encurtidos.

Palabras clave: *E. coli* enteropatógena, coliformes, bivalvos.

ABSTRACT

The consumption of raw oysters (*Pinctada imbricata*) and hard clams (*Arca zebra*), represents a traditional food in Cumaná, Sucre state, Venezuela, and they are prepared without sanitary control. Samples of oysters and hard clams were taken for bacteriological studies, in order to determinate sanitary condition. Faecal coliforms (FC) (COVENIN 1086-84) and presence of enteropathogenic *E. coli* (ECEP) according Hitchins *et al.* were evaluated. Serology of suspicious strains was determined by agglutination with polyvalent antisera. The samples showed the following results: oysters $1.2 \times$

$10^3 - 3.9 \times 10^7$ UFC/g, clams $1.2 \times 10^4 - 1.2 \times 10^8$ CFU/g. Eighty strains of *E. coli* were isolated, being 67.5% comensal and 32.5% agglutinated with the used antisera. The presence of possible enteropathogenic *E. coli* in both samples and the high coliform counts evidences unadequate practices during the preparation; retail and consumption of the pickles.

Key words: Enteropathogenic *E. coli*, coliforms, bivalve.

INTRODUCCIÓN

Los moluscos bivalvos representan unos de los alimentos marinos de mayor consumo en el mundo. En Venezuela y en especial en el estado Sucre, la comercialización de este rubro alimenticio es hecho de forma industrial o tradicional, y se ubica entre unas de las principales actividades económicas del estado.

La capacidad de los moluscos bivalvos de concentrar y acumular materiales del ambiente, constituye un riesgo potencial para la salud el consumidor. Varios agentes etiológicos de enfermedades en humanos, pueden ser arrastrados dentro de los materiales que pueden ser acumulados por estos organismos [1].

Los coliformes fecales es un grupo particular que puede estar presente en el ambiente que rodea a los moluscos bivalvos. La utilización de estos microorganismos como indicadores de calidad microbiológica, ha sido una práctica establecida desde hace muchos años [2].

El grupo de los coliformes fecales está restringido a organismos que crecen en el tracto intestinal de animales de sangre caliente y humanos. Incluye a los miembros de tres géneros de la familia Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, y se pueden encontrar en productos marinos contaminados [3, 4].

El tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, está colonizado por *Escherichia coli* pero este microorganismo puede ser ingerido a partir de alimentos o agua contaminada

[5]. Se ha establecido que cepas resistentes de *E. coli* pueden persistir por muchos meses o años en el ambiente.

En la actualidad, se reconoce una sola especie en la cual hay varios cientos de tipos antigénicos, entre los que se destacan *Escherichia coli* del tipo enteropatógena, el cual representa una variedad patógena que se presenta fundamentalmente en lactantes y niños pequeños ocasionando gastroenteritis aguda, producida por determinados serotipos pertenecientes a 17 grupos O. Su mecanismo de patogenicidad no está relacionado con la producción de toxinas termolábiles o toxinas termoestables. Produce una lesión intestinal y es capaz de destruir las microvellosidades intestinales. La adherencia realizada sobre las células epiteliales es muy cerrada, de manera que al ser observadas dan la impresión de estar cubiertas por una "taza de bacterias". Este fenómeno es conocido como "Attaching-Effacing" (adhesión y borrado), y es mediado por una adhesina no fimbrial denominada intimina, una proteína de la membrana externa que media el estado final de adherencia, dando origen a modificaciones severas en la ultraestructura de las células epiteliales, con la producción de cuadros diarreicos que se manifiestan con la presencia de una diarrea acuosa que va desde simple a moderada, y puede ir acompañada con fiebre [4, 6]. La frecuencia y gravedad de las infecciones por *E. coli* enteropatógena han sido reportados desde 1960, en los países menos desarrollados. Del mismo modo, ha sido confirmada como el agente causal de la llamada diarrea de los viajeros en el Norte de África, México y Santiago de Chile [7].

En la actualidad los brotes por este patógeno son esporádicos, y por lo general su incidencia se hace presente en aquellos países donde las prácticas de saneamiento son mínimas, y por ende la contaminación a partir del consumo de agua y/o alimentos infectados directa o indirectamente (moscas o por las excretas de enfermos o portadores sanos), se ubican como los principales vehículos de transmisión de este patógeno [8].

Dado el riesgo asociado con el consumo de los moluscos bivalvos; se llevó a cabo la presente investigación para evaluar la calidad sanitaria de estos productos marinos de mayor consumo en el estado Sucre, utilizando el grupo de los coliformes fecales y *Escherichia coli* enteropatógena, como indicadores de contaminación fecal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y tratamiento de las muestras

Durante un período de seis meses, se obtuvieron 60 muestras de 200 g cada una de ostras (*Pinctada imbricata*) crudas y de pepitonas (*Arca zebra*) cocidas, a partir de los diferentes expendios ubicados en la Avenida Perimetral de Cumaná, estado Sucre, Venezuela. Una vez en el laboratorio de microbiología del Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, las muestras fueron tratadas según recomendacio-

nes del Compendio de Métodos para la Examinación Microbiológica de Alimentos [6].

Recuento de coliformes fecales

En la determinación cuantitativa de bacterias coliformes fecales en ostras crudas y pepitonas cocidas, se utilizó el método para recuento de bacterias coliformes fecales en placa de petri, según pautas de Vanderzant y col. [9].

Aislamiento de *E. coli*.

Para el aislamiento de *E. coli*, se trabajó con la metodología de Hitchins y col. [6], la cual involucra un enriquecimiento previo en caldo triptófano fosfato de doble concentración a 44°C, durante un período de 2 horas. Al cabo de las 2 horas, se procedió al aislamiento de *E. coli* a partir de siembras por estrías en superficies con réplica de placas con agar Levine (Merck) a una temperatura de 37°C, durante 24 horas. La identificación se realizó a través de pruebas bioquímicas convencionales [10] y confirmando la especie mediante el empleo de galerías ID 32E (BioMeriueX- Zuoz Pharma).

Serología

La caracterización serológica, se llevó a cabo mediante la técnica de la aglutinación en lámina con antisueros polivalentes elaborados por la Fundación Venezolana para el Estudio de la Salud Infantil (FUVESIN) [11]. Los antisueros utilizados estuvieron conformados por cuatro polivalentes con anticuerpos específicos para serogrupos enteropatógenos de *E. coli*. El polivalente I incluye los serogrupos (026; 055; 0111 y 0145); el polivalente II (086; 0119; 0127 y 088), el polivalente III, los serogrupos (0125; 0126 y 0128) y el polivalente IV, con los serogrupos (0114; 0142 y 0158).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de coliformes fecales

La distribución promedio de bacterias coliformes mostradas en la (FIG. 1), revelaron valores relativamente elevados para ambos productos, lo que permitió inferir que la presencia de posibles fuentes de cepas patógenas de *E. coli*, estaban presentes. En las ostras los valores oscilaron entre $1,2 \times 10^3$ a $3,9 \times 10^7$ UFC/g de bacterias coliformes fecales, a diferencia de las pepitonas cuyos valores presentaron $1,2 \times 10^4$ a $1,2 \times 10^8$ coliformes/g, siendo éstos los valores más altos hallados en ambos productos. Según el máximo permitido por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos [12] cuyo valor es < 23 UFC/g de bacterias coliformes fecales para moluscos bivalvos, ambos productos estuvieron por encima de este valor, en especial las muestras de pepitonas, las cuales luego de ser sometidas a un tratamiento previo de cocción, no debieron presentar flora natural sensible al calor. Estos resultados sugieren que, además de tomar en cuenta los

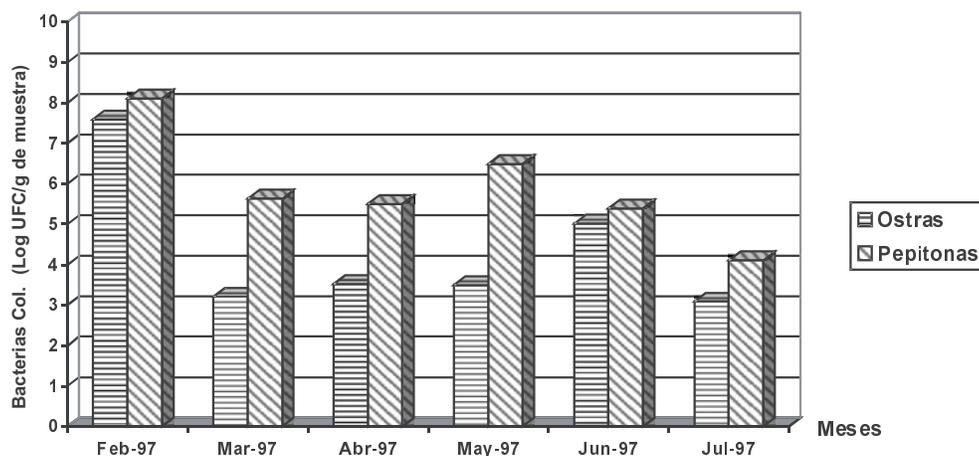


FIGURA 1. ÍNDICE DE BACTERIAS COLIFORMES FECALES PRESENTES EN MUESTRAS DE PEPITONAS COCIDAS Y OSTRAS CRUDAS PROVENIENTES DE EXPENDIOS UBICADOS EN LA AVENIDA PERIMETRAL DE LA CIUDAD DE CUMANÁ.

mecanismos de filtración y acumulación bacteriana, los cuales permiten que la flora microbiana de los bivalvos guarden una relación directa con el tipo y número de microorganismos presentes en el agua [13] también es cierto que la posibilidad de un proceso de recontaminación y proliferación de microorganismos se efectúa, primordialmente en las pepitotas, en las cuales la población de coliformes fecales se expandió rápidamente, posterior al proceso de cocción, y produjo en corto tiempo, una gran masa de microorganismos, hecho evidente en el análisis microbiológico de este producto marino.

Detección de *E. coli* enteropatógena

El interés en la detección de *E. coli* patógena no se ha limitado a muestras clínicas. La detección directa en muestras de alimentos cárnicos cocidos y pocos cocidos, leche cruda, frutas, ensaladas de vegetales, mayonesa, etc., han estimulado las investigaciones dirigidas a establecer los posibles alimentos que puedan servir como vehículos de cepas patógenas de *E. coli* [14, 15, 16].

La detección tradicional de *E. coli* enteropatógena, se realizó utilizando antisueros mono o polivalentes o evidenciando el efecto citopático en cultivos celulares. La eficacia de la serología como herramienta de diagnóstico versus las pruebas de líneas celulares, ha sido discutida por varios autores, los cuales enfatizan que este método es un excelente marcador epidemiológico que permite la reproducibilidad de los resultados [16, 17].

La recuperación de las posibles cepas enteropatógenas de *E. coli* a partir de ostras y pepitonas analizadas, reflejaron un porcentaje de cepas positivas para la prueba de aglutinación en lámina. De un total de 80 cepas de *E. coli*, un 67,5% fueron identificadas serológicamente como cepas comensales y un 32,5% como cepas enteropatógenas. Del 32,5%, un 15%

de las cepas fueron recuperadas de las ostras y un 17,5% de las pepitonas cocidas (FIG. 2). En las ostras se encontró un mayor predominio de cepas positivas a los polivalentes I y II, frecuencias que coinciden con las reportadas por otros autores [18]. En las pepitonas, hubo un mayor predominio de cepas positivas a los polivalentes I y III. (FIG. 3).

Se destaca el hecho de que en las pepitonas, el porcentaje de cepas positivas enteropatógenas fueron superiores a las halladas en las ostras crudas, lo que permite inferir que la manipulación tal como se realiza en cada uno de los expendios: sin agua potable, sin sistemas de refrigeración, falta de higiene por parte del vendedor, así como los utensilios; están afectando negativamente en la calidad de cada uno de los cocteles que son preparados a partir de estos productos marinos, aumentando de manera significativa la probabilidad de que otros microorganismos de origen fecal, incluyendo patógenos, puedan estar presentes, convirtiéndose el consumo de estos alimentos, en fuentes potenciales de brotes alimentarios.

CONCLUSIONES

Las ostras y pepitonas, están siendo comercializadas con niveles de coliformes fecales por encima de los límites establecidos para moluscos bivalvos.

Cepas comensales inocuas y enteropatógenas de *E. coli* se aislaron en ambos productos, lo que indica una contaminación de origen fecal.

Las pepitonas previamente cocidas presentaron el mayor porcentaje de cepas positivas de *E. coli* enteropatógena, indicando una contaminación posterior por inadecuada manipulación del producto, después del proceso de cocción.

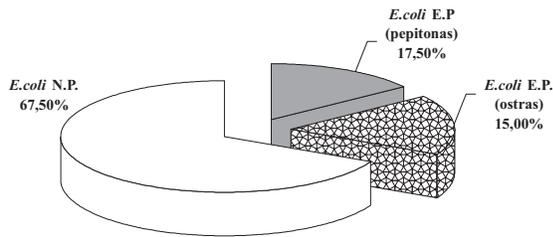


FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE *E. coli* NO PATOGENA Y ENTEROPATOGENA EN PEPITONAS COCIDAS Y OSTRAS CRUDAS PROCEDENTES DE EXPENDIOS UBICADOS EN LA AVENIDA PERIMETRAL DE LA CIUDAD DE CUMANÁ.

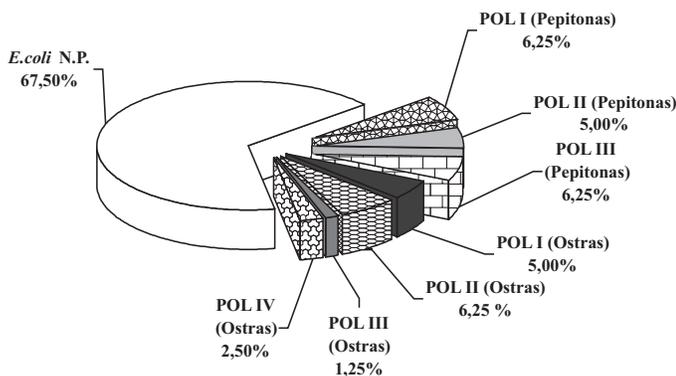


FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN PORCENTUAL DE LOS POLIVALENTES HALLADOS EN PEPITONAS COCIDAS Y OSTRAS CRUDAS PROCEDENTES DE EXPENDIOS UBICADOS EN LA AVENIDA PERIMETRAL DE LA CIUDAD DE CUMANÁ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] VILLALOBOS, L.B.; ELQUEZABAL, L. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. **Act. Cient. Venezolana**. 52: 55-61. 2001.

[2] MOSSEL, D.A.; MORENO, G. **Microbiología de Alimentos**. Editorial Acibria. Zaragoza, España. 135 pp. 1985.

[3] KUEH, C.; CHAN, K.Y. Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. **J. Appl. Bacteriol.** 59: 41-47. 1985.

[4] FRAMPTON, E.W.; RESTAINO, L. Methods for *Escherichia coli* identification in foods, water and clinical samples based on Beta-glucuronidasa detection. **J. Appl. Bacteriol.** 74: 223-233. 1993.

[5] QUEVEDO, F.; GONZALEZ, A. Enfermedades transmitidas por alimentos. Impacto socioeconómico. **La aliment. Latin**. 203: 52-60. 1994.

[6] HITCHINS, D.A.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C. Coliforms – *Escherichia coli* and its toxins. En: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, 3ª Ed. Editorial Commultex, U.S.A. 325-369 pp. 1992.

[7] LEVINE, C.; FERRECIO, V.; PARDO, M.; CAYAZZO, P.; ABREGO, J.; MARTÍNEZ, L.; MAGGI, M.; BALDINI, W.; MANEWAL, D.; KAY, B.; GUERS, L.; LIOR, H.; WASSWMAN, S.; NATARO, J. Epidemiologic studies of *Escherichia coli*, diarrheal infections in a low socioeconomic level periurban community in Santiago of Chile. **Am. J. Epidemiol.** 138 (10): 849-869. 1993.

[8] BLANCO V, R.T. **Prontuario Microbiológico**. 2ª Ed. Disinlimed, C.A. Hospital Universitario, Caracas, Venezuela. 385 pp. 1990.

[9] VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association, 3ª Ed. Editorial Commultex, U.S.A. 24: 325-351. 1992.

[10] MACFADDIN, J. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica**. Editorial Panamericana, Buenos Aires. 301 pp. 1980.

[11] FUNDACIÓN VENEZOLANA PARA EL ESTUDIO DE LA SALUD INFANTIL (FUVESIN). Técnica de aglutinación en lámina para el diagnóstico de *E. coli* enteropatógena. Instituto de Biomedicina. Caracas – Venezuela. 5pp. 1993.

[12] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (F.D.A). **Sanitation of shellfish growing areas**. National shellfish sanitation program. Manual of operations. Part. I. U.S. Dept. of health and human services. Washington, D.C. U.S.A. 1990.

[13] HUNT, D.A.; MIESCIER, D.A.; REDMAN, J.; SALINGER, A.; LUCAS, J. P. Molluscan shellfish fresh or frozen oyster, mussels or clams. En: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Marvin L. Speck (ed). American Public Health Association. Washington, D.C. USA. 325-369. 1992.

[14] OLSVICK, O.; WASTESON, Y.; LUND, A.; HARNES, E. Pathogenic *Escherichia coli* found in food. **J. Food. Microbiol.** 12: 103-114. 1991.

[15] ZHAO, T.; DOYLE, P.; SHERE, J.; GARBER, I. Prevalence enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herd. **Appl. Environ. Microbiol.** 61 (4): 1290-1312. 1995.

- [16] NORAZAH, A.; RAHIZAN, I.; ZAINULDIN, T.; ROHANI, M.; KAMEL, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli* in raw and cooked food. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.** 29 (1): 91-93. 1998.
- [17] DIAZ, C.; GONZALEZ, R.; CLORART, D.; PEREZ, S. *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP) serología vs. Adherencia localizada. Valor Diagnóstico. **Seminario In-ternacional sobre Enfermedades Diarreicas.** Proyecto para el Control de Enfermedades diarreicas. Quito. Ecuador, del 25 al 27 de noviembre. 32 pp. 1994.
- [18] VILLALOBOS, L.B.; ELQUEZABAL, L. Detección de posible *Escherichia coli* enteropatógena en el bivalvo *Pinctada imbricata* comercializado en Cumaná, Venezuela. **Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela.** 39(1y2):17-23. 2000.