

**Detección de *Escherichia Coli***  
**En cárnicos y lácteos en puntos de venta artesanales**  
**Mediante el uso de métodos rápidos.**

R. Aldana P.

*Licenciatura en biotecnología*  
*Universidad interserrana del estado de Puebla Ahuacatlan.*  
*Ahuacatlan Puebla México.*

**Resumen:**

La especie *Escherichia Coli* es considerada generalmente como integrante de la flora del intestino es uno de los géneros que integra el grupo coliforme, y se divide en muchos biotipos (W. C. Frazier y D.C. Westhoff 1993) produciendo en muchas ocasiones efectos patógenos de gravedad (Granados P. y Villaverde P. 1997) causados principalmente por la toxina Shiga (Marzocca M. A. *et al* 2006). El presente trabajo se realiza con el objetivo de señalar los métodos rápidos para la identificación de *Escherichia Coli*; así como las medidas preventivas para evitar el contagio ocasionado por la toxina que contiene esta bacteria. Analizando cárnicos y productos lácteos en productos de venta artesanales en la sierra Norte de Puebla.

**1. Generalidades de *Escherichia Coli*.**

La especie *Escherichia Coli* es considerada generalmente como integrante de la flora del intestino es uno de los géneros que integra el grupo coliforme, y se divide en

muchos biotipos (W. C. Frazier y D.C. Westhoff 1993) filogenéticamente es un grupo relativamente homogéneo dentro del grupo gama de las proteobacterias y se caracteriza por: bacilos Gram negativos no esporulados, inmóviles, o móviles, por flagelación *peritrica* (Madigan M. T. *et al* 1999); son Enterobacterias que corresponden a la familia de bacilos o cocobacilos aerobios o anaerobios facultativos (Granados P. y Villaverde P. 1997).

**1.1 Ciclos Biológicos.**

Las bacterias son microorganismos unicelulares muy pequeños constituidos por elementos obligados (indispensables para la vida de la bacteria como la pared celular, membrana plasmática, citoplasma, ribosomas y la región nuclear) y elementos facultativos los cuales pueden o no estar en la bacteria (capsula, flagelos, pelos, endosporas e inclusiones citoplasmicas) (Madigan M. t. *et al* 1999). En cuanto a las enterobacterias se caracterizan por ser fermentadoras de glucosa, suelen ser huéspedes habituales del tracto intestinal produciendo en

muchas ocasiones efectos patógenos de gravedad (Granados P. y Villaverde P. 1997).

## 1.2 Ecología.

Los miembros correspondientes a este género son habitantes casi universales del tracto intestinal de humanos y animales (Madigan M. t. *et al* 1999), desempeñan en el caso de las bacterias inocuas ayudan en la síntesis de vitaminas. En el caso de las entero patógenas productoras de la toxina shiga son causantes asociadas de enfermedades transmitidas por alimentos (Marzocca M. A. *et al* 2006).

## 1.3 Patología.

Como se menciono con anterioridad existen distintas clases de *E. Coli* algunos son inocuos y otros enteropatógenos (Franco U. lima *et al* 2001) en 1993 se detecto el primer brote en estados Unidos el cual Provocó 700 enfermos y 4 muertos; causando pérdidas millonarias esto a consecuencia del consumo de hamburguesas poco cosidas que contenían una variedad de *E. Coli* (0157:H7) (Silvia M. 2003). En este mismo país se ha estado estimando que las infecciones por esta bacteria suman 20mil casos de enfermos y 250 muertes anuales, las infección se deben principalmente por el consumo de carne y derivados de la industria láctea no pasteurizada (M.L. Roldan *et al* 2007) E. Martínez señala que los bivalvos representan uno de los alimentos de mayor consumo en el mundo estos son capaces de acumular materiales del ambiente y por esta razón constituye

un riesgo para la salud (E. Martínez 2005).

La expresión de enfermedades a consecuencia de *E. Coli* puede ser leve o severa y se presenta regularmente a los 8 días del ingreso de la bacteria siendo los niños el grupo más vulnerable. La toxina de esta bacteria causa diarreas acuosas o casualmente con sangre, dolores abdominales, nauseas, vomito y en ocasiones fiebre (S. Michanie 2003).

Con el objetivo de señalar los métodos rápidos para la identificación de *Escherichia Coli*; así como la medidas preventivas para evitar el contagio por dicha bacteria en la sierra Norte de Puebla analizando Carne y lácticos en puntos de venta artesanales en dicha zona.

## 2. Materiales :

- Pipetas estériles de 1ml con algodón graso no absorbente.
- Tubos de ensayo.
- Tapones de corcho estériles
- Placas petri de 10 cm de diámetro
- Caldo de bilis y verde brillante.
- Bolsas estériles para homogeneización.
- Asas de siembra.
- Balanza de precisión.
- Estufa a 37°C.
- Agua de peptona tamponada (BPW) estéril.
- Stomacher.
- Kit de APIS.
- Kit Simplate.

## 3. Metodología:

### 3.1. Elaboración de medio de cultivo.

Para la identificación de *Escherichia Coli* se recomienda usar caldo de bilis y verde Brillante (R.Granados y C. Villaverde 2002) este medio se es indicado para la investigación de coliformes en la leche y otros alimentos la presencia de este microorganismo como se menciona anteriormente se debe al mal funcionamiento de algún proceso, tras su inoculación e incubación a 37°C deberá permanecer en estufa de cultivo al menos 24 horas.

El método utilizado para elaborar este medio de cultivo corresponde a las especificaciones del proveedor de igual manera si se prefiere existen en el mercado cajas petris con el medio de cultivo Caldo de bilis y verde brillante.

La eficiencia de este medio de cultivo para detectar coliformes se debe a que el caldo de bilis y verde brillante inhibe el crecimiento de Gram + y muchas Gram-. La aparición de gas en el medio antes de 48 horas indica que ha fermentado la lactosa y, por tanto, la presencia de coliformes.

### **3.2 toma de muestras.**

Colocar en bolsas estériles la muestra del alimento (carne o leche) la toma de muestra debe realizarse en condiciones asépticas utilizando cubiertos y bolsas estériles especiales para homogeneizador esterilizadas (C. Gamazo *et al* 2005) y se le coloca

una etiqueta que contenga el nombre de la muestra, lugar en donde se tomo, la fecha y hora de recolección; así como el nombre de la persona que tomo la muestra, esto con el objetivo de poder aislar e identificar si existe riesgo en la producción.

Posteriormente las muestras se llevan al laboratorio para la siembra. En esta etapa deben llevarse las muestras en una hielera con una temperatura menor a los 4°C para evitar el posible desarrollo de otros microorganismos.

### **3.3 Preparación de soluciones y siembra.**

Este proceso debe realizarse en condiciones de asepsia y utilizando material y equipo de laboratorio esterilizado a mas de 120° C en autoclave durante 25 minutos (W. C. Frazier y D.C. Westhoff 1993). En la mesa de trabajo deben colocarse tres mecheros formando un triangulo para tener un campo estéril en este campo se deben realizar todos los procesos.

### **3.4 Homogeneizado.**

Se puede utilizar un homogeneizador comercial de paletas para que la distribución de microorganismos en el medio sea homogénea. En este punto de la muestra tomada se pesan 10 g y se añaden 90 ml de caldo de peptona estéril. El triturado de la

muestra debe ser por al menos 2 minutos (C. Gamazo *et al* 2005).

#### **3.4.1 preparación de la solución**

Salina al 85%. El método de empleado es el de disoluciones decimales seriadas con posterior siembra del inóculo de cada dilución en los medios de cultivo:

#### **3.4.2 Disoluciones**

Colocar en los tubos de ensayo 9ml de agua peptona da y enumerar los tubos; posteriormente colocar en el tubo de ensayo 1 un mililitro de la muestra, luego entonces tomar un mililitro de la muestra 1 y colocarlo en el tubo 2; después tomar un mililitro del tubo 2 en el tubo 3 tal como lo muestra la imagen (...), cada dilución debe realizarse con pipetas diferentes y estériles. Tantas como se quieran, sembrándose en el medio las de las últimas diluciones.

#### **3.5 Siembra.**

Técnicas de los cuatro cuadrantes. Con un marcador se marca en el reverso de la caja petri (con el medio de cultivo previamente elaborado) se dibujan dos líneas perpendiculares de tal forma que queden cuatro cuadrantes iguales. Posteriormente tomar el asa estéril una cantidad de inóculo de los tubos de ensayo del paso anterior y se adicionara en uno de los extremos de los cuadrantes extendiéndose en forma de zigzag

se realiza la misma operación en los demás cuadrantes sin flamear se tapa la caja petri y se incuba a 37°C en estufa de cultivo al menos 24 horas para la lectura de los resultados.

### **4. Otros métodos rápidos para la identificación de *Escherichia Coli*.**

#### **4.1. Uso de Las APIS:**

Para conocer si *E. Coli* se encuentra en el medio se recomienda realizar la prueba del sistema en tiras (API) estas pruebas se comercializan en Kits (R. Granados, C. Villaverde 2002); los medios deshidratados se encuentran contenidos en microtubos mediante una suspensión bacteriana y luego se cultivan Mas tarde se incuban y en este proceso de metabolismo del microorganismo genera cambios en el medio de cultivo que se aprecia con un cambio de color de este o al añadir reactivos (Madigan M. t. *et al* 1999). Estos cambios se interpretan mediante tablas de lectura o mediante ordenadores. Después de la utilización de este método el kit debe destruirse o incinerarse.

#### **4.2 Método Simplate.**

Simplate. Es un sistema de reactivos basados en reacciones de Oxido-Reducción y/o enzimas múltiples para detectar, cuantificar y analizar los microorganismos objetivos en poco tiempo. Interpretándose solamente con

cambios de colores o fluorescencia.

Los 4 formatos existentes son:

- Cuenta total de mezofilos
- Coliformes totales y *E.coli*.
- Hongos y levaduras.
- *Campylobacter*

#### 4.2.1 Forma de uso.

Mezclar la muestra y el medio de cultivo y colocar en el dispositivo Simplate, posteriormente distribuir el medio e incubar por 24 horas. Por último se lee el resultado con base a lo establecido por las tablas que contenga el kit del proveedor. Las ventajas de este método es que ayuda en la identificación de hongos y bacterias indicadoras de contaminación en poco tiempo además de que su uso no requiere de gran equipo de laboratorio (biblio).

#### 4.3 Agar Flurocult.

Para determinar si se encuentra contaminación por *Escherichia Coli* 0157:H7 se recomienda ocupar el método Agar Flurocult para *E. Coli* 0157:H7 (Franco U. lima *et al* 2001)

### 5 Conclusiones.

La presencia de organismos indicadores como *E. Coli* es signo de que no se están tomando las

medidas higiénicas en algún proceso (Madigan M. t. *et al* 1999), lo cual causa enfermedades severas en la población consumidora (Franco U. lima *et al* 2001) por esta razón se mencionan las medidas que ayudan a prevenir y controlar la presencia de microorganismos con toxinas que afectan a los consumidores, entre las medidas se recomienda el uso de equipos limpios y buenas prácticas higiénicas que prevengan la contaminación así como el aumento de la pasteurización y buena cocción de los alimentos, ya que por ser una enterobacteria a altas temperaturas se elimina (Silvia M. 2003).

#### Literatura citada

1. C. Gamazo, I. López, R. Díaz, 2005 Manual práctico de Microbiología, Ed. Elsevier Doyma, Barcelona España, 231 pág.
2. Franco u.; lima; Vargas P.; Ximena; Mendoza L.; Alberto; Bayona R.; Martin; Plaza; Ada. 2001, determinación de *Escherichia Coli* 0157:H7 a partir de productos Cárnicos y Lácteos artesanales Empleando dos Sistemas de Aislamiento. Universitas scientarum, vol. 6, núm. 1, enero- Junio, 2001, Pontificia, Universidad Javeriana, Colombia.
3. Madigan M. T.; Martinko J.M.; Parker J. 1999, Brok Biología

- de los Microorganismos, octava edición, Prentice Hall Iberia, Madrid, 986 páginas.
4. Marzocca M. A.; Marucci P. L.; Sica M.G.; Álvarez E.E. 2006, detección de *Escherichia Coli* 0157: H7 en carne Picada Fresca y Hamburguesas congeladas, Rev Argentina de microbiología, Vol. 38, Núm. 1, Marzo 2006, pp. 38-40, Buenos Aires Argentina.
  5. R. Granados P. y M. C. Villaverde P. 2002, Microbiología tomo 2, Thompson, Madrid España, 365 páginas.
  6. R. Granados P. y M. C. Villaverde P. 1997, Microbiología tomo 1, Thomson, Madrid España, 323 páginas.
  7. R.E. Martínez N. L.B. Villalobos B 2005, *Escherichia Coli* enteropatógena en moluscos crudos y cosidos, Rev Científica, Abril, año-Vol. XV, numero 002, Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela, pp. 163-167.
  8. Roldan, M. L. Chinen, I.; Otero J. Li Miliwebski. E. S.; Alfaro N.; Burns P.; Rivas M. 2007, Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia Coli* 0157:H7 a partir de productos Cárnicos y leche, Rev Argentina de Microbiología Vol. 39, Núm. 2, Junio 2007, pp. 113-119, buenos Aires Argentina.
  9. Silvia Michanie 2003, La Bacteria que dispara el HACCP en la industria de la Carne, Énfasis Alimentos, Año 1, núm. 3, Julio-Agosto, consultora de Empresas en seguridad sanitaria de los alimentos.
  10. W. C. Frazier; D. C. Westloff 1993 microbiología de los Alimentos, Ed. Acribia Zaragoza España, 681 páginas.