

# Cuantificación de bacterias coliformes y aislamientos de salmonella en ostiones crudos colectados en un mercado de mariscos

Irma Rosas Pérez, Alma Yela Miranda, Gladys Meza Meneses, Jorge Pérez Martínez,  
A. Leticia Romo García, Yolanda Almanza Márquez  
Facultad de Medicina, UNAM

## Resumen

Se analizaron 31 muestras de ostión desconchado, provenientes de un mercado de mariscos en México, D.F., con el fin de conocer la concentración de bacterias indicadoras de contaminación fecal (siguiendo el método descrito por las APHA<sup>12</sup>), y la frecuencia de aislamiento de *Salmonella* spp. (aplicándose las técnicas descritas por Andrews *et al.*<sup>3</sup> incubando además a 41° C). En la mayoría de las muestras se registraron altos niveles de bacterias asociadas a contaminación fecal (10<sup>4</sup> CT y CF). Sin embargo sólo se obtuvieron 6 aislamientos de *Salmonella*, tres correspondientes a *S. javiana*, y dos más que no se serotipificaron.

Los resultados obtenidos concuerdan con los encontrados por otros autores con respecto a la relación existente entre la alta concentración de coliformes fecales y la presencia de *Salmonella* spp. Se discute también el posible riesgo que implica consumir ostiones crudos.

## Summary

31 Shucked oyster samples from a Mexican seafood market were analyzed to know the concentration of bacteria indicating the presence of fecal pollution (using the method described by the APHA<sup>12</sup>) as well as the frequency of *Salmonella* spp (applying the technique described by Andrews *et al.*<sup>3</sup> but incubated at 41° C). Most of the samples recorded high bacterial count associated to fecal pollution (10<sup>4</sup> TC and FC). However only six insolation of *Salmonella* were obtained, three corresponding to *S. javiana*, one to *S. newport*, and the remaining isolations were not serotyped. The results are in agreement with those found by other authors reading the correlation between the high counts of fecal coliform and the presence of *Salmonella*. The possible risk implied in eating raw oysters is also discussed.

## Introducción.

Estudios realizados en diferentes partes del mundo señalan a *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* como importantes patógenos responsables de casos de diarrea y otras enfermedades gastrointestinales<sup>7 19</sup>, principalmente en países en vías de desarrollo y en ciertas áreas caracterizadas por el manejo del agua y el alimento sin medidas de higiene efectivas<sup>10 16</sup>. La recuperación de *Salmonella* en alimentos contaminados se dificulta por la gran cantidad de bacterias asociadas<sup>21</sup>, lo que ha creado la necesidad de optimizar diversas técnicas que aseguren su aislamiento. Por otra parte, se ha considerado que la calidad bacteriológica del agua y de algunos alimentos puede basarse en la determinación rutinaria del grupo de bacterias coliformes, en especial las coliformes fecales, las cuales han sido identificadas como indicadoras (con alto porcentaje de probabilidad) de la presencia de bacte-

rias patógenas asociadas con contaminación fecal<sup>8 27</sup>.

Un recurso alimenticio que ha ocupado la atención en problemas referentes a salud pública ha sido el ostrícola, debido a que en su hábitat y durante su manejo y transporte se degrada la calidad bacteriológica<sup>3 18</sup>. Su consumo en forma cruda ha ocasionado problemas gastrointestinales en diferentes partes del mundo (Italia, Francia, Estados Unidos y Japón<sup>4 12 26</sup>). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el contenido de bacterias indicadoras de contaminación fecal y la presencia de *Salmonella* en muestras de ostión envasado, provenientes del mercado de la Viga del Distrito Federal.

## Material y métodos

### Muestreo.

Se realizaron 31 muestreos en 5 locales (en donde se desconchaba y se envasaba el ostión) del mercado de La

Viga, distribuidor de productos pesqueros en el D.F., de agosto de 1984 a enero de 1985. En cada muestreo se escogió aleatoriamente un local, en el cual se obtuvieron 500 g de ostión desconchado y envasado (frascos con 100 ó 200 g). Se realizó el estudio en este mercado debido a que existía el antecedente del mal manejo del ostión durante su desconchado<sup>18</sup>.

#### Procesamiento de las muestras.

Se determinó la presencia de coliformes totales (CT), fecales (CF) y estreptococos fecales (EF), para lo cual se emplearon 100 g de ostión, procesados de acuerdo con las especificaciones establecidas por la APHA<sup>1</sup>. Se destinaron 400 g de ostión para el aislamiento de *Salmonella* spp. Como medios de enriquecimiento se usaron el caldo selenito y el caldo tetrionato. Se siguió la metodología establecida por Andrews et al.<sup>3</sup> incubando además a 41°C. Los 400 g de ostión fueron divididos en 4 porciones de 100 g cada una, posteriormente homogeneizadas por separado en una licuadora durante 2 min con 150 ml de caldo selenito o tetrionato al que se le adicionó 10 mg de colorante verde brillante por cada litro de medio. Este homogeneizado fue vertido a los matraces que contenían 750 ml de cada medio de enriquecimiento y se incubaron a 35°C y 41°C (baño María) por períodos de 24 y 48 hrs.

#### Métodos de identificación.

Las bacterias coliformes totales, fecales y estreptococos fecales fueron identificadas mediante las técnicas de tubos múltiples de fermentación o número más probable (NMP) especificado por la APHA<sup>1</sup>. La identificación de *Salmonella* se realizó a partir de los caldos de enriquecimiento, después de 24 y 48 hrs. de incubación, se hicieron resiembras por medio de estrías en agar verde brillante (VB), agar bismuto sulfito (BS) y agar *Salmonella Shigella* (SS), por triplicado. Las cajas fueron examinadas después de 24 y 48 hrs de incubación a 37°C, dependiendo del desarrollo de las colonias. El aislamiento e identificación de *Salmonella* fue realizado siguiendo las especificaciones de Hang et al<sup>9</sup>, Lenette et al<sup>11</sup> y Cowan<sup>5</sup>, de tal forma que las colonias sospechosas de *Salmonella* fueron reaisladas en el mismo medio del que provenían e inoculadas en TSI (agar de hierro y triple azúcar) y LIA (agar de hierro y lisina), las colonias que dieron reacciones características se sometieron a las pruebas bioquímicas correspondientes para su identificación.

La tipificación serológica fue realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y en el Instituto de

#### Enfermedades Tropicales de la SS.

#### Resultados y discusión.

En el cuadro I puede observarse que las muestras analizadas presentaron altos niveles de bacterias indicadoras de contaminación fecal ( $>100,000$  CT/100 g;  $>1,000$  CF/100 g y  $>1,000$  EF/100 g). Encontrándose que los aislamientos de *Salmonella* fueron realizados en cocientes/ $>4$  que resultan de dividir las coliformes fecales entre los estreptococos fecales, esta relación ha sido aplicada por Van Donsel y Geldrich<sup>25</sup> para indicar el tipo de contaminación fecal, ya sea de origen antropogénico (CF/EF $>4$ ) o bien de origen animal (CF/EF $>0.7$ ) en sistemas acuáticos, analizando tanto sedimentos como agua; sin embargo, en lo referente a los alimentos (productos pesqueros) no se tiene información acerca de la aplicación de este criterio.

CUADRO I

CONTENIDO DE BACTERIAS INDICADORAS DE CONTAMINACION FECAL (NMP/100g) Y AISLAMIENTO DE *Salmonella* EN MUESTRAS DE OSTION

Fecha	Coliformes Totales	X10 <sup>4</sup> Fecales	Estreptococos Fecales X 10 <sup>4</sup>	CF/EF*	Aislamiento de <i>Salmonella</i>
Ago. 84	22.0	2.4	N.D.	-	
Sep. 84	240.0	46.0	1.5	30.6	
	24.0	24.0	0.2	120.0	
	46.0	24.0	0.9	26.6	
Oct. 84	110.0	46.0	0.2	230.0	
	21.0	11.0	0.1	110.0	
	46.0	46.0	0.1	460.0	
	24.0	4.6	24.0	0.2	
	110.0	11.0	2.4	4.6	
	110.0	4.6	0.2	23.0	
	240.0	2.4	0.1	24.0	<i>Salmonella newport.</i> <i>Salmonella</i> sp. grupo C <sub>2</sub>
	110.0	11.0	0.5	22.0	
	240.0	240.0	2.4	100.0	
240.0	240.0	2.4	100.0		
240.0	240.0	2.4	100.0	<i>Salmonella javiana.</i>	
Nov. 84	2400.0	2400.0	46.0	52.2	
	2400.0	2400.0	1.4	1714.3	
	240.0	240.0	2.1	114.3	<i>Salmonella</i> sp. grupo C <sub>1</sub>
	930.0	2.0	3.6	0.6	
	11000.0	2400.0	21.0	0.7	
	11000.0	43.0	21.0	2.1	
Ene. 85	2400.0	21.0	75.0	0.3	
	2400.0	110.0	240.0	0.5	
	2400.0	2400.0	460.0	5.2	
	4600.0	1.5	43.0	0.0	
	240.0	0.4	2.1	0.2	
	11000.0	0.9	150.0	0.0	
	240.0	3.5	24.0	0.1	
	93.0	7.5	15.0	0.5	
	4600.0	46.0	9.3	4.9	

NMP: Número más probable de bacterias.

CF/EF: Relación entre Coliformes fecales y Estreptococos fecales.

\*Coef.  $>4$  es sugestivo de contaminación de origen humano.

Coef.  $>0.7$  es sugestivo de contaminación de origen animal.

N.D.: No determinado.

A pesar de las altas concentraciones de bacterias indicadoras en las 31 muestras, *Salmonella* fue aislada sólo en 3 de ellas (9.7%), probablemente debido a que al sobrepasarse las 860 CF/100 g, éstas pueden enmascarar el aislamiento de dicho germen<sup>9</sup>.

Cabe hacer notar que el 100% de las muestras rebasaron el límite en el contenido de bacterias para el consumo del ostión. El Departamento de Salud, Educación y Bienestar Social de los EEUU<sup>24</sup>, ha sugerido que para la venta de ostión desconchado éste contenga < 16,000 CT/100 g y < 230 CF/100 g; se toman de referencia dichos límites ya que en nuestro país sólo se cuenta con una reglamentación de la calidad del agua en centros ostrícolas, para poder realizar el cultivo del ostión sin riesgo<sup>20 23</sup>.

Los límites antes mencionados han probado ser buenos para demostrar la ausencia total de *Salmonella* ya que se considera que existe una correlación entre la presencia de *Salmonella* y niveles mayores de 230 CF/100 g; sin embargo Andrews et al<sup>3</sup> aislaron diferentes cepas de *Salmonella* en muestras de ostión con coliformes fecales menores a 230/100 g, lo que indica que probablemente el valor de este límite debe ser establecido de acuerdo con los datos epidemiológicos de cada lugar.

De las 3 muestras que presentaron *Salmonella* se identificaron 6 cepas de *S. enteritidis* (cuadro II) correspondientes a los grupos serológicos C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> y D<sub>1</sub>, identificándose los serotipos *S. javiana* y *S. newport*, esta última encontrada como causa frecuente de infección en el ser humano y en los animales en EE UU y otros países<sup>22</sup>. Dichas cepas fueron aisladas principalmente a partir del caldo tetratio-nato y resiembra en el agar sulfito bismuto, coincidiendo con lo descrito por Andrews et al<sup>3</sup> respecto a la combinación de estos medios, pero cabe hacer notar que la mayoría (80%) de los aislamientos se realizaron a 41°C y solamente uno fue a 35°C de incubación.

El caldo de enriquecimiento selenito no fue efectivo en suprimir la flora competitiva que pudo inhibir el desarro-

llo de *Salmonella*, y de acuerdo con lo descrito por diferentes autores<sup>6 17 21</sup> es posible que existiera una mayor frecuencia de *Salmonella* en el ostión crudo.

Las bacterias que se desarrollaron en los medios antes mencionados fueron: *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp, *Aeromonas* spp, *Serratia liquefaciens* y *Escherichia coli*, las cuales pueden producir enterotoxinas y algunas de ellas han sido aisladas en casos de diarrea infantil<sup>10 14 16 19</sup>.

Por otra parte, se ha determinado que la dosis mínima infecciosa de *E. coli* (no productora de enterotoxina), asociada con síntomas diarréicos, es de 10<sup>6</sup>-10<sup>10</sup><sup>(13 19)</sup> y, en el presente estudio, las coliformes fecales (Cuadro I) alcanzan dichas cifras en 100 g de ostión lo cual puede representar un riesgo para la salud.

Cabe hacer notar que en forma paralela a este trabajo se comprobó la producción de toxina ST en 107 cepas aisladas a partir de estas muestras, encontrándose 3.7% de *E. coli* enterotoxigénica<sup>15</sup>.

Se concluye que tanto por el aislamiento de *Salmonella* como por las elevadas concentraciones de CT y CF, el ostión crudo representa un posible riesgo de infección para el ser humano, por lo que surge la necesidad de establecer medidas higiénicas de control y prevención en las aguas contaminadas de donde procede el producto, en el transporte y en los sitios en donde se realiza el manejo y la venta, sobre todo en estos 2 últimos pasos, en donde aparentemente se favorece la proliferación de microorganismos.

#### Agradecimientos.

Los autores agradecen la asesoría del Dr. Raúl Vázquez M. de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM; al Laboratorio de Microbiología del Instituto de Enfermedades Tropicales por la tipificación de las salmonelas y a Alfonso Salas, por el material gráfico.

CUADRO II.

AISLAMIENTO DE *Salmonella* EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO, TEMPERATURAS Y PERIODOS DE INCUBACION.

	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella</i> sp.	<i>Salmonella javiana</i> .	<i>Salmonella newport</i> .
Grupo Serológico	C <sub>2</sub>	C <sub>1</sub>	D <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Caldo de Enriquecimiento	Tetratio-nato	Tetratio-nato	Tetratio-nato	Selenito
°C	35	41	41	41
Incubación Horas	24	24	48	48
Agar Selectivo	Bismuto sulfito	Bismuto sulfito	Bismuto sulfito	Bismuto sulfito

Referencias

1. American Public Health Association. Recommended procedures for the bacteriological examination of water and shellfish. 4th ed. APHA. New York, 105 p. 1970
2. American Public Health, Association, Standard methods for the examination of water and wastewater. 15th ed. APHA. New York. 747-925 pp. 1980.
3. Andrews WH, Diggs MW, Presnell MW, Miescier JJ, Wilson CR, Goodwin CP, Adams WN, Furfari SA, Musselman JF. Comparative validity of members of the total coliform and fecal coliform groups for indicating the presence of *Salmonella* in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Milk Technol. 38 (8): 453-456; 1975.
4. Cortesi M, Della G. Indagini microbiologiche quantitative su mitili vivi del comercio. Arch. Vet Ital. 28: 205-211. 1977.
5. Cowan S. Manual for the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press. England. 238 p. 1974.
6. Fernández E, Saldaña J, Mireles C. Incidencia de *Salmonella* en carnes crudas. Influencia del enriquecimiento en la recuperación del microorganismo. Rev. Lat. Microbiol. 25: 263-269. 1983.
7. González AC, Sánchez RL, Hinojosa M, Bessudo D, Fragoso R, Becerril P. Water-borne transmission of chloramphenicol resistant *Salmonella typhi* in Mexico. Lancet II: 605-607. 1973.
8. Hood MA, Ness GE, Blake NJ. Relationship among fecal coliforms, *Escherichia coli*, and *Salmonella spp.* in shellfish. Appl. Environ Microbiol. 45 (1). 122-126. 1983.
9. Jang S, Biberstein S, Hirsh D. A diagnostic manual of veterinary clinical bacteriology and mycology. University of California, Davis. 215 p. 1978.
10. Jiwa SF, Krovacek K, Wadstrom T. Enterotoxigenic bacteria in food and water from an Ethiopian community. Appl. Environ Microbiol. 4 (4): 1010-1019. 1981.
11. Lennette E, Balows A, Hansler W, Truant J. Manual of clinical microbiology. 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 302-309 pp. 1980.
12. Levin M. Fish and Shellfish associated disease outbreaks. J. Water Poll. Control Fed. 50: 1377-1381. 1978.
13. Mehlman IJ, Fishbein M, Gorbach SL, Sanders AC, Eide EI, Olson JC. Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food. J. Assoc. Off. Anal.Chem. 59 (1). 67-80. 1976.
14. Mehlman IJ, Romero A. Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods for recovery from foods. Food Technol. 36: 73-79. 1982.
15. Pérez J, Romo AL, Almanza Y, Rosas I, Yela A. Determinación de la enterotoxigenicidad (ST) de *Escherichia coli* aislada de ostión, mediante la inoculación de ratones lactantes. Rev. Veterinaria México. En prensa.
16. Pickering LK, Evans DJ, Muñoz O, DuPont HL, Coehelo RP, Vollet JJ, Conklin RH, Olarte J, Kohl S. Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. J. Pédiatr. 93: 383-388. 1978.
17. Raj H. Enrichment medium for selection of *Salmonella* from fish homogenate. Appl. Microbiol. 14 (1): 12-20 1966.
18. Rosas I, Yela A, Báez A. Bacterias indicadoras de contaminación fecal en ostión (*Crassostrea virginica*) durante su desarrollo y procesamiento en el mercado. Contam. Amb. 1: 51-64. 1985.
19. Sack DA, Wells JG, Merson MH, Bradley RS, Morris GK. Diarrhoea associated with heat-stable enterotoxin producing strains of *Escherichia coli*. Lancet II: 237-243. 1975.
20. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Legislación relativa al agua y contaminación. Secretaría de Planeación y Ordenación Ecológica. México. 143 p. 1971.
21. Snoyenbos G, Carlson V. Comparative efficiency of enrichment broths for the isolation of Arizona serotypes. Avian Dis. 16: 756-766. 1972.
22. Spino DF. Elevated-temperature technique for the isolation of *Salmonella* from streams. Appl. Microbiol. 14 (4): 591-596. 1966.
23. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Sanitation of shellfish growing area. Hourse L. (ed) Washington, D.C. 32 p. 1965.
24. U.S. Environmental Protection Agency. Protection of shellfish waters. U.S.E.P.A. Washington D.C. 9 p. 1974.
25. Van Donsel A, Geldreich E. Relationships of Salmonellae to fecal coliforms in bottom sediments. Water Res. 5: 1079-1087. 1971.
26. Wood P. The principles and methods employed for the sanitary control of molluscan shellfish. In: Marine Pollution and Sea Life Fishing News. LTD. FAO. 560-565. 1972.
27. Wood. P. Public Health aspects of shellfish from polluted waters. In; Biological Indicators of Water Quality. James A, Evison L. (ed). John Wiley and Sons. New York pp. 13-1-13-8. 1979.