

DETERMINACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS PARA EL HOMBRE EN POLEN.

Autores: Tamara K. Martino¹, Carlos Alberto del Risco², Virginia Leyva¹, Yamila Puig¹, Idalmis Hernández¹, Neybis Aportela¹, Mayrin Machin¹, Ailen Camejo¹, Maritza de los Reyes¹ y Eduardo González¹.

¹Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. E mail:

tamara.martino@infomed.sld.cu, villy@sinha.sld.cu

²Centro de Investigaciones Apícola. E mail: carlos@eeapi.cu

Resumen

Se realizó un estudio microbiológico del polen colectado en el semestre diciembre 2006 - mayo 2007 en el apiario del Centro de Investigaciones Apícolas. Se analizaron 28 muestras a las cuales les fue efectuado un estudio de microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastroentéricas: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* coagulasa positiva, *Clostridium perfringens* y *Pseudomonas aeruginosa*. Las determinaciones se realizaron según los métodos recomendados por la ISO (Internacional Standard Organization). Las cepas presuntivas de *E. coli* aisladas se confirmaron por pruebas bioquímicas y posteriormente se llevó a cabo el estudio serológico. En el caso de *Salmonella*, la serotipificación se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos G. Malbran" de Argentina. A las cepas de *E. coli* y *Salmonella* les fueron determinadas la susceptibilidad antimicrobiana con el empleo del método de disco. Los resultados mostraron que no se aislaron *Clostridium perfringens* ni *Pseudomonas aeruginosa*. A pesar de que *Escherichia coli* se encontró en 7 muestras, ninguna cepa fue positiva a los grupos serológicos asociados con patogenicidad para el hombre. Se detectó *Salmonella javiana* (9,12; 1, Z₂₈; 1,5) y *Staphylococcus* coagulasa positiva en 1 y en 4 muestras respectivamente. La carga microbiana de *Staphylococcus* coagulasa positiva, aunque estuvo fuera de los límites de aceptabilidad, es baja ya que se comportó en el orden de 10² ufc/g de polen. Las cepas de *E. coli* y *Salmonella* resultaron sensibles a los antibióticos probados.

Introducción:

El polen apícola constituye una fuente natural rica en nutrientes, que puede ser utilizada por el hombre; pero dado a su origen contiene una amplia microbiota lo cual puede conllevar a una inadecuada calidad higiénico sanitaria.

Numerosos géneros y grupos microbianos se han aislado a partir del mismo, los cuales se han relacionado con la conversión del polen en pan de abejas, entre ellos se destacan: ***Lactobacillus***, ***Streptococcus***, ***Pseudomonas***, enterobacterias, ***Bacillus***, bacterias productoras de indol, ***Torulopsis*** y ***Sacharomyces*** (Gilliam, 1979 a y b). Otros autores también han estudiado los microorganismos presentes en el polen en relación con aquellos del tracto gastrointestinal de las abejas, detectando: ***Pseudomonas***, ***Streptococcus***, ***Micrococcus***, ***Lactobacillus***, ***Klebsiella***, ***Proteus***, ***Yersinia*** y ***Arthrobacter*** (García, Rojas y Sánchez, 2006).

Existe una gran variedad de microorganismos de interés sanitario en alimentos o en suplementos alimentarios, entre ellos de manera convencional se pueden incluir bacterias, hongos, protozoarios, virus y parásitos, estos microorganismos se encuentran involucrados en dos áreas fundamentales de la microbiología sanitaria, siendo la más importante la que está relacionada con agentes etiológicos de enfermedad (Fernández, 2000).

El siguiente trabajo tuvo como objetivo determinar la presencia de microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastroentéricas en polen apícola colectado en el apiario del Centro de Investigaciones Apícolas de Cuba.

Materiales y Métodos:

Se analizaron 28 muestras de polen que se colectaron entre los meses de diciembre de 2006 a mayo de 2007 en el apiario del Centro de Investigaciones Apícolas, realizándoles determinaciones de microorganismos patógenos causantes de enfermedades gastroentéricas, siguiendo las normas vigentes: *Escherichia coli* (ISO 7251: 2005), *Salmonella* spp. (ISO 6579:1993), *Staphylococcus* coagulasa positiva (NC ISO 6888:2003), *Clostridium perfringens* (ISO 7937:2004) y *Pseudomonas aeruginosa* (ISO/CD 13720).

A las cepas presuntivas de *E. coli* aisladas se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para su confirmación: agar hierro Kligler, asimilación de citrato, producción de indol, reacción del rojo de metilo, Voges Proskauer, producción de ácido a partir de celobiosa, sorbosa y sorbitol. Posteriormente se llevo a cabo el estudio serológico tomando en cuenta los serogrupos de *E. coli* patógenas que más circulan en nuestro país. La serotipificación de *Salmonella* fue efectuada en el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbran” de Argentina, la misma fue realizada por el esquema de Kauffman-White (Ewing, 1986).

A las cepas de *E. coli* y *Salmonella* les fue determinada, además, la susceptibilidad antimicrobiana por el método de disco (National Committee of Clinical Laboratory Standards, 2002), los antibióticos probados fueron: ácido nalidíxico, cloranfenicol, kanamicina, trimetropin-sulfametoxazol, tetraciclina, ciprofloxacina, ampicilina/sulfbactan, amikacina, ceftriazona, cefotaxima y ceftazidima.

Resultados y Discusión

Los resultados del estudio se muestran en la tabla 1. Se aislaron microorganismos causantes de enfermedades gastroentéricas solo en cuatro muestras de las 28 analizadas, para un 14.3 % de positividad; los microorganismos aislados fueron *Staphylococcus* coagulasa positiva en cuatro muestras y *Salmonella* en una.

Tabla 1. Resultados obtenidos en muestras de polen en la determinación de bacterias patógenas transmitidas a través de los alimentos.

Mutras	E.c. (nmp/g)	St. (ufc/g)	Salm. en 30 g	Mutras	E.c. (nmp/g)	St. (ufc/g)	Salm. en 30 g
1	<0.3	<10 ²	Ausencia	15	3.6	<10 ²	Ausencia
2	<0.3	<10 ²	Ausencia	16	<0.3	<10 ²	Ausencia
3	<0.3	<10 ²	Ausencia	17	3	<10 ²	Ausencia
4	<0.3	<10 ²	Ausencia	18	<0.3	1.0x10 ²	Ausencia
5	0.36	2.0x10 ²	Ausencia	19	<0.3	<10 ²	Ausencia
6	0.36	<10 ²	Ausencia	20	<0.3	<10 ²	Ausencia
7	1.1 x10	<10 ²	Ausencia	21	<0.3	<10 ²	Ausencia
8	0.92	<10 ²	Ausencia	22	<0.3	<10 ²	Ausencia
9	<0.3	1.2x10 ²	Ausencia	23	<0.3	<10 ²	Ausencia
10	<0.3	<10 ²	Ausencia	24	<0.3	<10 ²	Ausencia
11	3	<10 ²	Ausencia	25	<0.3	<10 ²	Ausencia
12	<0.3	<10 ²	Ausencia	26	<0.3	<10 ²	Ausencia
13	<0.3	2.2x10 ²	Presencia	27	<0.3	<10 ²	Ausencia
14	<0.3	<10 ²	Ausencia	28	<0.3	<10 ²	Ausencia

Leyenda:

E.c.: *Escherichia coli*

St.: *Staphylococcus* coagulasa positiva

Salm.: *Salmonella*

nmp Número más probable

En las muestras que se aislaron *Staphylococcus* coagulasa positiva, el recobrado no fue mayor del orden de 10² ufc/g. Estos resultados no son muy alarmantes teniendo en cuenta lo planteado por Aranda (1999), el cual propone como límite de aceptabilidad ausencia en 0.1 g. En nuestro país no se cuenta con criterios microbiológicos para este producto, aunque sí existen propuestas de criterios para alimentos listos para el consumo. Estos criterios se encuentran en fase de edición en la Oficina Nacional de Normalización, los límites propuestos para microorganismos patógenos se pueden apreciar en la Tabla 2.

Tabla 2. Límites de aceptabilidad propuestos para alimentos listos para el consumo.

Alimento	Indicadores	Límites por g o mL				Observaciones
		n	c	m	M	
Platos terminados	microorganismos a 30 °C *	5	2	10 ⁴	10 ⁵	*Excepto para alimentos con ingredientes fermentados o madurados con cultivos bacterianos.
	coliformes	5	2	10 ²	10 ³	-
	coliformes a 45 °C	5	2	<10	10**	** Ausencia de <i>E. coli</i>

	<i>Staphylococcus</i> coagulasa positiva	5	2	10	10 ²	-
	<i>Salmonella</i> en 25 g	5	0	0	-	-
	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	5	0	0	-	-
	<i>Bacillus cereus</i> ***	5	2	<10 ²	10 ²	***Para platos que contengan arroz, harinas, cereales.
	<i>Cl.perfringens.</i> ****	5	1	10 ²	10 ³	****Para platos que sean elaborados a base de carne.

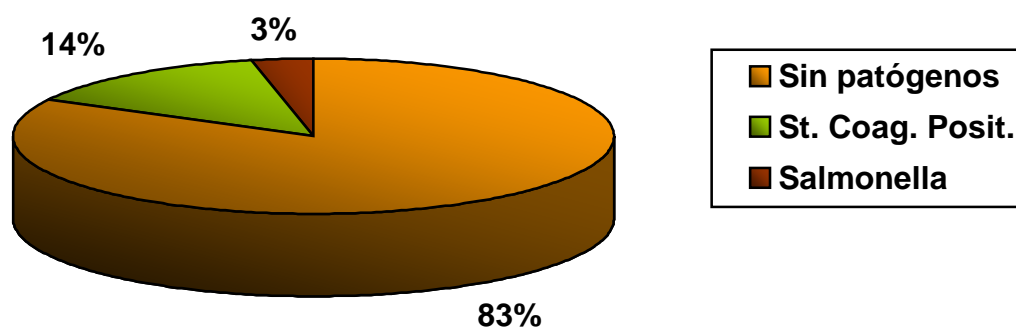
Leyenda:

- n:** número de unidades de muestras a ser examinadas.
- m:** valor del parámetro microbiológico para el cual o por debajo del cual el alimento no representa un riesgo para la salud.
- c:** número máximo de unidades de muestra que puede contener el valor "M" para que el alimento sea aceptable.
- M:** valor del parámetro microbiológico por encima del cual el alimento representa un riesgo para la salud.

Salmonella, como se señaló anteriormente, fue aislada en una sola muestra, en la cual además se obtuvo crecimiento de *Staphylococcus* coagulasa positiva. En el estudio serológico de grupo somático realizado se pudo constatar que esta cepa pertenecía al grupo somático "D". Posteriormente se completó este estudio en un laboratorio de referencia de Buenos Aires Argentina y se pudo conocer la serovariedad aislada: *Salmonella* javiana (9,12; 1, Z₂₈; 1,5). El esquema de Kauffman-White se ha acreditado como la técnica más útil para la diferenciación de los serovares dentro del género; el mismo diferencia a los organismos con base en sus antígenos somático (O) y flagelar (H) y por los antígenos Vi (contenidos por *S. typhi*, *S. dublín* y algunas cepas de *S. paratyphi* C). La determinación del serovar tiene un valor extraordinario en estudios epidemiológicos para rastrear fuentes y mecanismos de contaminación del patógeno (Fernández, 2000).

El serovar *Salmonella* Javiana (9,12; 1, Z₂₈; 1,5) es por primera vez aislada en nuestro país, no se conoce ningún aislamiento obtenido de casos clínicos, de muestras de alimentos, ni de agua, por lo que hace pensar en la naturaleza ambiental de dicha cepa. Posteriormente se determinó la susceptibilidad antimicrobiana a la misma comprobándose que era sensible a todos los antibióticos probados. La Figura 1 muestra los porcentajes de aislamiento obtenidos para los patógenos aislados.

No se aislaron *Clostridium perfringens*, ni *Pseudomonas aeruginosas* en ninguna muestra, cumpliéndose los límites establecidos para estos dos patógenos. Apareció *Escherichia coli* en 7 muestras con un recobrado no muy alto. Los estudios realizados, para la determinación de algún posible factor de patogenicidad por pruebas bioquímicas, mostraron que ninguna de las cepas aisladas respondía al fenotipo de enterohemorrágica por ser todas sorbitol positivo. Ni al fenotipo enteroinvasiva, teniendo en cuenta la imagen de los kligler obtenida (glucosa positiva, lactosa positiva, con gas y sin sulfhídrico). Tampoco se ubicaron dentro del grupo de las enteropatógenas atendiendo a la batería de antiseros existentes. Estudios posteriores serológicos más amplios y de biología molecular podrán constatar y perfeccionar los resultados obtenidos para *E. coli*. Todas las cepas resultaron sensibles a los antibióticos probados.



Conclusiones

1. *E. coli* se aisló en el 24% de las muestras de polen, ninguna cepa correspondió a los grupos de *E. coli* patógenas, atendiendo al alcance de los métodos empleados.
2. *Staphylococcus* coagulasa positiva se aisló en bajos niveles, en el 14% de las muestras.
3. *Salmonella* javiana se aisló en una sola muestra, esta serovariedad se detectó por primera vez en nuestro país.

Bibliografía

1. Aranda, M. L. (1999). El polen, control sanitario, normas legales. Vida Apícola.
2. Ewing, W. H.; Edwards and Ewing's, (1986). Identification of enterobacteriaceae. Ed Revevolucionaria Instituto Cubano del Libro: 25-60.
3. Fernández, E. (2000). Inocuidad de los alimentos. Cap. 1 Microorganismos de interés sanitario. 1ra edición. Ed. Universidad Autónoma de Querétaro, México. p: 13-14.
4. García, D.; Rojas, M. A. y Sánchez, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera*. Acta Biológica Colombiana, Vol. 11 No. 1, pág. 123 – 129. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11n1/v11n1a10.pdf>
5. Gilliam, M. (1979a). Microbiology of pollen and bee bread: The Yeast Apidology, 10(3): 269-274.
6. Gilliam, M. (1979b). Microbiology of pollen and bee bread: The genus Bacillus. Apidology, 10(3): 269-274.
7. ISO 6579:1993. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la detección de *Salmonella*.
8. ISO 7251: 2005. Microbiology-General guidance for enumeration of presumptive *Escherichia coli*- Most Probable Number Technique.
9. ISO 7937:2004. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of *Clostridium perfringens*-Colony Count Technique.
10. ISO/CD 13720. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs-Horizontal Method for the Enumeration of *Pseudomonas spp.*
11. National Committee of Clinical Laboratory Standards: Methods for disk diffusion, M100-S12 (M2-A7) January 2002;22 (1):27-72

12. NC ISO 6888:2003. Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Método horizontal para la enumeración de *Staphylococcus* coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies. Parte 1: Técnica utilizando el medio agar Baird Parker.