



Apartado de Correos / P.O. Box 44
28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)
☎ (34) 91 897 46 16 Fax: (34) 91 897 46 41
E-mail: microkit@microkit.es
Web: <http://www.microkit.es>
Blog: www.medioscultivo.com

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIREANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

MONOGRAFÍA *E.coli* y demás coliformes

1-El microorganismo y su interrelación con el ser humano

Las bacterias **coliformes** se han venido definiendo hasta el siglo pasado como las bacterias Gram negativas y entéricas (viven en el tracto intestinal de los animales de sangre caliente, incluido el ser humano), con forma de bacilos, sin esporas, que fermentan la lactosa con producción de gas. Sin embargo, los avances en medios de cultivo cromogénicos de las dos últimas décadas, han permitido redefinirlos de una forma más enzimática que bioquímica, simplemente como las bacterias Gram negativas y entéricas que son Galactosidasa positivas (Salmon-Gal, X-Gal...) y oxidasa negativas. Son Enterobacterias, anaerobias facultativas, e incluyen muy diversas especies, sobre todo algunas de los géneros KES (Klebsiella, Enterobacter, Serratia), incluso alguna de Citrobacter y alguna de Salmonella, pero la especie más conocida de coliforme es sin duda *Escherichia coli* (coliforme significa "con forma de coli"), probablemente la bacteria más buscada por el ser humano en miles de laboratorios y con miles de pruebas de campo cada día en todo tipo de muestras: aguas, alimentos, cosméticos, medicamentos, superficies... Porque es un indicador de infiltración de aguas residuales y/o de operarios que no se han lavado las manos tras ir al baño y pueden contaminarlo todo con otras bacterias entéricas patógenas; por tanto es un indicador de higiene del producto final. *E.coli* no es una bacteria propia del agua, ni de las manos, sino del aparato digestivo, de hecho en agua no sobrevive más de unas horas y en otras matrices, como los cosméticos, todavía menos. Por eso se considera mejor indicador de contaminación fecal al complejo Enterococos fecales (aunque muchos sean más típicos de los animales que del hombre, la contaminación fecal por animales es tan grave como la de origen humano y con efectos incluso peores). *E.coli* fermenta la glucosa como buena Enterobacteria y la lactosa como buen coliforme, con la producción de ácido y gas en menos de 24 horas, reduce los nitratos a nitritos, descarboxila la L-ornitina y su prueba de IMViC es ++---. Desde el avance en medios de cultivo cromogénicos, se considera simplemente el coliforme que es Glucuronidasa positivo (antes fluorescencia por MUG, ahora cromogénesis por X-Glu) e indol positivo. Los **coliformes fecales** son los coliformes capaces de crecer a 44°C, están más asociados a contaminación fecal, ya que muchos otros coliformes viven fuera del tracto intestinal y no son patógenos. Como tal, *E.coli* es también el coliforme fecal por excelencia, y no se considera patógeno, ya que es la bacteria comensal, anaerobia facultativa, con más ufc/g que hay en el cuerpo humano (en cambio otros muchos coliformes sí son patógenos); pero existen varias cepas, incluidas las verotoxigénicas (VTEC) de *E.coli* (O157 y otras productoras de toxina Shiga), que son patógenos tan graves como Shigella (no olvidemos que *Sh.dysenteriae* es considerada

patógeno de riesgo del grupo 3, igual que VTEC. Esta cepa es una causa importante de muerte en niños menores de 5 años. Se diferencia de las otras *E.coli* en que no fermenta el sorbitol, no crece a 44 °C y no produce β-glucuronidasa. Otras cepas causan infecciones urinarias por entrada por la uretra (por higiene deficiente), convirtiéndose en patógenas como casi cualquier cepa comensal humana que saquemos de su hábitat natural y la pasemos a otro órgano. En cambio otras cepas de *E.coli* ayudan al ser humano en diversos procesos de biotecnología, como la producción de vitaminas B y K.

2-Los tipos de productos donde la legislación exige su búsqueda o recuento, así como otros tipos de productos donde a nuestro criterio, sería recomendable analizarlos

-La legislación UE (Directiva Europea 2015/1787 de 6/X) y por ende la española (Real Decreto 902/2018 de 20/7) exigen la búsqueda diaria de *E.coli* y demás coliformes en **aguas** de consumo humano (incluidos grifos públicos y la empleada en industria alimentaria, olvidándose de los grifos privados y de otras industrias como la cosmética), incluyendo desde entonces en este mismo BOE las aguas envasadas. Y en aguas de baño: aguas continentales y playas (RD 1341/2007 de 11/X) y piscinas (RD 742/2013 de 27/9).

-*E.coli* debe buscarse o enumerarse (según legislación española y europea, actualizada en 2020) en los siguientes **alimentos**: carnes, cereales, cerveza, comidas preparadas, comidas dietéticas e infantiles, condimentos y especias, semiconservas, cuajo, frutas, hortalizas, zumos, verduras, galletas, harinas, horchatas, quesos, mantequilla, nata, cuajada, pastelería, bollería, confitería, repostería, moluscos, equinodermos, tunicados, pescados ahumados o en salmuera, moluscos y crustáceos sin cáscara, té y derivados, turrone y mazapanes. Coliformes en: cereales, comidas preparadas, comidas dietéticas e infantiles, frutas, hortalizas, verduras, gelatinas, galletas, helados, mantequilla, pescados ahumados o en salmuera. Enterobacterias en: alimentos para lactantes y dietéticos, cacao, golosinas, canales, carnes, jamón cocido, cerveza, semiconservas, cuajo, especias, galletas, gelatinas, helados, horchatas, jarabes, leche pasteurizada y en polvo, mantequilla, nata, yogur, cuajada, ovoproductos, pastelería, bollería, confitería, repostería, aperitivos, productos de la pesca, semiconservas, salsas, turrone, mazapanes, superficies de mataderos, superficies de trabajo de alimentos infantiles, superficies de hostelería, superficies de pastelería, alimentos para mascotas.

-En **medicamentos no estériles**, la farmacopea exige la búsqueda activa de *E.coli* y demás Enterobacterias

-En **cosméticos**, emulando la farmacopea, surgió la Norma ISO 21150 que habla de los mismos medios y se centra también en un solo indicador (*E.coli*), indicador que, es adecuado para aguas, medicamentos y alimentos (aunque por sus deficiencias como indicador respecto a los Enterococos fecales que ya hemos esbozado, en dichas matrices lo acompañan del otro indicador “coliformes”, o en otras, de “Enterobacterias”, pésimo indicador éste por incluir muchísimas especies que no proceden del tracto intestinal y porque los medios de cultivo que existen para esta familia obtienen una enorme cantidad de falsos negativos). En cambio *E.coli* es muy mal indicador para cosméticos, ya que esta cepa no perdura en ellos ni siquiera unas horas, a causa de los potentes pools conservantes de estas matrices, por lo que miles de laboratorios están perdiendo tiempo y dinero buscando algo que sólo circunstancialmente van a encontrar (y raramente en los retest a 24h tras las fabricación), cuando podrían estar buscando algo que sí se encuentra, y muy a menudo, en cosméticos: coliformes patógenos,

como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter gergoviae*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*...

3-Los métodos oficiales para su detección/recuento

-En aguas para *E.coli* y demás coliformes se sigue la Norma ISO 9308, una de cuyas partes habla del Agar Cromogénico CCA para Filtración de Membrana (que en Microkit creamos una década antes, en 1995, con el nombre de Agar MugPlus) y que sustituye al obsoleto Agar Tergitol-Chapman TTC; y otra de las partes habla del caldo de sustrato definido ONPG+MUG para Número Más Probable (que en Microkit llamamos Colicult-ISO) y que sustituye a los obsoletos Caldo Lauryl Sulfato o Caldo Lactosado; lamentablemente el MCC (Lauryl con MUG y X-Gal), de origen UE, no fue tenido en cuenta en esta ISO, aunque funcione mejor que el ONPG+MUG, a causa del



poderío USA, ya que una Norma ISO jamás debió admitir la redacción de un protocolo sometido a patente de un único proveedor mundial, máxime habiendo alternativas más modernas y con varios proveedores UE como es el MCC; afortunadamente la patente USA ha caducado, pero la inercia de muchos laboratorios y la ortodoxia en acreditación ISO les impide cambiar.

-En alimentos para *E.coli* se suele seguir la Norma ISO 16649 que dejó obsoletos el antes ubicuo caldo BGBL y el Agar EMB Levine; pero como el moderno Agar TBX de dicha Norma es un medio de escasa recuperación, muchas industrias prefieren seguir AFNOR y emplear el mismo medio que la legislación exige en aguas (CCA, que en Microkit denominamos MugPlus). Para coliformes se suelen seguir las numerosas normas ISO que hablan del VRBL, aunque muchos laboratorios prefieren el ya mencionado CCA,



que en Microkit denominamos MugPlus, que sirve para ambos parámetros (*E.coli* por X-Glu y demás coliformes por Salmon-Gal). Para Enterobacterias todo el mundo usa el VRBG de la ISO 21528, aunque existe a menudo la paradoja del VRBL/VRBG: que en una muestra haya más colonias de coliformes que de Enterobacterias, cuando todos los coliformes son enterobacterias, pero no a la inversa.

-En medicamentos se busca *E.coli* mediante caldo McConkey Púrpura (medio G) o Lactosado (medio D) para enriquecimiento y Agar MacConkey (medio H) para aislamiento del mismo y de otros coliformes. Y las Enterobacterias mediante enriquecimiento en EE Broth Mossel (medio E) y aislamiento en VRBG (antes VRBL+G, medio F).

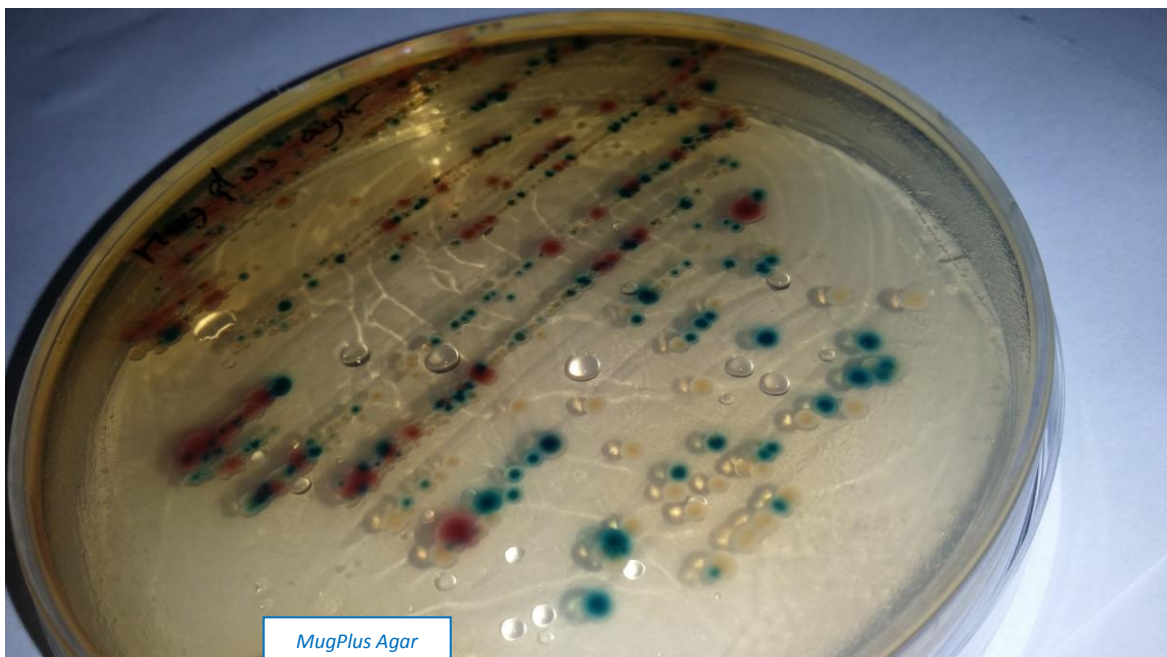


MacConkey Agar



EE Broth Mossel

-En cosméticos no existe legislación específica, sino la moda de buscar *E.coli*. Quienes se empeñan en seguir a ciegas las Norma ISO microbiológicas que no son de obligado cumplimiento en ese sector, usan Agar MacConkey y EMB Levine y quienes prefieren seguir su criterio profesional avalado por 17 años de intercomparación Seilaparfum, usan MugPlus Agar, que les da el doble valor *E.coli* (colonias azules) + demás coliformes (colonias rosas) sobre el fondo crema del medio, sin falsos negativos y con un medio enzimático diferencial, no selectivo, por lo que detecta mucho mejor las diana en matrices tan inhibitorias.



MugPlus Agar

4-Los métodos alternativos que mejoran la rapidez de los resultados y la robustez del análisis

MICROKIT diseñó desde 1995 el **MugPlus Agar (CCA)** que es actualmente el medio oficial en aguas y el recomendado en alimentos y cosméticos tras 22 años de intercomparación Seilalimentos (y 17 años Seilaparfum). Las colonias de *E.coli* son azules (algunas cepas añil, otras turquesa) por el X-Glu y las de los demás coliformes rojizas (algunas cepas rosa claro, otras fucsia intenso) por el Salmon-Gal, muy bien distinguibles sobre el medio color crema.

El **TBX Agar** para quienes solo necesitan buscar *E.coli* (sin demás coliformes), sólo tiene uno de los dos cromógenos (X-Glu) que en este caso genera colonias verdes en *E.coli*, pero su composición (base TBA) lo hace demasiado selectivo incluso para las cepas diana (productividad cercana al 50%), por lo que muchos laboratorios lo sustituyen por el MugPlus-CCA (productividad >90%) aunque les dé más información de la que necesitan (colonias rojizas de coliformes) y las obvian para sólo enumerar las colonias azules de *E.coli*.

El caldo Lauryl Sulfato con MUG (fluorógeno para *E.coli*) y X-Gal (cromógeno para coliformes) que en MICROKIT llamamos **MCC-Colicult** ha sido el gran aliado, durante las dos últimas décadas, de los laboratorios que requerían detección Presencia/Ausencia o recuento NMP de *E.coli* y demás coliformes. La entrada en vigor de la ISO 9308-2:2012 y su clásica elección de un caldo que sólo tenía un proveedor en el mundo, bajo patente, y que mezcla el fluorógeno MUG para *E.coli* con una reacción clásica bioquímica para coliformes (ONPG), propició el cambio a dicho caldo a numerosos laboratorios bajo acreditación ISO. La patente ha caducado, pero la inercia les impide volver a muchos al caldo doblemente enzimático MCC o incluso a usar el mismo ONPG + MUG de otras marcas. Afortunadamente la mayoría de laboratorios sin acreditación ISO, continuaron con el más moderno MCC-Colicult.



El **Minerals Glutamate Broth** se emplea por Norma ISO 16649-3 en bivalvos.

En biotecnología el **Terrific Broth** va sustituyendo en algunas aplicaciones al clásico caldo **LB Lennox**.

El intento de añadir MUG a los clásicos Caldo Verde Brillante 2 o MacConkey Broth Purple no tuvieron mucho éxito por la opacidad que provocaba el colorante sobre la fluorescencia del MUG. Tampoco el VRBL-MUG o el MacConkey Agar-MUG tuvieron el éxito esperado, muchas personas no distinguen bien la fluorescencia. Tampoco los medios cromogénicos para *E.coli* O157 han superado el éxito del **Sorbitol McConkey Agar**. Ni los medios cromogénicos para Enterobacterias han conseguido mejorar los pésimos resultados del VRBG. A causa de la Normativa ISO, medios tan clásicos como el EC Broth, Lauryl Sulfato Triptosa Broth, Endo (Agar y caldo), m-FC (Agar y caldo), MacConkey Broth Purple... han caído en desuso.

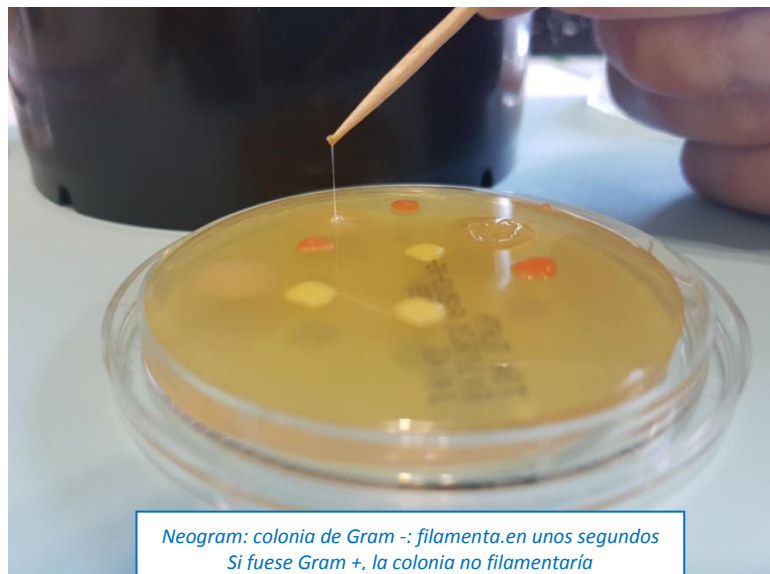
En todos los casos, la confirmación de *E.coli* es muy sencilla, al requerir sólo el test del **indol-Kovacs**. Sin embargo, el protocolo clásico hace perder 18-24h, al tener que pasar la colonia sospechosa a agua de peptona con triptófano e incubar para observar después el anillo rojo de indol en superficie tras añadir el reactivo de Kovacs. MICROKIT ha añadido triptófano directamente a sus medios sólidos cromogénicos para *E.coli*, (MugPlus-CCA, TBX Agar) por lo que la confirmación de indol es inmediata: añadir la gota de indol Kovacs sobre la colonia sospechosa y ver si vira en unos segundos de amarillo a rojo.

También la confirmación de Coliformes en estos medios es muy sencilla basta con hacerles a las colonias la prueba de la oxidasa, que debe ser negativa, ya que los coliformes son fermentadores por definición y no necesitan de la **citocromo-oxidasa** como los aerobios estrictos. Las tiras de MICROKIT están estabilizadas y no se ponen azules con el oxígeno del aire.



La colonias oxidasa positivas provocan viraje de la tira a azul oscuro

Sería raro, por su composición, que en estos medios creciesen Gram positivos, pero pueden descartarse falsos positivos debidos a ellos con la inmediata prueba del **Neogram** directa en las colonias.



*Neogram: colonia de Gram -: filamenta en unos segundos
Si fuese Gram +, la colonia no filamentaria*

5-Cómo vemos el futuro en la detección de este grupo

E.coli ya es el microorganismo más buscado en todo tipo de muestras, combinado con otros indicadores como son los parámetros coliformes o Enterobacterias, e incluso Enterococos fecales en aguas. Añadir el parámetro “y demás coliformes” en cosméticos debería ser inminente.