

Viabilidad de un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en queso tipo Guayanés usando separación inmunomagnética como herramienta de recuperación

The Viability of an Escherichia coli O157:H7 Strain in Guayanes Cheese Using Immunomagnetic Separation as a Tool for Recovery

Rojas, Tomás^{1*}; Peñuela, Ana²; Pernía, Giliana²; Perdomo, Mónica²; Gil, Marielsa³ y Reyes, Doris³

^{1*} Unidad de Microbiología Ambiental, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela.

² Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela.

³Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela. *E-mail: trojas@uc.edu.ve

Resumen

Se determinó la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7 en queso guayanés de manufactura artesanal, evaluando distintos esquemas de aislamiento basados en separación inmunomagnética (SIM). Unidades de queso (25 g) fueron inoculadas con 25 y 250 cel/g del patógeno y almacenadas a 4°C. Las piezas se analizaron los días 0, 2, 6, 8 y 10 post-inoculación a través de distintos esquemas de separación inmunomagnética (SIM) que incluían dos caldos de enriquecimiento: agua de peptona buferada sin inhibidores (APB-SI) y agua de peptona buferada con vancomicina, cefixime y telurito (APB-VCT) y dos agares de aislamiento del inmunoseparado: agar MacConkey sorbitol (MCS) y agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixime (MCS-TC). Los resultados demostraron la viabilidad del patógeno hasta por 10 días post-inoculación y en el transcurso de este tiempo, para algunos de los esquemas aplicados sobre la base de SIM, se logró un incremento en los porcentajes de recuperación, lo que indica que el número de células inoculadas se elevó con el tiempo. En cuanto a la utilidad de la SIM para la recuperación del patógeno, se observó variaciones en los porcentajes de aislamiento en función del caldo de enriquecimiento y el nivel de células inoculadas. Los mayores porcen-

Recibido: 28-01-09 / Aceptado: 06-05-09

tajes de recuperación se obtuvieron en las piezas inoculadas con 250 cel/g, con rangos del 35 al 85% (día 0 y 10 respectivamente) en el mejor de los esquemas SIM (APB-SI/SIM/MCS), mientras que para niveles de 25 cel/g, en el mejor de los casos (APB-SI/SIM/MCS), durante los primeros 6 días no superó el 15%. El caldo de enriquecimiento de mejor desempeño fue APB-SI ($p < 0,05$) y no se observó diferencias en los porcentajes de recuperación ($p > 0,05$) en función de los agares utilizados (MCS y MCS-TC) para la siembra del inmunoseparado.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157:H7, Separación inmunomagnética, Queso.

Abstract

The viability of an *Escherichia coli* O157:H7 strain in cottage-industry Guayanese cheese was determined by evaluating several isolation protocols based on immunomagnetic separation (IMS). Cheese units (25 g) were inoculated with 25 and 250 cel/g of this pathogen and stored at 4°C. The pieces were analyzed at 0, 2, 6, 8 and 10 days post-inoculation through several IMS protocols including two enrichment broths: buffered peptone water without inhibitors (BPW-WI) and buffered peptone water with vancomycin, cefixime and telurite (BPW-VCT) and two immunoseparation isolation agars: MacConkey-sorbitol agar (MSA) and MacConkey-sorbitol agar with cefixime and telurite (MSA-CT). Results demonstrated the viability of the pathogen for up to 10 days post-inoculation, and during this time, for some of the schemes applied on the IMS base, an increase in recovery percentages was achieved, indicating that the number of inoculated cells increased with time. In terms of the utility of IMS for recovering the pathogen, variations in the isolation percentages were observed in terms of the enrichment broth and the level of inoculated cells. The biggest recovery percentages were obtained in pieces inoculated with 250 cel/g, with ranges between 35 and 85% (days 0 and 10 respectively) in the best IMS scheme (BPW-WI/IMS/MSA), while, at levels of 25 cel/g, in the best case (BPW-WI/IMS/MSA), 15% was not surpassed during the first six days. The best performing enrichment broth was BPW-WI ($p < 0.05$) and differences in the recovery percentages ($p > 0.05$) were not observed in relation to the agars (MSA and MSA-CT) used for sowing the immunoseparator.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, immunomagnetic separation, cheese.

Introducción

Escherichia coli O157:H7 es quizás el patógeno emergente, transmitido por alimentos, más importante de las últimas tres décadas. Es una bacteria asociada con la producción de colitis hemorrágica, además de inducir trastornos de mayor severidad como el síndrome urémico hemolítico, este último una complicación grave, sobre todo en niños, que en algunos casos es mortal (1). La virulencia del microorganismo radica fundamentalmente en la producción de dos potentes toxinas denominadas toxinas “tipo Shiga” (TTS) por su rela-

ción antigénica y funcional con la toxina expresada por la especie *Shigella dysenteriae* tipo 1. Estas ocasionan inhibición de la síntesis de proteínas, siendo especialmente vulnerables las células del epitelio intestinal y las células del endotelio vascular (2).

Una amplia variedad de alimentos han sido involucrados como vehículos de este patógeno, entre los cuales, los derivados lácteos han jugado un rol importante. Brotes por consumo de leche no pasteurizada, yogur y quesos han sido reportados y están ampliamente descritos en la literatura (1, 3, 4). En cuanto a los quesos, dado el potencial de

transmisión que tienen, se han desarrollado investigaciones destinadas a aportar información que permita predecir el comportamiento y supervivencia de *Escherichia coli* O157:H7 en este tipo de alimento. Los resultados denotan que su viabilidad está condicionada por varios factores, entre ellos, actividad de agua (a_w), pH, flora bacteriana y fúngica asociada, maduración, temperatura de almacenamiento, número de células del patógeno y el proceso de manufactura, entre otros. Esto significa que el comportamiento del patógeno, según el tipo de queso, es variado; por ejemplo, en queso tipo mozzarella se demostró supervivencia del microorganismo si la temperatura de cuajado e hilado está por debajo de 70°C (5). En quesos artesanales de consumo masivo, en India, hallaron que *E. coli* O157:H7 sobrevive durante la manufactura y el almacenamiento (6). Así mismo, ensayos realizados por Lekkas y col. (4), demostraron la supervivencia de este serotipo inoculado en bajas dosis (100 y 500 células/g) en quesos tipo Galotyri (Grecia).

Otro de los problemas en relación con *Escherichia coli* O157:H7, es lo concerniente a las bajas dosis requeridas para que ocurra la infección; en este sentido, la dosis necesaria oscila entre 1 y 100 células por gramo (7, 8). Ante esta perspectiva, es necesario que las técnicas destinadas a su recuperación posean excelente especificidad y sensibilidad para garantizar un diagnóstico preciso. En este contexto, la técnica de separación inmunomagnética (SIM) se presenta como una herramienta útil para capturar pocas células del patógeno sobre todo en matrices complejas como heces y alimentos. Sin embargo, ésta presenta algunas dificultades tales como adsorción inespecífica de otras bacterias gramnegativas, lo que necesariamente implica evaluar cuales serían las mejores condiciones de preenriquecimiento de las muestras pre-

vio a SIM y que medios de cultivo permitirían un mejor crecimiento de las células capturadas (9).

En este contexto, dada la baja calidad sanitaria de muchos de los productos lácteos que se expenden en nuestro país y por ende con potencialidad de ser vehículo de patógenos bacterianos (10, 11, 12) y en virtud de las implicaciones que han tenido los quesos, a nivel mundial, como vehículos de *Escherichia coli* O157:H7, en el presente estudio, se determinó la viabilidad de un aislado de este patógeno inoculado artificialmente en queso blanco aretsanal tipo “Guayanés” y se evaluó el mejor esquema de aislamiento a utilizar, teniendo como eje central la técnica de SIM.

Materiales y Métodos

Cuantificación de flora mesófila y coliformes totales en muestras de quesos: con la finalidad de cuantificar la flora mesófila y coliformes totales se analizaron un total de 20 muestras de quesos, incluyendo aquellas utilizadas para preparar las unidades experimentales. Se siguió la metodología descrita por normas COVENIN (13, 14).

Aislado utilizado en la inoculación artificial de los quesos: un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 provisto por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), Instituto de Biología Experimental, Universidad Central de Venezuela, catalogada con el número CVCM-442 (derivada de la cepa ATCC: 35150) fue utilizado para la contaminación artificial de las unidades experimentales de queso guayanés. La viabilidad del mismo fue mantenida en agar cerebro corazón (ACC) semisólido con subcultivos bimensuales. Para el momento de la inoculación se obtuvo un cultivo en caldo cerebro corazón (CCC) de 24 horas a 35°C, a partir del cual se preparó el inóculo a aplicar

en las unidades experimentales. La manipulación del aislado, el manejo de las unidades experimentales contaminadas y el desecho del material biológico, se realizó aplicando estrictamente todas las medidas indicadas para patógenos catalogados en el nivel 2 de bioseguridad, formuladas por el Centro para el Control de Enfermedades, Atlanta, Estados Unidos (15).

Preparación del inóculo de *Escherichia coli* O157:H7 para la contaminación artificial de las unidades experimentales:

A partir del cultivo de *Escherichia coli* O157:H7 en CCC (24 horas/ 35°C), se tomaron alícuotas que se depositaron en un volumen de buffer fosfato salino con tween 20 (BFS-T20, pH: 7,2), ajustándose la densidad bacteriana a la equivalente de un patrón de MacFarland N° 1 ($3,0 \times 10^8$ bacterias/ml) por comparación espectrofotométrica, a una absorbancia de 520 nm (Stat Fax 303 Plus, Palm City, USA). De esta suspensión se procedió a realizar diluciones decimales en PBS-T20 hasta lograr la densidad bacteriana requerida para la contaminación de las unidades experimentales.

Preparación de las unidades experimentales de queso guayanés e inoculación artificial con el aislado de *Escherichia coli* O157:H7:

Se prepararon unidades experimentales de queso guayanés de 25 g cada una, todas provenientes de bloques de mayor tamaño pertenecientes a un mismo lote, sobre las cuales se ensayaron dos niveles de inóculo del patógeno (250 cel/g y 25 cel/g). Se prepararon 10 unidades experimentales (inoculadas a niveles de 25 cel/g), 5 unidades para ser evaluadas, una a la vez, a los días 0, 2, 6, 8 y 10, post-inoculación y en las que se utilizó como medio de enriquecimiento, previo a la SIM, agua de peptona buferada sin inhibidores (APB-SI) y otras 5 unidades analizadas en los días antes menciona-

dos pero enriquecidas en agua de peptona buferada con inhibidores como vancomicina (8 mg/L), cefixime (0,05 mg/L) y telurito (2,5 mg/L) (APB-VCT). Todas las unidades experimentales inoculadas, fueron almacenadas en refrigeración a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta su enriquecimiento. Así mismo, otras 10 unidades, pero inoculadas con niveles del patógeno de 250 cel/g, fueron procesadas experimentalmente bajo los esquemas anteriormente descritos. Homogenizadas las unidades experimentales en sus respectivos caldos de enriquecimiento, éstos se incubaron a 35°C durante 18 horas. Así mismo, por cada nivel de inóculo y en los días antes señalados, se aplicaron ambos tratamientos de enriquecimiento, sobre unidades experimentales no inoculadas, las cuales, representaron las muestras controles sin inocular. Este diseño experimental se aplicó por triplicado, espaciados en períodos de tiempos distintos.

Aplicación de separación inmunomagnética (SIM):

Transcurrida la incubación de los caldos de enriquecimiento se tomó alícuotas de 1 ml para realizar diluciones decimales en PBS-T20 hasta 10^{-3} . A partir de esta dilución se tomó 1 ml y depositó en tubos Eppendorf de 1,5 ml donde previamente se había colocado 20 μl de inmunoperlas magnetizadas sensibilizadas con anticuerpos específicos contra *Escherichia coli* O157 (Dynabeads anti-*E. coli* O157, DYNAL BIOTECH, Oslo, Noruega). Esta mezcla fue colocada en rotador de bajas revoluciones (Multi Purpose Rotator, SCIENTIFIC INDUSTRIES, INC, Springfield, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente. Culminado el tiempo, los tubos se colocaron en el equipo de inmunoseparación (MPC-10, DYNAL BIOTECH, Oslo, Noruega), aplicándose un campo magnético para la concentración de las esferas. Se descartó el sobrenadante y se retiró el magneto. Desprendidas las esferas de las

paredes del tubo, fueron resuspendidas en 1 ml de solución de lavado (PBS-T20, pH: 7,2); procedimiento que se repitió por cinco veces. De la suspensión de inmunoperlas del último lavado se tomó alícuotas de 25 μ l las cuales se depositaron sobre agar MacConkey sorbitol (MCS) y agar MacConkey sorbitol suplementado con telurito (2,5 mg/L) y cefixime (0,05 mg/L) (MCS-TC), incubándose a 35°C por 24 horas. Una muestra aleatoria de 10 colonias no fermentadoras de sorbitol (comparables a las colonias incoloras del aislado CVC-442 sobre los dos agares) obtenidas en ambos medios, fueron caracterizadas fenotípicamente y sometidas a aglutinación con antisuero específico (Anti-*E. coli* O157, FUVESIN-UCV, Caracas, Venezuela) para su confirmación como *Escherichia coli* O157:H7. Esta muestra aleatoria se usó para la obtención del porcentaje de células viables de *Escherichia coli* O157:H7 recuperadas por unidad experimental para cada tratamiento.

Análisis estadístico: Los experimentos fueron realizados por triplicado, aplicándose análisis de varianza (ANAVAR) para estudiar los efectos de los distintos esquemas de SIM (enriquecimiento, agares, inóculo) en los porcentajes de recuperación (paquete estadístico: Statgraph versión 2,1).

Resultados

El porcentaje de células viables de *Escherichia coli* O157:H7 recuperados luego de aplicados los distintos esquemas de recuperación, cuyo eje central fue la SIM, se presentan en las Figuras 1 y 2. Los protocolos incluían dos tipos de caldos de enriquecimiento previos a la SIM y dos clases de agares para la inoculación del inmunoseparado. Aunque hubo variaciones en los porcentajes de recuperación del aislado, según el protocolo aplicado, la viabilidad del patógeno en las unida-

des experimentales de queso guayanés fue demostrada en el transcurso de diez (10) días de almacenamiento a 4°C para ambos niveles de inoculación. Así mismo, el patógeno no fue recuperado, de forma natural, en las unidades experimentales sin inocular (controles sin inocular). El recuento de aerobios mesófilos en las muestras de quesos (n=20) se ubicó en una media de $1,1 \times 10^7$ UFC/g (máximo: $3,2 \times 10^7$ UFC/g y mínimo: $5,1 \times 10^5$ UFC/g) y de coliformes totales, en promedio, fue de $1,2 \times 10^5$ UFC/g (máximo: $3,5 \times 10^5$ UFC/g y mínimo: $6,2 \times 10^3$ UFC/g) (datos no tabulados).

En la Figura 1, se observa el comportamiento del aislado inoculado a razón de 25 cel/g de queso. El porcentaje de aislamientos positivos en el transcurso de los primeros 6 días, para todos los protocolos, no fue mayor de 15%. Entre el sexto y décimo día la tasa de recuperación se incrementó en los esquemas de aislamiento, donde el enriquecimiento se realizó en APB-SI para ambos agares. Estos porcentajes oscilaron entre un 10% a 50% al usar APB-SI/SIM/MCS y de 3% a 60% al utilizar APB-SI/SIM/MCS-TC. En los tratamientos donde se usó APB-VCT/SIM/MCS-TC, la máxima detección de células viables fue de un 35% al octavo día, mientras que en los días previos, la recuperación no superó el 15%. El aislamiento con APB-VCT/SIM/MCS sólo permitió recuperación del patógeno en las unidades experimentales procesadas al segundo y sexto día, siendo nulo su aislamiento en el resto de los análisis.

En las unidades inoculadas con 250 cel/g (Figura 2), con el uso de APB-SI/SIM/MCS, los porcentajes de recuperación se incrementaron desde un 35% obtenido en el día 0 hasta un 80% para el octavo día, con una declinación considerable (15%) para el décimo día. Igual tendencia se observó con el uso de APB-SI/SIM/MCS-TC, aumentando la tasa de aislamiento desde un 10% a un 90%

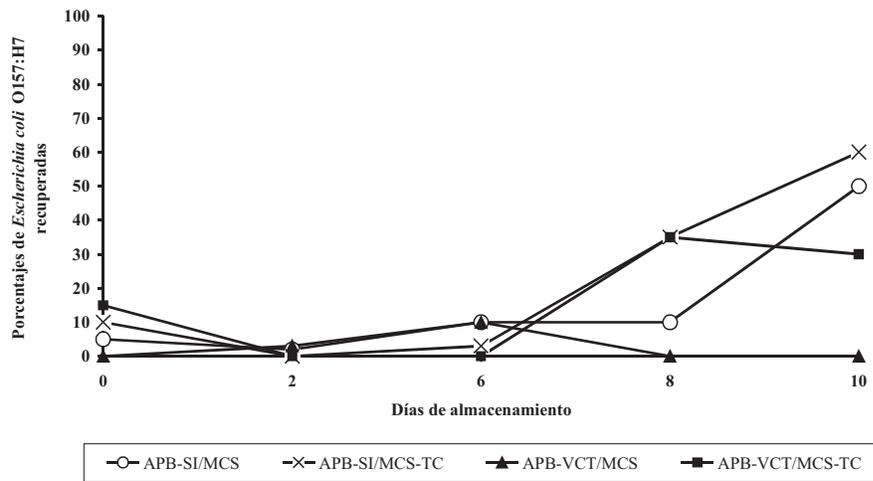


Figura 1. Recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en unidades experimentales (25 g de queso Guayanés) inoculadas con 25 células/g según caldo de enriquecimiento y medio de cultivo usado en la separación inmunomagnética.

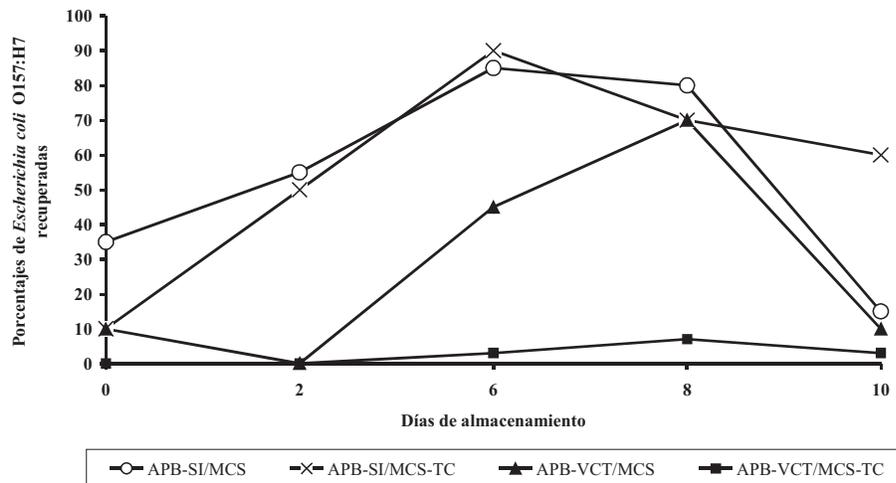


Figura 2. Recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en unidades experimentales (25 g de queso Guayanés) inoculadas con 250 células/g según caldo de enriquecimiento y medio de cultivo usado en la separación inmunomagnética.

entre el día 0 y sexto día respectivamente, declinando a un 60% para el décimo día. Luego de aplicar APB-VCT/SIM/MCS, un incremento sostenido en la recuperación del microorganismo se produjo entre el segundo y octavo día (desde un 10% hasta un 70% respectivamente), disminuyendo a un 10% en el décimo día. El esquema APB-VCT/SIM/MCS-TC fue el de peor desempeño, siendo la

tasa máxima de recuperación de tan sólo un 7% en el día ocho.

En concordancia con lo descrito, el análisis estadístico arrojó diferencias significativas en los porcentajes de recuperación del patógeno, en las unidades experimentales inoculadas artificialmente, según el esquema de SIM aplicado. El mayor porcentaje de recuperación, según el tipo de caldo de enriquecimiento aplica-

do, se obtuvo al usar APB-SI para ambos inóculos ($p < 0,05$). Por el contrario, no se observó diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en función del tipo de agar utilizado, resultando igualmente efectiva la recuperación al sembrar tanto en MCS como MCS-TC. El número de células del patógeno por gramo de queso influyó significativamente ($p < 0,05$) en los porcentajes de recuperación siendo mayores a niveles de 250 cel/g.

Discusión

En Venezuela oficialmente no se han descrito brotes por el consumo de alimentos contaminados con *Escherichia coli* O157:H7, sin embargo, su aislamiento ha sido reportado en rebaños de ganado bovino en algunas zonas del país, al igual que en algunos alimentos expendidos en mercados populares (16, 17). Así mismo, en países como Argentina, Brasil y Uruguay se han reportado casos de infección por este patógeno, incluyendo algunas muertes, en los cuales alimentos de origen animal, entre ellos lácteos, fueron los vehículos de transmisión (18, 19, 20). Esto permite inferir que existen cepas circulantes en la región, particularmente en Venezuela, que podrían representar un riesgo latente para la salud pública. En este contexto, derivados de la leche que se fabrican artesanalmente en Venezuela podrían intervenir como vehículos de muchos patógenos, incluyendo el serotipo hemorrágico O157:H7. Cabe considerar, que estudios realizados en el país sobre algunos de estos productos y en especial en quesos con características similares a los utilizados en esta investigación (queso tipo "telita", queso "de mano"), han demostrado una calidad microbiológica precaria, lo que refuerza esta posibilidad (10, 11, 12).

En los ensayos realizados en la presente investigación, sobre el comportamiento de

un aislado de *Escherichia coli* O157:H7 en queso tipo Guayanés, se demostró la viabilidad de este patógeno hasta por diez (10) días post-inoculación en unidades experimentales contaminadas con niveles de 25 y 250 cel/g y almacenadas a temperaturas de $4 \pm 1^\circ\text{C}$. Así mismo, no sólo se demostró la supervivencia en este período, sino, que en algunos de los esquemas aplicados para su detección sobre la base de SIM, el porcentaje de células viables caracterizadas como *E. coli* O157:H7 se elevó durante el tiempo de almacenamiento, lo que se puede inferir como un incremento en su número. Por ejemplo, al aplicar el esquema APB-SI/SIM/MCS, en las unidades inoculadas con 25 cel/g, el porcentaje de células viables recuperadas se incrementó desde niveles de 5% en el día 0 hasta 50% para el día 10; así mismo, al usar el esquema APB-SI/SIM/MCS-TC la tasa de aislamiento se elevó desde un 10% (día 0) hasta un 73%, en promedio, entre el sexto y décimo día (Figuras 1 y 2). Por otra parte, este patógeno demostró habilidad para sobrevivir ante una flora mesófila elevada (media: $1,1 \times 10^7$ UFC/g), incluyendo un número apreciable de coliformes totales (media: $1,2 \times 10^5$ UFC/g), este último aspecto es bien importante por cuanto denota una calidad sanitaria inadecuada de las piezas de queso utilizadas en la investigación. En todo caso, se corrobora lo expresado en la literatura, donde se define a *Escherichia coli* O157:H7 como un competidor considerable ante flora mixta, incluyendo bacterias ácido lácticas y otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (21).

De todo lo anterior se desprende que de haber fallas durante el procesamiento o inclusive contaminación cruzada con este patógeno, aún a niveles considerados como bajos (25 y 250 cel/g), la supervivencia del microorganismo en queso blanco fresco tipo guayanés es posible y no conforme con esto, es

probable que haya un incremento en su número durante el almacenamiento. Esto es importante, por cuanto la sobrevivencia del microorganismo en leche cruda almacenada en refrigeración, durante días ha sido demostrada aun en condiciones donde la flora mesófila acompañante es numerosa y la cantidad del patógeno es baja (1, 22). De este modo, la elaboración de quesos con leche cruda no pasteurizada, tal y como generalmente ocurre en la fabricación artesanal de quesos frescos en Venezuela, representa un riesgo latente. De existir falla en el procesamiento del queso, por ejemplo, contaminación cruzada durante la formación del cuajo y fallas en la temperatura de cocción, durante la formación de la pasta y el hilado, un número remanente de *E. coli* O157:H7 podría sobrevivir. De esta manera, este patógeno permanecería viable e incluso pudiera multiplicarse bajo las condiciones de almacenamiento del queso a nivel de expendedores (refrigeración en el mejor de los casos). Este aspecto ha sido evaluado, tanto para quesos frescos como para quesos madurados y representa un punto crítico en la inocuidad de algunos tipos de quesos. En queso Mozzarella preparado con leche no pasteurizada inoculada con niveles de *Escherichia coli* O157:H7 de 10^5 UFC/ml, una disminución de la temperatura de hilado y cocción de 80°C a 70°C , durante el procesamiento, conlleva a la presencia de un número de células que permanecen viables durante semanas en piezas de queso refrigeradas (5). En quesos artesanales tipo Galotyri, quesos de alta acidez y una flora láctica apreciable, este patógeno fue capaz de sobrevivir hasta por 28 días en porciones de quesos almacenadas tanto a 4°C como a 12°C , con inóculos próximos a 10^3 UFC/g (4). De igual forma, durante la manufactura y almacenamiento de quesos madurados la sobrevida y crecimiento del microorganismo fue demostrada, aún en

quesos preparados con leche contaminada con pocas células del patógeno (entre 10 y 100 UFC/ml); en este caso la sobrevida fue descrita hasta por 60 días bajo condiciones de refrigeración (23).

En cuanto a la utilidad de la SIM para la recuperación del microorganismo en las unidades experimentales inoculadas, esta técnica presentó variaciones en los porcentajes de aislamiento de células viables en función del esquema aplicado y el nivel de células inoculadas. Se observó diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de recuperación según el nivel de inóculo, obteniéndose mayores valores en las unidades inoculadas con 250 cel/g. De hecho, a niveles bajos del patógeno (25 cel/g) durante los primeros 6 días, para el mejor de los esquemas (APB-SI/SIM/MCS), el porcentaje de recuperación no superó el 15%, lo que indica que en presencia de pocas células del microorganismo, la SIM presentó ciertas limitaciones. Para este mismo esquema, a partir del octavo día, la técnica mejoró su desempeño alcanzando porcentajes cercanos al 50%, incremento que podría tener explicación sobre la base de un aumento en el número de patógenos con respecto al inóculo inicial, aspecto que fue discutido con anterioridad. A niveles de 250 cel/g la metodología SIM mejoró su capacidad de recuperación, con rangos que oscilaron entre 35% a 85% para APB-SI/SIM/MCS y 10% a 80% para APB/SIM/AMS-TC, durante los primeros 8 días. El análisis estadístico permitió distinguir diferencias en los porcentajes de recuperación según el tipo de caldo de enriquecimiento usado; de hecho, los mayores porcentajes de detección, para ambos inóculos, se lograron al enriquecer en APB-SI en comparación con los obtenidos al usar APB-VCT ($p < 0,05$). Estos datos ratifican la utilidad del caldo APB sin aditivos como medio de enriquecimiento

de patógenos alimentarios en matrices complejas. Este medio se recomienda para la recuperación de células lesionadas por cuanto mantiene el pH y aporta nutrientes indispensables para el desarrollo, siendo descrito por diversos autores como medio de enriquecimiento ideal previo a SIM (24, 25). Al parecer, el agregado de ciertas sustancias inhibitoras en el caldo APB, fundamentalmente cefixime, puede jugar un rol en la inhibición de *E. coli* O157:H7 cuando se encuentra en bajo número. Algunos autores recomiendan disminuir a la mitad la concentración tanto del antibiótico como del telurito para evitar esta situación (7).

En relación con los medios usados para el aislamiento de las células de *Escherichia coli* O157:H7 inmunocapturadas, los datos obtenidos demostraron que no existen diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de recuperación según el agar utilizado (MCS-SI y MCS-TC) resultando ambos, igualmente útiles para este propósito. Esto ha sido corroborado en otras investigaciones, inclusive una presentada por este grupo de trabajo (9, 26). Sin embargo, en la literatura existen estudios donde se recomienda el uso de medios diferenciales (MCS o cromogénicos) con el agregado de sustancias inhibitoras, para evitar el crecimiento de otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae* sorbitol negativos y otros bacilos gramnegativos no fermentadores que denotan esta característica y que pueden adherirse inespecíficamente durante la SIM; de esta forma se evita confusión al momento de la pesquisa de colonias típicas incoloras de *Escherichia coli* O157:H7 (8). En este sentido, es importante destacar que en el presente estudio durante la aplicación de la SIM hubo adsorción, sobre las inmunoperlas magnetizadas, de otros grupos bacterianos sorbitol negativos entre los que destacaron microor-

ganismos tales como: complejo *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli* no-O157 y *Pseudomonas alcaligenes* (datos no tabulados), quienes presentaron crecimiento considerable tanto en MCS-SI como sobre MCS-TC y cuyas colonias fueron indistinguibles, desde el punto de vista morfológico, del serotipo O157. Esto permite inferir que los inhibidores añadidos aparentemente no marcaron una diferencia sustancial en cuanto a la selectividad del MCS-TC frente a otros microorganismos no-O157; así mismo, se corroboró que durante la aplicación de SIM ocurre captura tanto específica (reacciones cruzadas) como inespecífica (intervención de fuerzas químicas de distinta índole) de grupos bacterianos no-O157, aspecto que ha sido planteado por diversos autores (25, 27).

En conclusión, la viabilidad de *Escherichia coli* O157:H7 en queso tipo guayanés fue demostrada por al menos diez días bajo condiciones de refrigeración (4°C). Así mismo, su aislamiento a través de SIM fue posible, no obstante, hubo variaciones en los porcentajes de recuperación en función del tipo de caldo de enriquecimiento usado y nivel de inóculo, no siendo afectada la tasa de aislamiento por el tipo de agar usado. El esquema basado en SIM de mejor desempeño, para ambos inóculos, fue aquel donde el enriquecimiento se realizó en APB-SI independientemente si luego la siembra se realizó en MCS o MCS-TC.

Referencias Bibliográficas

- (1) Hussein H, Sakuma T. Invited Review: Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *J Dairy Sci* 2005; 88: 450-465.
- (2) Moxley R. *Escherichia coli* O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Anim Health Res Rev.* 2004; 5(1): 15-33.

- (3) Mainil J and Daube G. A Review: Verotoxinogenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J Appl Microbiol* 2005; 98: 1332-1344.
- (4) Lekkas C, Kakouri A, Paleologos E, Voutsinas L, Kontominas M, Samelis J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Galotyri cheese stored at 4 and 12 degrees °C. *Food Microbiol* 2006; 23(3): 268-276.
- (5) Spano G, Goffredo E, Beneduce L, Tarantino D, Dupuy A, Massa S. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Lett Appl Microbiol* 2003; 36: 73-76.
- (6) Wahi S, Bansol S, Ghosh M, Ganguli A. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during manufactura and storage of Indian cheese (paneer). *Foodborne Pathog Dis* 2006; 3(2): 184-189.
- (7) Ogden I, Hepburn N, MacRae M. The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for the detection of *Escherichia coli* O157 in foods. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 373-379.
- (8) Lejeune J, Hancock D, Besser T. Sensitivity of *E. coli* O157 detection in bovine feces assessed by broth enrichment followed by IMS and direct plating methodologies. *J Clin Microbiol* 2006; 44(3): 872-875.
- (9) O'Brien S, Duffy G, Daly D, Sheridan J, Blair I, McDowell D. Detection and recovery rates achieved using direct plate and enrichment/immunomagnetic separation methods for *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and on bovine hide. *Lett Appl Microbiol* 2005; 41: 88-93.
- (10) Luigi T, García F, Loaiza R y López K. Evaluación de calidad sanitaria y detección de *Salmonella spp* en cremas de leche expendidas en el eje costero Carabobo-Falcón. *Rev Soc Ven Microbiol* 2005; 25 (1): 41-46.
- (11) Márquez J y García C. Microflora patógena del queso blanco "telita" elaborado en cuatro estados de Venezuela. *An Venez Nutr* 2007; 20 (1): 17-21.
- (12) Maldonado R y Llanca L. Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el Municipio Girardot, Estado Aragua, Venezuela. *Rev Científica FCV-LUZ* 2008; Vol. XVIII (4): 431-436.
- (13) Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma N°: 902-87. Alimentos. Métodos para recuento de bacterias aerobias en placa de Petri. 1987 (2^{da} revisión).
- (14) Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Norma N°: 1086. Alimentos. Métodos para recuento de bacterias coliformes en placa de Petri. 1987 (1^{ra} revisión).
- (15) Centers for Diseases Control (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Fifth Edition. Washintong D.C. 2007.
- (16) Narváez C, Carruyo G, Moreno M, Rodas A, Hoet A, Wittum T. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del Municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Rev Científica FCV-LUZ* 2007; Vol. XVII (3): 239-245.
- (17) Bravo B y Villalobos L. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev Soc Ven Microbiol* 2002; 22 (2): 119-121.
- (18) Guth B, Souza R, Vaz T, Irino K. First Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolate from a patient with hemolytic uremic syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2002; 8:535-536.
- (19) Rubaglio E y Tesone S. *Escherichia coli* O157:H7: presencia en alimentos no cárnicos. *Arch Argent Pediatr* 2007; 105(3): 193-194.
- (20) Valera G, Chinen I, Gadea P, Miliwebsky E, Mota M, González S, et al. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from clinical cases and food in Uruguay. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40(2): 93-100.
- (21) Rodríguez E, Arques J, Núñez M, Gaya P, Medina M. Combined effect of high-pressure treatments and bacteriocine-producing lactic acid bacteria on inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in raw-milk cheese. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71(7): 3399-3404.
- (22) Massa S, Goffredo E, Altieri C, Natola K. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8°C. *Lett Appl Microbiol* 1999; 28: 89-92.

- (23) Maher M, Jordan K, Upton M, Coffey A. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of smear-ripened cheese produced from raw milk. *Lett Appl Microbiol* 2001; 90: 201-207.
- (24) Jiang J, Larkin C, Steele M, Poppe C, Odu-meru A. Evaluation of universal preenrichment broth for recovery of foodborne pathogens from milk and cheese. *J Dairy Sci* 1998; 81: 7298-2803.
- (25) Foster G, Hopkins G, Gunn G, Ternent H, Thomson F, Knigh H, *et al.* A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *E. Coli* O157 from bovine faeces. *Lett Appl Microbiol* 2003; 95: 155-159.
- (26) Rojas T, Vásquez Y, Reyes D, Martínez C, Medina L. Evaluación de la técnica de inmunoseparación magnética para recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche. *Arch Lat Nutr* 2006; 56(3): 257-264.
- (27) Weagant S, Bound A. Evaluation of techniques for enrichment and isolation of *E. coli* O157:H7 from artificially contaminated sprouts. *Int J Food Microbiol* 2001; 71:87-92.