

Evaluación de la técnica de inmunoseparación magnética para recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche

Tomás Rojas, Yvette Vásquez, Doris Reyes, Carlos Martínez, Luís Medina

Unidad de Microbiología Ambiental, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Venezuela, Laboratorio de Bacteriología, Hospital Estadal los Samanes, Maracay, Edo Aragua, Venezuela

RESUMEN. La utilidad de la técnica de inmunoseparación magnética (ISM) para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche fue evaluada. Se determinó la eficiencia de distintos caldos de enriquecimientos previos a la ISM y se analizaron diferentes agares (diferenciales y/o selectivos) para la siembra del inmunoseparado. Porciones de crema de 25 g, fueron inoculadas con niveles bajos del patógeno (\approx 50, 10 y 1 células/g) para luego ser enriquecidas en agua de peptona buferada con vancomicina (APB-V), agua de peptona buferada con vancomicina y cefixime (APB-VC) y caldo soya tripticasa con vancomicina, cefixime y telurito (CST-VCT) incubándose a 35°C / 18 horas. Transcurrida la incubación se aplicó ISM y el inmunoseparado se sembró en agar MacConkey sorbitol (AMS), agar MacConkey sorbitol con telurito y cefixime (AMS-TC) y agar cromogénico con telurito y cefixime (ACRG-TC). Se observó diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de recuperación según el caldo de enriquecimiento empleado, obteniéndose las mayores tasas de recuperación con el uso de CST-VCT para los tres niveles de inóculo. Los valores de recuperación no variaron significativamente ($p < 0,05$) según el agar utilizado, mientras que el número de células inoculadas impacta los porcentajes de recuperación, siendo mayor según aumenta el inóculo. Se concluye la técnica de inmunoseparación magnética es un método sensible para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche, recomendándose como esquema de aislamiento el enriquecimiento en CST-VCT, aplicación de ISM, y siembra del inmunoseparado en medio no selectivo (AMS) y medio selectivo (AMS-TC o ACRG-TC).

Palabras clave: *Escherichia coli* O157:H7, inmunoseparación magnética, productos lácteos.

INTRODUCCION

En la actualidad se reconocen cinco clases de *Escherichia coli* enterovirulentas las cuales frecuentemente causan trastornos gastrointestinales en el hombre y otros animales, a través de distintos mecanismos de patogenicidad. De estos grupos es quizás el enterohemorrágico el que mayor peligrosidad representa, por cuanto pueden causar trastornos tan severos que incluso ocasionan la muerte (1). En este grupo se incluye el serotipo O157:H7, el cual, fue reconocido como patógeno transmitido por alimentos a partir del año 1982, luego

SUMMARY. Evaluation of the technique of immunomagnetic separation for recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in milk creams. The utility of immunomagnetic separation (IMS) for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in milk creams was evaluated. The efficiency of different pre-enrichments broths previous to ISM was determined and different agars were analyzed (differential and/or selective) for plating of the immunobeads. Portions of 25 g from milk creams were inoculated with pathogen low levels (50, 10 and 1 cell/g) and then, were enriched in buffered peptone water with vancomycin (BPW-V), buffered peptone water with vancomycin and cefixime (BPW-VC) and triptone soya broth with vancomycin, cefixime and tellurite (TSB-VCT) being incubated 35°C/18 hours. Then, IMS was applied and immunobeads were plated onto sorbitol MacConkey agar (SMA), sorbitol MacConkey agar with cefixime and tellurite (SMA-CT) and chromogenic agar with tellurite and cefixime (CRGA-TC). It was observed significant differences ($p < 0,05$) in the recovery percentages according to the pre-enrichment broth used, being obtained the biggest recovery rates with the use of TSB-VCT for the three inocula levels. The recovery rates did not vary significantly ($p < 0,05$) among the utilized agars, while the number of inoculated cells impacts the recovery percentages, being bigger as it increases the inocula. In conclusion, IMS is a sensitive method for the recovery of *Escherichia coli* O157:H7 in milk creams, recommending for isolation of this pathogen, the enrichment in TSB-VCT, application of IMS, and plating of immunobeads onto nonselective agar (SMA) and selective agar (SMA-TC or CRGA-TC).

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

de algunos brotes acaecidos en los Estados Unidos donde los vehículos involucrados fueron alimentos expendidos en locales de comida rápida (2,3). Los alimentos asociados comúnmente con la transmisión de este microorganismo, incluyen: carne molida con cocción inadecuada, leche no pasteurizada y sus derivados, jugos de frutas no pasteurizados, vegetales crudos y con procesamiento mínimo, así como también, agua de consumo humano y de recreación (4).

La patogenicidad de este microorganismo está asociada con un importante número de factores de virulencia, que incluyen, la producción de dos potentes toxinas conocidas

como toxinas del tipo Shiga, por su relación con la toxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, y que también son conocidas como verotoxinas por sus efectos citopáticos sobre las células VERO. Estas se clasifican en tipo I o tipo II según sus particularidades antigénicas, y a su vez dentro de cada tipo existen subtipos basados también en sutiles diferencias antigénicas que hablan de la complejidad estructural de dichas toxinas(5). El blanco principal de estas toxinas es la subunidad 28 s del ARN ribosomal, lo que produce inhibición de la síntesis de proteínas produciendo muerte celular. Son especialmente susceptibles las células del epitelio intestinal y las células endoteliales de los vasos sanguíneos renales (6). Los síntomas asociados con la infección por este patógeno incluyen la aparición brusca de colitis hemorrágica caracterizada por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre, fiebre, postración general, pudiendo surgir, otros síndromes de extrema gravedad entre los que se incluyen púrpura trombocitopénica, anemia hemolítica y síndrome urémico hemolítico (7).

A pesar de la aparente facilidad con la que *Escherichia coli* O157:H7 puede llegar a un alimento y adaptarse a las condiciones del mismo, generalmente ésta se encuentra en bajo número. Esto cobra aún más relevancia por el hecho de que la dosis infecciosa es baja, siendo reportada en sólo unas pocas células/g de alimento (8). Ante esto, es necesario utilizar métodos de aislamiento que garanticen la recuperación de este patógeno sobre todo en alimentos con matrices complejas y en presencia de una flora acompañante abundante. En este sentido la técnica de inmunoseparación magnética (ISM), ha surgido como una herramienta de utilidad para su aislamiento, sin embargo, algunos autores han reportado dificultades en su aplicación, en especial por la absorción inespecífica de ciertos grupos microbianos en especial de la familia *Enterobacteriaceae*. También se expresan dificultades cuando este patógeno es sometido a estrés por procesamiento y al aplicar la ISM no se obtienen los resultados adecuados (9-11).

Ante lo planteado, algunos estudios se han dirigido para lograr el establecimiento de metodologías que tienen como eje central la ISM, aplicando variaciones en cuanto a las condiciones de enriquecimiento del alimento para inhibir la flora acompañante y aumentar el número de blancos de *Escherichia coli* O157:H7 a ser capturados, todo esto variando el tipo de caldo y el uso de sustancias inhibitorias, y además, optimizar el aislamiento del inmunoseparado a través de distintos tipos de medios de aislamiento selectivos y diferenciales una vez aplicada la ISM (9,12,13), todo esto con la finalidad de lograr el mejor protocolo para la ISM que garantice el máximo de eficiencia en la recuperación del microorganismo según las características del alimento.

En este sentido, el presente estudio tuvo como objetivo la evaluación de distintos esquemas de aislamiento para *Escherichia coli* O157:H7 utilizando como eje central la técnica de ISM, y empleando como sustrato, cremas de leche

no pasteurizadas inoculadas artificialmente con distintos niveles del patógeno; destacándose que este producto posee todas las características potenciales para ser un vehículo para este microorganismo, dadas las condiciones de manufactura del mismo, que en términos generales, no guarda las mínimas condiciones de higiene, aspecto que a sido evaluado a través de distintos estudios y los cuales reflejan que la calidad de las cremas de leche que se expenden en el país aparentemente no está ajustada a la normativa oficial (14,15). A tal efecto, las variaciones en el protocolo de la ISM incluyó el uso de distintos caldos de enriquecimiento previos a la ISM y utilización de distintos medios selectivos y/o diferenciales para el aislamiento del microorganismo una vez aplicada la ISM.

MATERIALES Y METODOS

Enumeración de aerobios mesófilos y coliformes totales en las cremas de leche: Con la finalidad de conocer la calidad microbiológica de las muestras de crema de leche, con las cuales se prepararon las unidades experimentales (porciones de 25 g c/u preparadas a partir de una mezcla madre de cremas de leche) que fueron inoculadas artificialmente, se analizaron un total de 20 unidades, determinándose el recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales. Las mismas se adquirieron en un mercado popular de la ciudad de Valencia obteniéndose siempre unidades de la misma marca, siendo trasladadas al laboratorio bajo condiciones de refrigeración ($5 \pm 2^\circ\text{C}$) y analizadas a la brevedad posible. Se analizaron en el lapso de cuatro semanas consecutivas a razón de 5 unidades por semana. La metodología utilizada es la descrita por la American Public Health Association (16).

Aislado de *Escherichia coli* O157:H7 utilizado para la inoculación de las unidades experimentales: El aislado utilizado para la inoculación de las unidades experimentales fue una cepa de *Escherichia coli* O157:H7 verotoxigénica, adquirida de la colección del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCVM), catalogada como ATCC: 35150 (N° de acceso en el CVCVM: 422). Este aislado se mantuvo viable por repiques en agar cerebro corazón (ACC) semisólido incubado a temperatura ambiente, realizando subcultivo cada dos meses. Antes de la preparación del inóculo, se determinó la pureza del aislado por cultivo en agar soya tripticasa incubado por 24 horas/ 35°C , confirmándose por siembra en agar MacConkey sorbitol (AMS) (24 horas/ 35°C), test bioquímicos (fenotipia) y caracterización serológica con antisuero monoclonal específico de grupo O157 (Fuvesin, Biomedicina, UCV, Venezuela).

Preparación del inóculo: Para la obtención del inóculo a utilizar para la contaminación artificial de las unidades experimentales, el aislado de *Escherichia coli* O157:H7 se

cultivó en caldo soya tripticasa (CST) incubándose a 37°C por 18 horas. A partir de este cultivo se tomó un volumen y se preparó una dilución en buffer fosfato salino-twen 20 (PBS-T20) ajustándose la densidad bacteriana de la misma, a la equivalente del patrón de MacFarlan N° 5 ($1,2 \times 10^8$ células/ml), utilizando un espectrofotómetro (Spectronic-20, Bausch-Lomb, USA) a una absorbancia de 520 nm. Ajustada esta suspensión se procedió a la preparación de diluciones decimales en PBS-T20 con la finalidad de inocular las unidades experimentales.

Preparación de las unidades experimentales y contaminación artificial con la suspensión de *Escherichia coli* O157:H7: A partir de 5 unidades de crema de leche, cuyas características ya fueron descritas, se tomaron 200 g por unidad para preparar una mezcla madre y partir de ésta obtener las unidades experimentales. Estas últimas estuvieron constituidas por porciones de 25 g cada una, depositadas en bolsas plásticas de cierre hermético previamente esterilizadas por UV. Las mismas, fueron inoculadas con 250 µl de la dilución decimal adecuada (suspensión de *E. coli* O157:H7 en PBS-T20), para obtener niveles de inóculo de aproximadamente 50, 10 y 1 célula por g de crema de leche según la metodología descrita por Hara-Kudo y col. (10); cada uno de los inóculos fueron ensayados para tres caldos de enriquecimiento, para la posterior aplicación de la ISM, y luego la siembra del inmunoseparado en tres medios de aislamiento distintos. Simultáneamente a porciones de 25 g de crema sin inocular se les practicó los mismos protocolos de aislamiento, basados en ISM, para descartar la presencia del microorganismo en forma natural. Estas muestras sin inocular se consideraron como controles negativos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Aplicación de los protocolos de IMS para la recuperación y aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en las unidades experimentales

Enriquecimiento: Para comparar la eficiencia de tres caldos de enriquecimiento previos a la ISM, se procedió a la incubación de las unidades experimentales contaminadas y sin contaminar, en tres tipos de caldos: agua de peptona buferada suplementada con vancomicina (8 mg/ml) (APB-V), agua de peptona buferada suplementada con vancomicina y cefixime (50 ng/ml) (APB-VC) y caldo soya tripticasa suplementado con vancomicina, cefixime y telurito (2,5 µg/ml) (CST-VCT). Se adicionó por cada unidad experimental 225 ml del caldo respectivo y se incubó a 35°C por 18 horas. Transcurrida la incubación, se tomaron alícuotas de 1 ml de caldo por cada unidad experimental y se depositaron en 9 ml de PBS-T20, preparándose a partir de esta suspensión diluciones decimales hasta el orden de 10^{-3} ; de esta última se

tomó el volumen correspondiente para aplicar la ISM.

Aplicación de la ISM y aislado del inmunoseparado en medios diferenciales y selectivos: A partir de la suspensión 10^{-3} , se tomó 1 ml y se depositó en tubos Eppendorf de 1,5 ml donde previamente se colocó 20 µl de la suspensión de esferas magnetizadas recubiertas con anticuerpos específicos para *Escherichia coli* O157 (Dynabeads anti-*E. coli* O157, DYNAL BIOTECH, Oslo; Dinamarca). Esta Mezcla fue colocada en vórtex por 10 min a temperatura ambiente y bajas revoluciones. Transcurrida la incubación, los tubos se colocaron en el equipo de inmunoseparación (MPC-10, DYNAL BIOTECH, Oslo; Dinamarca), aplicándose un campo magnético para la concentración de las esferas. El sobrenadante fue descartado, retirándose el magneto y resuspendiéndose el inmunoseparado en solución de lavado (PBS-T20 salino, pH 7,0); este procedimiento fue repetido por 5 veces consecutivas. De la suspensión obtenida en el último lavado se procedió a tomar alícuotas de 25 µl cada una, las cuales fueron depositadas sobre agar MacConkey sorbitol (AMS), agar MacConkey sorbitol suplementado con telurito y cefixime (AMS-TC) y agar cromogénico (Himedia Laboratpries, Bombay, India) suplementado con telurito y cefixime (ACRG-TC), incubándose a 35°C por 24 horas. Se realizó recuento de colonias típicas no fermentadoras de sorbitol en agar AMS y AMS-TC y MUG negativas en ACRG-TC comparándolas con el crecimiento patrón del aislado ATCC: 35150 sobre estos medios. Una muestra aleatoria (constituida por 5 colonias típicas) de los aislamientos incoloros obtenidos sobre estos tres medios, fueron confirmados como *Escherichia coli* O157, a través de caracterización bioquímica (fenotipia) y serológica (antisuero anti-*E. coli* O157, FUVESIN-UCV, Caraca, Venezuela). Esta muestra aleatoria se uso para la obtención del porcentaje de células viables de *Escherichia coli* O157:H7 recuperadas por cada tratamiento.

Análisis de los datos: A los datos obtenidos se les aplicó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y una prueba de intervalos múltiples de Duncan, utilizando el paquete estadístico Statgraph versión 2,1.

RESULTADOS

Enumeración de aerobios mesófilos y coliformes totales: En la Tabla 1, se compendia el recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales en cremas de leche obtenidos en un período de cuatro semanas (5 unidades de crema/semana). El número promedio de aerobios mesófilos fue de $6,3 \times 10^7$ UFC/g con un recuento máximo de $2,1 \times 10^8$ UFC/g hacia la tercera semana y un mínimo de $6,7 \times 10^6$ UFC/g, en la primera semana. La media para coliformes totales se ubicó en $2,6 \times 10^4$ UFC/g, siendo su valor máximo de $8,0 \times 10^4$ UFC/g

(tercera semana) y $1,2 \times 10^2$ UFC/g la menor cifra (primera semana). Del total de muestras analizadas ($n=20$), el 100% de las mismas estuvo fuera de especificación, para ambos indicadores sanitarios según la normativa vigente nacional e internacional.

TABLA 1
Recuento de aerobios mesófilos y coliformes totales en cremas de leche

Semana [†]	Aerobios mesófilos		Coliformes totales	
	Recuento (UFC/g)	DS*	Recuento (UFC/g)	DS
1	$6,7 \times 10^6$	$6,4 \times 10^6$	$3,4 \times 10^2$	$4,8 \times 10^2$
2	$2,6 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$	$3,1 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
3	$2,1 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$	$8,0 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4$
4	$7,4 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$
Total [‡]	$6,3 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$	$2,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$

*Desviación estandar.

[†] Se analizó un total de cinco (5) muestras por semana.

[‡] $n = 20$ muestras.

Comparación de los caldos de enriquecimiento: El tipo de caldo utilizado para el enriquecimiento de las unidades experimentales de crema de leche influyó significativamente ($p<0,05$) en el porcentaje de recuperación del aislado de *Escherichia coli* O157:H7 inoculado artificialmente. Los Gráficos 1, 2 y 3, demuestran los porcentajes de recuperación según el caldo y medio de aislamiento utilizado, considerando los tres niveles de inóculo. Los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron con el caldo CST-VCT, denotando valores entre 90% y 85% para el inóculo de 50 cel./g, entre un 65% y 55% con 10 cel./g y un 85% y 30% en niveles de 1 cel./g, según el agar de aislamiento utilizado. Considerando los tres niveles de inóculo y los diferentes agares diferenciales y/o selectivos ensayados, el porcentaje promedio de recuperación de aislados viables del patógeno, al utilizar CST-VCT, fue del 70%. Estos porcentajes disminuyeron significativamente ($p<0,05$) con el enriquecimiento en APB-V y APB-VC. El rango de recuperación cuando se utilizó APB-V estuvo comprendido entre 80% y 40% para inóculos de 50 cel./g, disminuyendo significativamente, con niveles de inoculación de 10 y 1 cel./g respectivamente. Valores similares se obtuvieron con el enriquecimiento en APB-VC, de este modo, unidades experimentales contaminadas con 50 cel./g del patógeno arrojaron porcentajes de recuperación en un rango del 85% a 68%, mientras que con inóculos de 10 cel./g y 1 cel./g el promedio de recuperación fue de 40% y 43,5% respectivamente. El análisis de los datos indica, que los porcentajes de recuperación, al utilizar tanto APB-V como APB-VC, no difieren significativamente entre sí.

GRAFICO 1

Porcentaje de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 confirmado por bioquímica y serología; inóculo de 50 cel/g de crema de leche

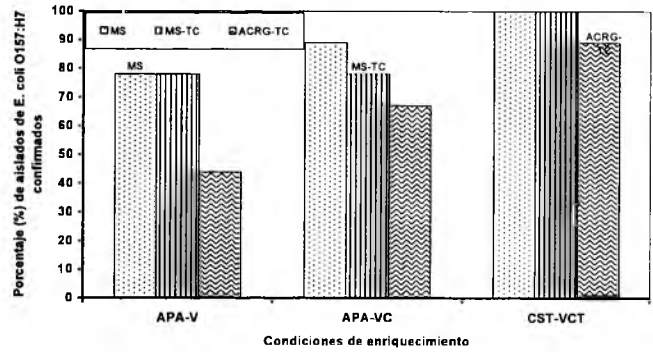


GRAFICO 2

Porcentaje de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 confirmado por bioquímica y serología; inóculo de 10 cel/g de crema de leche

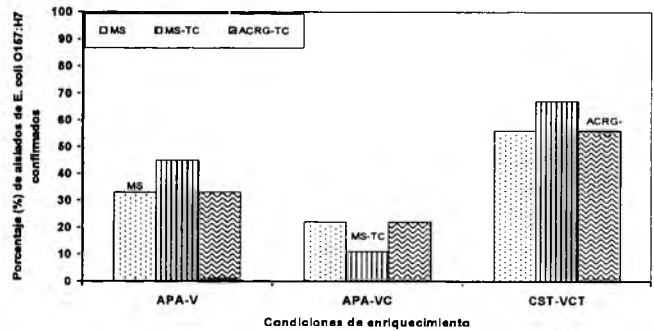
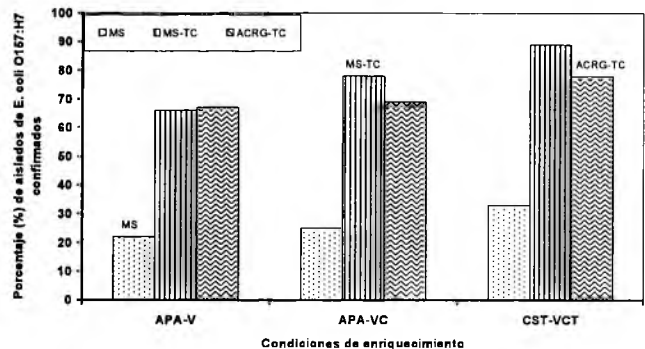


GRAFICO 3

Porcentaje de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 confirmado por bioquímica y serología; inóculo de 1 cel/g de crema de leche



Comparación de medios de aislamiento: No existió diferencia significativa en el porcentaje de células recuperadas y confirmadas como *Escherichia coli* O157:H7 según el medio de aislamiento utilizado ($p > 0,05$). El comportamiento del aislado en los agares AMS, AMS-TC y ACRG-CT es reflejado en los Gráficos 1, 2 y 3. Las variaciones en los porcentajes de recuperación son influenciados, por las condiciones de enriquecimiento y no por el tipo de agar diferencial o selectivo usado. Del mismo modo, la flora asociada aparentemente no mostró indicios de haber sido afectada por el uso de sustancias inhibitoras o reveladores cromogénicos suplementadas en dichos agares (datos no tabulados).

Comportamiento de las tasas de recuperación según el nivel de inóculo: El nivel de inóculo influyó significativamente ($p < 0,05$) en la tasa de recuperación de células del patógeno para los distintos protocolos de aislamiento. La recuperación fue mayor en las unidades experimentales inoculadas con 50 cel./g, promediando un 83% de aislamientos positivos cuando se usó el esquema CST-VCT/ISM/+siembra en AMS/AMS-TC/ACRG-CT, un 78% para APB-V/ISM/+siembra en AMS/AMS-TC/ACRG-TC y 68% con APB-VC/ISM+siembra en AMS/AMS-CT/ACRG-CT. Para los inóculos de 10 cel./g y 1 cel./g, los porcentajes de recuperación fueron significativamente menores. En promedio, el esquema CST-VCT/ISM+siembra en AMS/AMS-TC/ACRG-TC, permitió un porcentaje de recuperación de 58 % para el nivel de 10 cel./g y 62% para inóculos de 1 cel./g. Con APB-V/ISM+siembra AMS/AMS-TC/ACRG-TC la recuperación promedio, para los niveles de 10 y 1 cel./g, fue del 50% y 38% respectivamente. Al utilizar APB-VC/ISM+siembra AMS/AMS-TC/ACRG-TC un 16% de los aislados, para el inóculo de 10 cel./g, fueron confirmados como *Escherichia coli* O157:H7, mientras que un 55% de los aislados resultaron positivos con este esquema para inóculos de 1 cel./g.

DISCUSION

El ganado bovino ha sido identificado como uno de los principales reservorios de *Escherichia coli* O157:H7 verotoxigénicas en regiones como Norteamérica, Europa y Asia, donde se reportan porcentajes de colonización que varían entre un 1,5% y 10% en rebaños de pastoreo (4). Así mismo, en Latinoamérica, algunos estudios reportan datos cercanos a estos resultados en cuanto a tasas de colonización del ganado vacuno (17,18). Es por esto, que la mayor cantidad de brotes ocurridos en estas áreas geográficas han tenido su asociación con alimentos de origen bovino en especial derivados lácteos y de los cuales, un gran porcentaje han tenido consecuencias graves para la población afectada.

Esto permite inferir que las cremas de leche que se expenden en mercados populares de Venezuela, representan

un derivado lácteo con todas las potencialidades para ser vehículo de muchos patógenos, entre ellos, *Escherichia coli* O157:H7. De hecho, del análisis microbiológico efectuado sobre las cremas de leche utilizadas en el presente estudio se desprende que su calidad sanitaria no es la más apropiada. El recuento de aerobios mesófilos fue de $6,3 \times 10^7$ UFC/g, mientras que el número de coliformes totales se ubicó en $2,6 \times 10^4$ UFC/g, valores que se encuentran fuera de especificación según las normativas Venezolanas de calidad alimentaria (19). En estudios previos esta condición de precariedad higiénica del producto ha sido reportada, incluyendo tanto cremas de leche pasteurizadas como no pasteurizadas. Pita y Reyes (15), en un estudio sobre cremas de leche no pasteurizadas, reportan que el 100% de las unidades analizadas presentaron recuentos de aerobios mesófilos por encima de los niveles permisibles y un 75% contienen cifras de coliformes totales, fuera de los parámetros establecidos por las normas regulatorias. De igual forma, de Tamsut y García (14), al evaluar cremas de leche pasteurizadas obtuvieron resultados comparables, reportando un 75% de las muestras fuera de la normativa nacional e internacional en relación con el número de aerobios mesófilos, y un 91% de las mismas con recuentos de coliformes totales por encima de lo permitido.

Ante estas evidencias sobre la poca calidad sanitaria que presentan las cremas de leche, condicionada por la presencia de un elevado número de microorganismos saprófitos y quizás algunos patógenos, este producto resultó ser un sustrato adecuado para desafiar la utilidad de la ISM como método de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7, microorganismo que de encontrarse en el producto estará en bajo número. Otro aspecto importante es lo relacionado con sus características tales como el contenido graso y proteico, presentándose como una matriz compleja para la recuperación de este germen. Esto permite inferir que de existir contaminación por *Escherichia coli* O157:H7 es necesario aumentar su número e inhibir considerablemente la flora acompañante, de allí que la relación de un adecuado caldo de enriquecimiento previo a ISM, así como el uso de medios selectivos y diferenciales para la siembra del inmunoseparado es indiscutible.

En este estudio se demostró la influencia que ejerce, el tipo de caldo de enriquecimiento seleccionado, en la proporción de células viables de *Escherichia coli* O157:H7 recuperadas a partir de cremas de leche inoculadas artificialmente. Los resultados obtenidos al evaluar tres caldos de enriquecimiento suplementados con distintas sustancias inhibitoras, denotan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en el porcentaje de aislamientos confirmados como *Escherichia coli* O157:H7 según el caldo de enriquecimiento aplicado. El enriquecimiento en CST-VCT resultó el de mayor eficiencia para el incremento del número de blancos a ser capturados por ISM (Gráficos 1, 2 y 3). El porcentaje de colonias del patógeno confirmadas fue en promedio del 70%,

porcentaje obtenido sobre la base de los tres medios de aislamiento y los tres niveles de inóculo ensayados. Estos valores fueron significativamente menores con el uso de APB-V y APB-VC, ubicándose en 52% y 50% respectivamente. Datos aportados por otros autores, denotan diferencias considerables, en las tasas de recuperación de este patógeno al aplicar ISM, según el procedimiento de enriquecimiento empleado (10,20,21). En este sentido, muchos factores tales como tiempo de incubación, temperatura, composición del medio, pH y uso de sustancias inhibitoras (antibióticos y/o sales inorgánicas) afectan el crecimiento y posterior detección de este microorganismo.

Comparando los resultados de este estudio con datos aportados por otros autores se puede determinar que el caldo CST, suplementado con distintas sustancias inhibitoras, ofrece resultados variables en cuanto a su eficiencia como medio de enriquecimiento para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en matrices complejas, incluyendo alimentos y heces, caracterizadas éstas por la presencia de una microflora abundante. En este sentido, Hara-Kudo y col. (10), describen excelentes porcentajes de recuperación en el aislamiento de los serotipos O26 y O157 en cárnicos al enriquecer en CST suplementado con cefixime, cefsulodin y vancomicina al igual que con CST-VCT, ensayando inclusive distintas temperaturas de incubación (37 y 42°C). Así mismo, Ogden y col. (11), al utilizar CST suplementado con novobiocina y sales biliares obtuvieron una alta proporción de aislamientos viables recuperados, en alimentos tales como quesos, cidras de manzana y pepperoni. Sin embargo, en algunos reportes la utilidad del CST ha sido desestimada, de hecho, Voitoux y col. (21), destacan el bajo desempeño del CST, bien sea sólo o con la adición de inhibidores, en comparación con el caldo EC con novobiocina en la recuperación de este patógeno en carne molida y alfalfa.

Al igual que en el análisis anterior, la eficiencia de APB, suplementada o no con distintos inhibidores, presenta amplia variabilidad en sus índices de eficiencia en la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 según el tipo de sustrato a enriquecer. Foster y col. (22), en un estudio efectuado en heces de bovinos, hallaron excelentes resultados en la recuperación del microorganismo al utilizar APB sin inhibidores y acoplada a ISM; destacan la habilidad de APB en favorecer la recuperación de células lesionadas. No obstante, estos mismos autores al enriquecer en APB suplementada con vancomicina, cefsulodin y cefixime reportaron una disminución significativa en las tasas de recuperación en este mismo sustrato. Así mismo, Chapman y col. (23), al usar APB sin aditivos, lograron tasas de recuperación cercanas al 72,6%. Esto refleja que el tipo de enriquecimiento a aplicar sobre el sustrato, previo a ISM, es un elemento vital para no subestimar la presencia del patógeno en un alimento u otro sustrato, por cuanto, tanto en este estudio como en investigaciones anteriores, es muy variable la

respuesta de la ISM según el caldo empleado, de hecho, en la presente investigación el desenvolvimiento de los caldos APB-V y APB-VC fue menos eficiente en comparación con CST-VCT. En todo caso, la recomendación más importante es poder aplicar al menos dos tipos de caldos para garantizar una mayor probabilidad en la recuperación.

En los Gráficos 1, 2 y 3, se presenta además, el efecto que sobre los porcentajes de recuperación ejerció el tipo de medio diferencial y/o selectivo ensayado. Tal y como fue descrito, el tipo de agar de aislamiento no influyó significativamente en los porcentajes de recuperación. Tanto el AMS como el AMS-TC arrojaron resultados similares en la proporción de células confirmadas como *Escherichia coli* O157:H7, así mismo, estos dos medios, en relación con la eficiencia de un medio cromogénico ensayado, no fue significativa ($P > 0,05$). Muchos autores destacan la importancia en la selección del agar de aislamiento para la siembra del inmunoseparado, por cuanto, permitirá la adecuada diferenciación del patógeno frente a un grupo considerable de flora acompañante que debería ser inhibida. Esto cobra aún mayor fuerza dado el reporte, por parte de muchos autores, sobre la absorción inespecífica de grupos bacterianos (*Proteus spp*, *Enterobacter spp*, otros serotipos de *E. coli*) distintos a *Escherichia coli* O157, que sobre las inmunoperlas ocurre al aplicar la ISM, aspecto que también fue corroborado en el presente estudio (datos no tabulados) (9,24). El agar AMS es el medio recomendado dada la incapacidad de los serotipos O157 de fermentar el sorbitol, lo que facilita su reconocimiento en este medio, además de la ausencia de sustancias inhibitoras favorece la recuperación de células estresadas (11). Sin embargo, la existencia de otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae* incapaces de fermentar el sorbitol puede inducir falsos positivos. En este sentido, es recomendable la adición de sustancias inhibitoras como antibióticos (cefixime, cefsulodin, vancomicina) o sales inorgánicas (telurito) para hacerlo selectivo frente a estos géneros de la familia *Enterobacteriaceae* que interfieren en el reconocimiento de *Escherichia coli* O157. Sin embargo, los datos aportados por este estudio no permiten establecer una diferencia en cuanto a la proporción de células de *Escherichia coli* O157:H7 al usar AMS y los medios inhibidores AMS-TC o ACRG-TC. No obstante, autores como Weagant y col. (12), obtuvieron resultados satisfactorios con la aplicación de AMS-TC y un medio cromogénico para la siembra del inmunoseparado. Con este último se logró discernir claramente entre los aislados MUG positivos y las colonias de *Escherichia coli* O157 MUG negativas. En este mismo orden, Restaino y col. (25), al emplear un medio cromogénico, sin compuestos inhibitoras, logró eficiencia en la recuperación del patógeno, siendo significativamente mayores, la proporción de células recuperadas, en comparación con el agar AMS. Esta variabilidad en los datos aportados por diferentes autores

indica que las probabilidades de recuperación aumentan en función del abanico de posibilidades que se le ofrezca a las células adheridas a las inmunoperlas para desarrollarse, lo que implica utilizar desde medios menos selectivos a medios de mayor selectividad. Además, es importante reconocer que en la selección del medio también juega un papel importante la propiedad que presente el medio para poder distinguir más de una característica fenotípica del serotipo O157, es decir su incapacidad para fermentar el sorbitol e incapacidad para hidrolizar el ácido β -D-glucurónico aspecto que se destaca en muchos medios comerciales conocidos como cromogénicos.

Se desprende del presente estudio que la técnica ISM resultó ser una herramienta valiosa para la recuperación de *Escherichia coli* O157:H7 en una matriz compleja como cremas de leche a inóculos bajos. Aunque se observó diferencias significativas en los porcentajes de recuperación para los tres inóculos ensayados se logró su recuperación en cada uno de ellos, ubicándose siempre para los distintos tratamientos aplicados, sobre el 50%. En conclusión, la eficiencia de la técnica está condicionada por el tipo de caldo de enriquecimiento, el número en que se encuentre este patógeno, así como, la calidad y cantidad de la flora asociada. En función de esto se puede establecer que el mejor esquema de aislamiento, sobre la base de ISM, para recuperar *Escherichia coli* O157:H7 en cremas de leche sería el enriquecimiento de la muestra en CST-VCT incubado a 35°C por 24 horas, aplicación de ISM y siembra tanto en medio diferencial poco selectivo (AMS) y uso de algún medio diferencial cromogénico suplementado con alguna sustancia inhibidora.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen el apoyo brindado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela (CDCH-UC), por el financiamiento parcial del presente proyecto, así como también, al Personal Técnico del Departamento de Microbiología de la facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo por el soporte técnico.

REFERENCIAS

- DeCory RT, Durst RA, Zimmerman SJ, Garringer LA, Paluca G, DeCory HH, *et al.* Development of an immunomagnetic assay for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 in aqueous samples and comparison of the assay with a standard microbiological method. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71(4): 1856-1854.
- Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux J, Reynaud A, Scheutz F, *et al.* Prevalence and Characterization of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one year prospective study in France. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (9): 1023-1031.
- Hiramatsu R, Matsumoto M, Miwa Y, Suzuki Y, Saito M and Miyasaki, Y. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (3):922-925.
- MacDonough P, Rossiter C, Rebhum R, Stehman S, Lein D and Shin S. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 from cull dairy cows in New York state and comparison of culture methods used during preharvest food safety investigations. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1): 318-322.
- Osawa R., Iyoda S, Nakayama S, Wada A, Yamai, S. and Watanabe H. Genotypic variations of Shiga toxin-converting phages from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates. *J Med Microbiol* 2000; 49: 565-574.
- Stephan R and Untermam F. Virulence factors and phenotypic traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolate from asymptomatic human carriers". *J Clin Microbiol.* 1999; 37 (5): 1570-1572.
- Chiueh L, Shiang W and Shih D. Characterization of *Escherichia coli* serotype O157 strains isolated in Taiwan by PCR and multilocus enzyme analysis. *J Food. And Drug Analysis.* 2001; 9(1): 12-19
- Fujisawa T, Sata S, Aikawa K, Takahashi T, Yamai S and Shimada T. Modification of sorbitol MacConkey sorbitol medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(7): 3117-3118.
- Tomoyasu T. Improvement of the immunomagnetic separation methods selective for *Escherichia coli* O157 strains. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64(1): 376-382.
- Hara-Kudo Y, Ikeda M, Kodaka H, Nakagawa H, Goto K, Masuda H, *et al.* "Selective enrichment with a resuscitation step for isolation of freeze-injured *Escherichia coli* O157:H7 from Foods". *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(7): 2866-2872.
- Ogden I, Hepburn N and MacRae R. "The optimization of isolation media used in immunomagnetic separation methods for detection of *Escherichia coli* O157 in food". *J Appl Microbiol.* 2001; 91: 373-379.
- Weagant S and Bound R. Evaluation of techniques for enrichment and isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from artificially contaminated sprouts". *Int J Food Microbiol.* 2001; 71(1):87-92.
- Novicki TJ, Daly JA, Mottice SL, and Carroll KC. Comparison of sorbitol MacConkey agar and a two-step method which utilizes enzyme-linked immunosorbent assay toxin testing and a chromogenic agar to detect and isolate enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 2000; 38 (2): 547-551.
- de Tamsut, L y García, E. "Calidad microbiológica de las cremas de leche pasteurizadas elaboradas en Venezuela". *Arch Latinoamer Nutri.* 1999; 49(1):76-80.
- Pita, M y Reyes, C. Calidad microbiológica y caracterización de *Escherichia coli* O157 en cremas de leche no pasteurizadas de fabricación artesanal. Tesis de Pregrado. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. 2003.

16. American Public Health Association (APHA). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Third edition. Compilado por la APHA technical committee on microbiological methods for foods. Washington DC. 1992.
17. Chinen I, Tanaro J, Miliwebsky E, Lound L, Chillemi G, Ledri S, *et al.* Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot.* 1999; 64(9):1346-1351.
18. Rivas M, Caletti M, Chinen I., Refi S, Roldán C, Chillemi G, *et al.* Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremia syndrome, Argentina. *Emerg Inf Dis.* 2003; 9(9): 1184-1186.
19. Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Crema de leche para consumo directo. 1993; Norma 3046-93. Venezuela.
20. Lejeune JT, Besser TE, Rice DH, and Hancock DD. Methods for isolation of water-borne *Escherichia coli* O157. *Lett Appl Microbiol.* 2001; 32: 316-320.
21. Voitoux E, Lafarge V, Collette C, and Lombard B. Applicability of the draft standard method for the detection of *Escherichia coli* O157 in dairy products. *Int J Food Microbiol.* 2002; 77(3): 213-221.
22. Foster G, Hopkins G, Gunn G, Tement H, Thomson F, Knight H, *et al.* A comparison of two pre-enrichment media prior to immunomagnetic separation for the isolation of *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J Appl Microbiol.* 2003; 95(1):155-160.
23. Chapman P, Malo A, Siddons C, and Harkin P. Use of comercial enzyme immunoassays and immunomagnetic separation systems for detecting *Escherichia coli* O157 in Bovine fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63(7): 2549-2553.
24. Ribeiro AR, do Nascimento VP, Cardoso MO, dos Santos LR, da Silveira SL. Utilization of immunomagnetic separation for detection of *Salmonella* in raw broiler parts. *Braz J Microbiol.* 2002; 33:339-341.
25. Restaino L, Frampton E, Turner K, and Allison D. A chromogenic plating medium for isolating *Escherichia coli* O157:H7 from beef. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 29:26-30.

Recibido: 25-04-2006

Aceptado: 14-08-2006