

Universitas

Enero-Junio
de 2001

SCIENTIARUM

ISSN 0122-7483



$$-\int \frac{Gdm}{S^2} \cos \phi$$



Volu m e m

6

Nº 1



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD JAVERIANA
Revista de la Facultad de Ciencias



DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* O157 A PARTIR DE PRODUCTOS CÁRNICOS Y LÁCTEOS ARTESANALES EMPLEANDO DOS SISTEMAS DE AISLAMIENTO

Franco U. Lina; Vargas P. Ximena
Mendoza I. Alberto; Bayona R. Martín ; Plaza Ada

Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias,
Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 43-82. Bogotá D.C. Colombia.

Lina Franco Urrutia. e-mail linafu@hotmail.com
Ximena Vargas Puentes. e-mail ximec10@mixmail.com

RESUMEN

Con el objeto de determinar la presencia de *E.coli* O157 en alimentos, se analizaron 300 muestras de productos cárnicos y lácteos artesanales. Para su aislamiento e identificación se utilizaron dos técnicas; una tradicional donde después de seis horas de incubación de la muestra en agua peptonada al 1% suplementada con novobiocina (20 mg/L) se inocularon placas con agar Mac Conkey Sorbitol. Por medio de esta técnica se identificó *Escherichia coli* O157 a partir de una sola muestra (0.33%) de las 300 analizadas correspondiente a un derivado cárnico (hamburguesa); también se identificó *E.coli* en un 1.6%. Simultáneamente se realizó una técnica rápida con Agar Fluorocult, para *E.coli* O157: H7, y de las trescientas muestras aisladas se identificaron microorganismos como *Escherichia coli* O157 (0.33%), *E. coli* (25%), *Shigella sonnei* (10%), *E. aerogenes* (9%), *P. mirabilis* (4%). De las dos técnicas ensayadas estas presentaron el mismo porcentaje de recuperación de *Escherichia coli* O157.

El método rápido, utilizando Agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7 permitió obtener resultados presuntivos para *E. coli* O157 en 24 horas y resultados confirmatorios en 48 horas. En contraste el método tradicional utilizando agar Mac Conkey Sorbitol permitió obtener resultados presuntivos para *E. coli* O157 en 24 horas y resultados confirmatorios en cinco días. Los métodos y técnicas utilizadas permiten que este estudio pueda reproducirse fácilmente con resultados puntuales.

Palabras claves: agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7; alimentos; *Escherichia coli* O157; métodos de diagnóstico.

ABSTRACT

With the intention of determining the presence of *E. coli* O157 in foods, in the North zone of the Sabana of Bogotá, 300 artisan meat and milky product samples were analyzed. For their isolation and identification two techniques were used; a traditional one where after six hours of incubation in water peptonada to supplementada 1% with novobiocina (20 mg/L) boards of agar Mac Conkey Sorbitol inoculated. By means of this technique *Escherichia coli* O157 from a single sample (0.33%) of 300 analyzed the corresponding one to a meat derivative (hamburger); also *E. coli* in 1.6% was identified. Simultaneously a fast technique with Fluorocult, Agar for *E. coli* O157: H7 and of the three hundred isolated samples microorganisms like *Escherichia coli* O157 (0.33%), *E. coli* (25%), *Shigella sonnei* (10%), *E. aerogenes* (9%), *P. mirabilis* (4%). Of the two tried techniques these presented/displayed the same percentage of recovery of *Escherichia coli* O157. The fast method, using Fluorocult, Agar for *E. coli* O157: H7 allowed to obtain presuntivos

results in 24 hours and confirming results in 48 hours. In resistance the traditional method using to agar Mac Conkey Sorbitol allowed to obtain presuntivos results in 24 hours and confirming results in five days. The methods and used techniques allow that this study can reproduce easily with precise results.

Key words: diagnostic methods; *Escherichia coli* 0157; Fluorocult, Agar for *E. coli* 0157: H7; foods.

INTRODUCCIÓN

Se conocen distintas clases de *Escherichia coli*, algunas son inocuas, mientras otras causan diarreas, enfermedades septicémicas y síndromes de diversa gravedad. En los últimos años ha aparecido una nueva variante conocida como *Escherichia coli enterohemorrágica* 0157: H7, siendo reconocido como microorganismo perjudicial para el hombre, causante de moderados índices de morbilidad y mortalidad (Marsden, 1994) relacionándose con la aparición de Colitis Hemorrágica (CH) que se caracteriza por un repentino e intenso dolor abdominal seguido por diarrea acuosa y sanguinolenta, vómito y presencia o no de fiebre. El Síndrome, Urémico Hemolítico (SUH) se considera una consecuencia de la Colitis Hemorrágica en niños y causa de insuficiencia renal que puede progresar a Púrpura Trombocitopenia Trombocítica (PTT) produciendo alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) que termina en coma y muerte, todos estos asociados con el consumo de alimentos (Luna *et al.* 1996, Máttar *et al.* 1998).

Los bovinos parecen constituir la fuente principal de este agente patógeno, que es transmitido al hombre por el consumo de alimentos contaminados, como carne, leche y los productos que de ellos se derivan (Bonnie *et al.* 1990). La infección puede también resultar de una contaminación fecal del agua y de varios alimentos, o de una contaminación cruzada durante la preparación de los mismos. Las hamburguesas, jugo de manzanas frescas, yoghurt, salami, queso madurado y el maíz hervido, han sido implicados en brotes epidémicos (Bennett *et al.* 1990). De otra parte la bacteria tiene la capacidad de sobrevivir bajo condiciones de refrigeración y congelación así como a pHs extremos (Garland & Kaspar 1994); características que la hacen

importante en el campo de la salud pública como factor de riesgo para la población.

Esto ha llevado al desarrollo de métodos rápidos y sensibles para detectar *E. coli* dirigidos a la determinación cualitativa del serotipo 0157: H7 debido a que con un número bajo de células se puede presentar la enfermedad (Ahmed & Conner, 1995, Bennett *et al.* 1995, Weagant *et al.* 1995). Por consiguiente los métodos de aislamiento y diferenciación a partir de alimentos deben tener en cuenta, que el microorganismo se puede encontrar en bajas concentraciones y que las células bacterianas pueden estar injuriadas y acompañadas por flora competitiva que puede ser sorbitol negativa (Bennett *et al.* 1990).

El presente trabajo tuvo como objetivo aislar e identificar *Escherichia coli* 0157 a partir de muestras de cárnicos y lácteos tomados de productos que se venden en la vía pública de diferentes municipios de la Sabana de Bogotá y adicionalmente comparar el método tradicional para el aislamiento de *Escherichia coli* 0157 con un método rápido comercial que permite reducir el tiempo de análisis de las muestras.

Este trabajo hace parte de una línea de investigación, que estudia aspectos relacionados con la microecología del microorganismo con el objeto de determinar la prevalencia de *E. coli* 0157, en un área específica del país.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos empleados en el estudio

Cepas de *Escherichia coli* 0157: H7 IAL-Canadá, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* CDC 305 y *Enterobacter aerogenes* Lara C Brasil cultivadas en caldo infusión cerebro corazón – BHI (MERCK) a 35°C por 24 horas.

2. Validación de las dos técnicas

Se realizó la prueba de productividad y selectividad (OPS, 1994) con tres repeticiones para las dos técnicas a evaluar.

Productividad. Se empleó el caldo de cultivo selectivo (agua peptonada 1% + novobiocina) (MERCK) para desarrollar un cultivo axénico de la cepa deseada *Escherichia coli* O157: H7 con un inóculo de 20 UFC o menos. Al inocular el microorganismo en placas con agar selectivo Agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7 (MERCK) y Agar Mac Conkey Sorbitol (OXOID) y no selectivo Agar nutritivo (MERCK) se debe manifestar cualquier interacción de los medios líquidos con los sólidos.

Selectividad. El desarrollo de las cepas deseadas *Escherichia coli* O157: H7 en los caldos de enriquecimiento (agua peptonada 1% + novobiocina) (MERCK) que contienen microorganismos competidores no deseables (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter aerogenes*) se debe detectar utilizando la máxima dilución que permita el desarrollo del cultivo axénico.

3. Análisis de las muestras

Se utilizaron dos técnicas, la técnica tradicional a partir de la FDA y el método rápido utilizando Agar Fluorocult® para *E. coli* O157: H7 (MERCK) cuales se realizaron simultáneamente para todas las muestras.

Muestra de alimentos. Se analizaron 300 muestras de productos cárnicos y lácteos en puntos de venta artesanales de cuatro municipios de la Sabana de Bogotá clasificadas en derivados cárnicos (100 hamburguesas), carnes crudas (100), leches crudas (50) y quesos campesinos (50), los cuales fueron distribuidos equitativamente. Este estudio se realizó en los municipios de Sopó, Chía, Cajicá y Zipaquirá. El muestreo fue dividido en seis semanas organizadas por lotes y distribuidas uniformemente por municipio y tipo de muestra. Se aplicó un estudio descriptivo experimental, cuya finalidad fue deter-

minar la presencia de *Escherichia coli* O157, en derivados cárnicos (hamburguesas), carnes crudas, leches crudas y quesos campesinos de municipios de la Sabana Norte de Bogotá.

Con base en estudios realizados recientemente en el país los cuales han presentado una prevalencia de 8.7% (Máttar, 1998), se analizaron 300 muestras teniendo en cuenta que la prevalencia máxima esperada es del 10%, un nivel de confianza del 99% y un margen de error del 5% (Thrusfield, 1990).

En este estudio se empleó un tipo de muestreo probabilístico donde la selección de la muestra se realizó mediante un proceso deliberado y aleatorio con el fin de permitir que cada muestra de alimento del grupo tuviera la misma probabilidad de ser seleccionada. (Thrusfield, 1990).

Para el estudio se empleó el método de Porcentaje. No paramétrico debido al tamaño de la muestra para detectar una diferencia significativa de las magnitudes dadas. (Thrusfield, 1990).

De los diferentes productos se pesaron 25 g y/o ml en 225 ml de agua peptonada al 1% + novobiocina (MERCK), se incubaron a 35°C durante 6 horas y luego se inocularon por aislamiento placas con los agares Mac Conkey Sorbitol (OXOID) y Agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7 (MERCK) que se incubaron a 35°C por 24 horas. Para su confirmación las colonias sorbitol negativas que se desarrollaron en el agar Mac Conkey Sorbitol fueron aisladas en agar nutritivo (MERCK) y se identificaron usando caldo urea, agar KLIGLER, caldo MR-VP, agar citrato seg. SIMMONS, medio de cultivo SIM y agar Fluorocult, VRB (MERCK). Igualmente las colonias sorbitol negativo, MUG negativo que se desarrollaron en Agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7 (MERCK) se aislaron en agar nutritivo, se identificaron con el Test Kit antígeno O157 Diagnostic Reagents *E. coli* O157 Latex Test DR620M (OXOID) junto con los cultivos que presentaban características típicas de *Escherichia coli* O157 de las placas confirmadas bioquímicamente de agar Mac Conkey Sorbitol. Para las dos técnicas las colo-

nias que obtuvieron un resultado positivo con una aglutinación del Látex en un tiempo máximo de un minuto se les realizó la identificación de las toxinas VT1 y VT2 con el kit para la detección de verotoxinas VTEC – RPLA – ID 960 (OXOID).

RESULTADOS

1. Cultivos empleados en este estudio

Durante todo el estudio se realizaron controles y ecométricos de productividad y selectividad con el fin de comprobar la recuperación del microorganismo deseado en relación con un interferente (microorganismo no deseado) obteniéndose siempre resultados satisfactorios (OPS,1994); para el agua peptonada al 1% + novobiocina se realizaron controles positivos (*Escherichia coli* 0157: H7 + y *E. coli* -) para luego ser confirmado el sorbitol en los medios selectivos, caldo urea (*P. mirabilis* +, *Escherichia coli* 0157: H7 -), agar KLIGLER (*Escherichia coli* 0157: H7 Ac/Ac, Gas +, H₂S -, *Pseudomonas aeruginosa* Alk/Alk, Gas -, H₂S -), caldo MR-VP (MR *Escherichia coli* 0157: H7 +, *Enterobacter aerogenes* - y VP *Enterobacter aerogenes* +, *Escherichia coli* 0157: H7 -) agar citrato seg. Simmons (*Enterobacter aerogenes* + y *Escherichia coli* 0157: H7 -) y medio de cultivo SIM (*Escherichia coli* 0157: H7 Indol +, Motilidad +, H₂S -, *Enterobacter aerogenes* Indol -, Motilidad -, H₂S -) Para los agares Mac Conkey Sorbitol, Agar Fluorocult, para *E. coli* 0157: H7 y agar Fluorocult, VRB se realizaron ecométricos para productividad y selectividad, donde se obtuvo un Índice de Crecimiento Absoluto (ICA) entre 4.8 y 5.0 en productividad y 0 para selectividad. Simultáneamente se realizaron controles de esterilidad para todos los medios de cultivo obteniéndose siempre un resultado negativo.

2. Validación de los datos técnicos

Se realizaron tres repeticiones de la prueba de productividad y selectividad (OPS, 1994) obteniéndose resultados similares, es decir para productividad 2 UFC/ml de *Escherichia coli*

0157: H7 al igual que la selectividad; se realizaron confirmaciones de todos los tubos en los dos medios de cultivo selectivos utilizados obteniendo el crecimiento hasta la dilución esperada al igual la biotipificación y serotipificación correspondieron al microorganismo estudiado *Escherichia coli* 0157 ya que no se realizó el antígeno flagelar H7.

3. Análisis de muestras

-Muestras de alimentos: para la técnica tradicional (agar Mac Conkey Sorbitol) de las 300 muestras aisladas, 96 fueron presuntivas de ser *Escherichia coli* 0157 (sorbitol negativo) (32%) y de un total de 480 aislamientos se identificó *Escherichia coli* 0157 en un (0.33%) y *E. coli* en un (1,6%); 153 (51%) muestras no presentaron crecimiento de colonias sorbitol negativo.

Por distribución de alimentos se obtuvieron presuntivas de ser *E.coli* O157 :H7 (sorbitol negativo) de carne cruda (12%), derivados cárnicos (12%), queso campesino (5%) y leche cruda (3%) y no presuntivas de ser *E.coli* O157, en derivados cárnicos (18%), carne cruda (16%), queso campesino (9%) y leche cruda (8%).

De la distribución por municipios de las presuntivas de ser *E. coli* 0157 se encontró que en derivados cárnicos y carne cruda, que fueron muestreados en Sopó, tuvieron la más alta incidencia con un 31 y 32% respectivamente en contraste a la leche cruda y el queso campesino donde su mayor prevalencia de ser *E. coli* 0157 fue en el municipio de Chfá con un 62 y 37% respectivamente (Figura 1).

En la técnica rápida con Agar Fluorocult, para *E.coli* 0157: H7 de las 300 muestras aisladas 42 (14%) fueron presuntivas y de un total de 145 aislamientos se identificaron microorganismos como *Escherichia coli* 0157 (0,33%), *Escherichia coli* (25%), *Shigella sonnei* (10%), *Enterobacter aerogenes* (9%), *Proteus mirabilis* (4%); 196 (65%) muestras no presentaron características sorbitol negativo, MUG negativo.

Por distribución de alimentos se obtuvieron presuntivas en derivados cárnicos (7%), carne

cruda (5.3%), leche cruda (1.7%) y queso campesino (0.33%) y no presuntivas para *E. coli* O157, en carne cruda (24%), derivados cárnicos (19%), queso campesino (13%) y leche cruda (9%).

De la distribución por municipios de las presuntivas se encontró que el municipio con mayor incidencia de presuntivas fue de las muestreadas en Zipaquirá en derivados cárnicos y leche cruda con el 35 y 60% respectivamente, mientras Sopó obtuvo el mayor porcentaje en carne cruda (37%) y en queso campesino solo una muestra fue presuntiva para *E. coli* O157 correspondiente al municipio de Cajicá (Figura 2).

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que el ganado vacuno ha sido reconocido como uno de los más importantes vehículos de transmisión de *E. coli* O157: H7 (Mead & Griffin 1998), se eligieron como grupos de análisis productos cárnicos y lácteos ya que la mayoría de las investigaciones realizadas sobre este patógeno se dedican en gran parte a las infecciones provenientes de dicho reservorio (Margal *et al.* 1991). A su vez se tuvieron en cuenta estudios realizados por organizaciones internacionales, como evaluaciones de riesgos microbiológicos de alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina realizados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS), que identificó como productos que se encuentran en riesgo potencial de estar contaminados por *E. coli* O157 los cárnicos y lácteos (OPS, 1994), como también lo sugieren los estudios realizados por Armstrong *et al.* (1996), Kang & Fung (1999), Nataro & Kaper (1998).

A pesar que en este estudio se obtuvo sólo una muestra correspondiente a *E. coli* O157, proveniente de un producto cárnico, confirma su presencia en Colombia, tal como lo demuestran los estudios realizados por Alarcón & Moreno (1997), Máttar, (1998).

Aunque en menor proporción, en productos lácteos también se ha aislado este patógeno (Calicchia, 1994). En este estudio se obtuvie-

ron muestras presuntivas de este grupo de alimentos de ser *E. coli* O157; por lo tanto no debe descartarse la posibilidad de la presencia de este microorganismo, ya que pudo haberse encontrado en muy bajas concentraciones y no ser detectado, tal como lo sugiere en su estudio Duncan, *et al.* (1994).

La evidencia de encontrar este patógeno en muy bajas concentraciones, se ha demostrado también en trabajos realizados en Santafé de Bogotá, donde no se encontraron muestras positivas para *E. coli* O157: H7 en alimentos (Luna *et al.* 1996), o se encontró en prevalencias bajas (8.6%) en carne de hamburguesa. (Alarcón & Moreno 1997).

Por esta razón se hace necesaria la evaluación de nuevos métodos, cada vez más sensibles para determinar la presencia de *E. coli* O157 (Niroomand & Lord 1994).

En este estudio se realizó la validación de dos técnicas utilizadas, la técnica rápida utilizando Agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7 y la técnica tradicional utilizando Agar Mac Conkey Sorbitol; obteniéndose que sólo se necesitan 2 UFC/ml de *E. coli* O157 para que por medio de estas técnicas se pueda recuperar este microorganismo como lo demostrado por Heuvelink, *et al.* (1997), donde se recuperó 1 a 4 UFC/ml de *E. coli* O157 por diferentes métodos de identificación, de lo cual se puede deducir, que los métodos evaluados en este estudio tienen una buena capacidad de recuperación del patógeno. Aunque existen métodos con porcentajes más altos de sensibilidad como los ensayos inmunoenzimáticos y las técnicas moleculares de diagnóstico como las pruebas de DNA y PCR entre las cuales también se han utilizado para la detección de genes de *E. coli* O157 y la detección del plásmido pO157 (hemolisina gen) entre otros (Post, 1998).

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las dos técnicas ensayadas presentaron el mismo porcentaje de recuperación de *Escherichia coli* O157 y que el método rápido utilizando Agar Fluorocult, para *E. coli* O157: H7 permitió obtener resultados presuntivos en

24 horas y resultados confirmatorios en 48 horas. En contraste con el método tradicional utilizando agar Mac Conkey Sorbitol permitió obtener resultados presuntivos en 24 horas y resultados confirmatorios en cinco días.

En el análisis de las muestras se observó que a pesar de las ventajas en la reducción de costos y tiempo de análisis, ofrecidos por métodos rápidos como el usado en este estudio, se hacen necesarias las pruebas de biotipificación para obtener resultados más confiables en la determinación de *E. coli* 0157, tal como se recomienda en el trabajo realizado por Luna *et al.* (1996).

En este estudio se empleó agua peptonada tamponada al 1% + novobiocina, con el fin de mejorar la sensibilidad de la prueba e inhibir el desarrollo de otros organismos sin afectar la recuperación de *E. coli* 0157 como lo han sugerido en métodos de aislamiento de *E. coli* enterohemorrágica por Benett (1990).

El medio de cultivo utilizado en la técnica rápida Agar Fluorocult, para *E. coli* 0157: H7 por su alta selectividad debido al mejoramiento de sus componentes, no permite el crecimiento de interferentes en tan alto grado como se puede ver en la técnica tradicional con Agar MacConkey Sorbitol, la cual no ofrece la misma especificidad que el Agar Fluorocult, para *E. coli* 0157: H7. Por ello se sugiere en diversos estudios la adición de suplementos al medio de cultivo que inhiban la carga microbiana acompañante como el Cefixime - Teluritro para darle más selectividad al Agar Mac Conkey Sorbitol o la adición de sustratos cromogénicos como el caso del (5-Bromo-4 cloro-3-indoxil-b-D-glucorónido (BCIG) (Doyle & Shoeni 1990, Wright *et al.* 1994, Padhye *et al.* 1992). Sin embargo, aunque no debiera presentarse, en el Agar Fluorocult, para *E. coli* 0157: H7 se observó que 42 (14%) muestras presuntivas de ser *E. coli* 0157 de las 300 muestras analizadas, fueron falsos positivos, de las cuales solo una fue confirmada de ser *E. coli* 0157 por serología.

Los microorganismos utilizados en este estudio como controles positivos y ecométricos de productividad y selectividad permitieron evaluar la sensibilidad de los medios sólidos selectivos,

para el desarrollo del microorganismo deseado, en este caso *E. coli* 0157 y la resistencia a la colonización por microorganismos indeseados así como la sensibilidad de los medios no selectivos (OPS, 1994).

A pesar de tener como primer parámetro de sospecha la presencia de *E. coli* 0157 por el hecho de no fermentar el sorbitol, no existe la seguridad que esta característica sea la determinante para aceptarse como positiva o negativa una colonia aislada en un medio selectivo para este patógeno, debido a que se han realizado estudios donde se encontraron cepas mutantes de *E. coli* 0157 con la capacidad de fermentar el sorbitol. Lo que indica que las bacterias son capaces de mutar, cambiando su comportamiento metabólico y debido a esto pasar inadvertidas en un estudio que se lleve a cabo, esto podría ser fatal, al presentarse un brote con un cepa con estas características, debido a la toxicidad de la *E. coli* 0157 poniendo en riesgo la vida de los directamente afectados, como lo sugiere Cizek, *et al.*, 1999 y Fratamico *et al.*, 1993 en sus estudios.

La ausencia de producción de toxinas en las cepas identificadas, pudo estar relacionada con una pérdida del gen correspondiente; lo que puede suceder porque la cepa tuvo muchos subcultivos, como lo dicen sus estudios Nataro & Kaper (1998), lo cual disminuye la posterior patogenicidad en humanos y permite sugerir el mejoramiento del proceso microbiológico en la recuperación de las cepas en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al Dr. Danilo Vanegas, Gerente de Unidad Estratégica e Higiene Industrial de MERCK Colombia, por su confianza e importantísimo apoyo económico para la obtención de los medios y reactivos. A la Dra. Mónica Páez, Gerente de Productos de la Compañía Productora de Químicos y Reactivos QUIMIREL, por su orientación y colaboración en la consecución de los materiales. Al Dr. Alberto Mendoza, docente de la Universidad Javeriana, quien con una gran profesionalidad dirigió este trabajo y planteó valiosas sugerencias acerca de cómo demostrar

la verdad de esta teoría, para realizar notables progresos en materia de eficiencia, crecimiento y beneficios. Al Dr. Martín Bayona, docente de la Universidad Javeriana, por sus ponderados comentarios los cuales iban mejorando la realización de este trabajo. A la Dra. Ada Plaza, Microbióloga, quien aportó a este trabajo sus experiencias profesionales y siempre estuvo dispuesta a ayudarnos incondicionalmente. Finalmente, agradecemos a nuestros padres que con su comprensión y amor siempre nos animaron a seguir delante y a los revisores anónimos de este trabajo por sus acertados comentarios.

LITERATURA CITADA

- AHMED, N., D.E. CONNOR, AND D.L. HUFFMAN, 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157: H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.* **60**: 606-610.
- BENNETT, B., BONNIE, E.R., OKREND, A.J.G., 1990. A Screening Method for the Isolation of *Escherichia coli* O157 :H7 from Ground Beef. *Journal of Food Protection* **53** (3): 249-252.
- BENNETT, A.R., MACPHEE, SAND BETTS, R.P. 1995. Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef. *Letters in Applied Microbiology* **20**: 375-379.
- BONNIE, E.R., LATTUADA, C.P., OKREND, A.J.G. 1990. Use of 5-Bromo-4Cloro-3-Indoxyl-b-D-Glucuronide in Mac Conkey Sorbitol Agar to Aid in the isolation of *Escherichia coli* O157 :H7 from Ground Beef. *Journal of Food Protection* **53**(11): 941-943.
- GARLAND L. KASPAR C.W. 1994. *Escherichia coli* O157 : H7 Acid Tolerance and Survival in Apple Cider. *Journal of Food Protection* **57** (6): 460-464.
- LUNA, G.J., PLAZA, A. PASACHOA, J. 1996. Uso del Petrifilm™ Test Kit-Hec para la detección de *Escherichia coli* O157 : H7 en alimentos. *Geotrópica* **1**: 50-56.
- MARSDEN JAMES L. 1994. *Escherichia coli* O157 : H7, an Emerging Foodborne Pathogen. 3M Microbiology Products.
- MATTAR S., PULIDO J., VASQUEZ E. SUSSMANN O. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated in Colombia from Children with diarrhoea: serotypes and drug-resistance. *Med. Sci. Res.* **25**: 615-617.
- MERCK 1994. Manual de medios de cultivo. 72-307.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (OPS). ABRIL 1994. Guía técnica para el estudio "Evaluación del riesgo microbiológico de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina.
- OXOID 1998. The Oxoid Manual 8th edition. 2-140, 9-2, 10-2.
- THRUSFIELD M. 1990. Epidemiología Veterinaria. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- WEAGANT STEPHEN D., BRYANT JAMES & JINEMAN KAREN G. 1995. An Improved Rapid Technique for Isolation of *Escherichia coli* O157 : H7 from Foods. *Journal of Food Protection* **58** : 12.

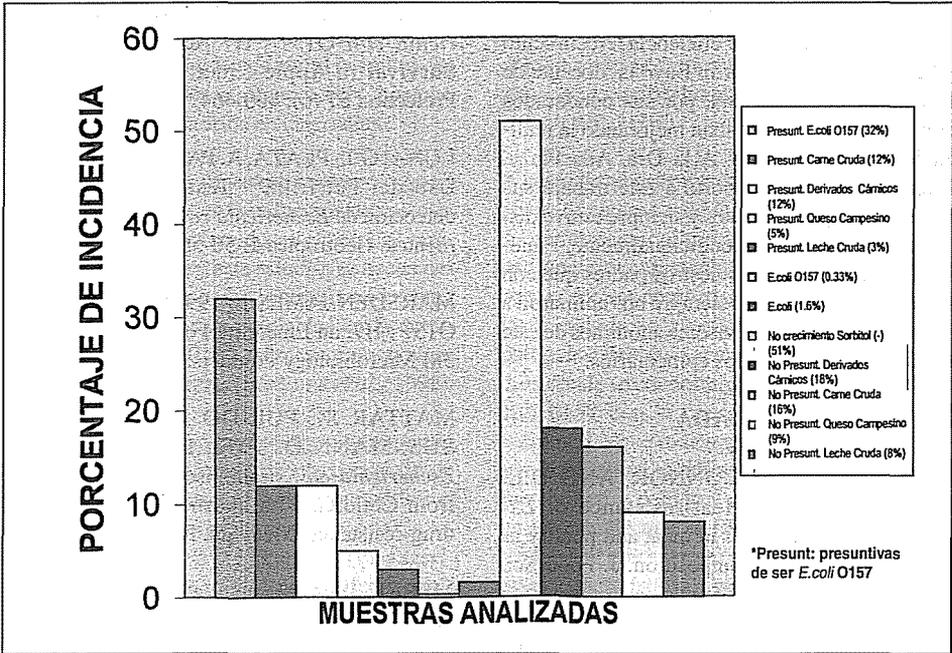


FIGURA 1. Método A. Agar Mac Conkey Sorbitol.

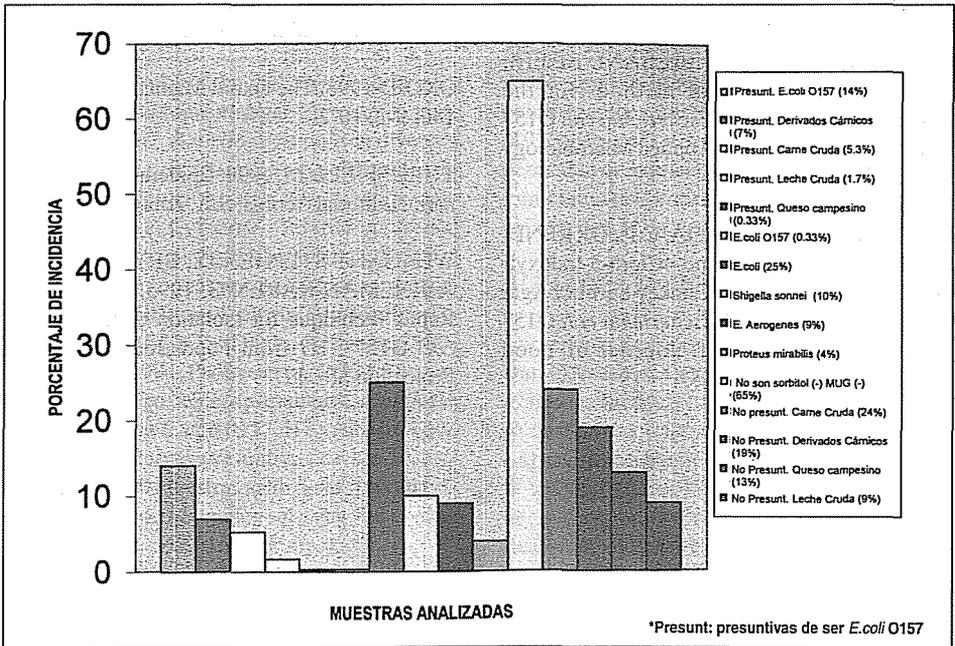


FIGURA 2. Método B. Agar Fluorocult, para *E.coli* O157:H7