

# Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción, provincia de Tucumán

M. A. JURE<sup>1\*</sup>, S. CONDORÍ<sup>2</sup>, G. A. LEOTTA<sup>3,4</sup>, I. CHINEN<sup>3</sup>, E. MILIWEBSKY<sup>3</sup>, C. ALLORI<sup>1</sup>, O. AULET<sup>1</sup>, M. C. DE CASTILLO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Microbiología "Dr. Luis C Verna", Cátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica, Química, Farmacia y Biotecnología, Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 491 (4000) San Miguel de Tucumán; <sup>2</sup>Laboratorio de Bromatología del Sistema Provincial de Salud de la Provincia de Tucumán, Pje Dorrego 1080 (4000) San Miguel de Tucumán, Argentina; <sup>3</sup>Servicio de Fisiopatología, Departamento de Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS "Dr Carlos G. Malbrán", Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; <sup>4</sup>Filiación actual: Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (Universidad Nacional de La Plata-CONICET), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 (1900) La Plata, Argentina.

\*Correspondencia. E-mail: majure@fbqf.unt.edu.ar

## RESUMEN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente transmitido por alimentos. Existen numerosos serotipos de STEC asociados a enfermedad en humanos, entre los cuales prevalece el serotipo O157:H7. La carne molida es el principal vehículo de transmisión. En la ciudad de Concepción, provincia de Tucumán, entre setiembre y diciembre de 2004 se diagnosticaron dos casos de síndrome urémico hemolítico (SUH). El objetivo de este trabajo fue detectar, aislar y caracterizar STEC O157 y no-O157 a partir de muestras de carne molida fresca obtenidas en las bocas de expendio. Entre los meses de setiembre y diciembre de 2004 se recolectaron 53 muestras de carne molida fresca en carnicerías de la ciudad de Concepción. Para la detección, el aislamiento y la caracterización de STEC O157:H7 se utilizó la metodología USDA-FSIS 2002. Para la detección de *E. coli* no-O157 se utilizaron dos técnicas de PCR; para el aislamiento y la caracterización se utilizó una metodología previamente validada en una etapa intralaboratorio. Siete muestras fueron positivas para el gen *stx*<sub>2</sub>, de las cuales 4 también fueron positivas para el gen *rfb*<sub>O157</sub>. Sin embargo, solo se aisló una cepa de *E. coli* O157:H7 biotipo C, portadora de los genes *eae*, *stx*<sub>2</sub> y *ehxA*. El presente trabajo refleja la importancia de implementar técnicas que permitan detectar este grupo de patógenos emergentes a partir de productos cárnicos.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* O157:H7, STEC, toxina Shiga, carne molida fresca

## ABSTRACT

**Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh ground beef from butcher shops in Concepción, Tucumán Province.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* is an emerging foodborne pathogen. There are many STEC serotypes associated with human diseases, being the O157:H7 serotype the most prevalent. Ground beef is the main transmission vehicle. In Concepción city, Tucumán Province, between September and December 2004, two hemolytic uremic syndrome (HUS) cases were diagnosed. The main objective of this work was to detect, isolate and characterize STEC O157 and non-O157 strains in fresh ground beef. Between September and December 2004, 53 fresh ground beef samples were collected from butcher shops in Concepción city. The USDA-FSIS (2002) methodology was used for detection, isolation and characterization of STEC O157:H7. Two PCR techniques for *E. coli* non-O157 detection and a previous intra-laboratory validated methodology for the isolation and characterization of these strains were used. The *stx*<sub>2</sub> gene was identified in seven samples and the *rfb*<sub>O157</sub> gene also in four of them. However, only one *E. coli* O157:H7 strain, biotype C, carrying the *eae*, *stx*<sub>2</sub> and *ehxA* genes, was isolated. The present study shows the importance of implementing techniques for the detection of this emerging pathogen in meat samples.

**Key words:** *Escherichia coli* O157:H7, STEC, Shiga toxin, fresh ground beef

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos. Este microorganismo puede causar diarrea, colitis hemorrágica y complicaciones extraintestinales como síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopénica (6). En Argentina el SUH es endémico y el principal reservorio de STEC son los rumiantes. *E. coli* O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos de STEC que comparten

el mismo potencial patogénico. Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, fueron descritos como los principales reservorios de STEC (8). La mayoría de los brotes registrados en países industrializados se asociaron a la ingestión de carne vacuna mal cocida, especialmente carne molida, ya que su procesamiento presenta un mayor riesgo de contaminación en mataderos, plantas de procesamiento y supermercados (1).

De acuerdo al Código Alimentario Argentino, los productos cárnicos deben estar libres de *E. coli* O157:H7/NM en las bocas de expendio (artículos 156 tris, 255, y 302). Sin embargo, en Argentina se notifican anualmente entre 400 y 500 nuevos casos de SUH y se estima que la prevalencia de esta enfermedad es de 13,9 casos cada 100 000 niños menores de 5 años, de los cuales 30% se adjudican a cepas de STEC no-O157 (12). La detección de STEC no-O157 no se realiza rutinariamente, ya que no existe una metodología validada para su detección en productos cárnicos. Sin embargo, se estandarizaron y validaron dos técnicas de PCR destinadas a la detección de los genes *stx* (3).

En Tucumán el SUH es endémico; en esa provincia se detecta la presencia de STEC desde 1998 (4, 10). En 2007 la prevalencia de esta enfermedad fue allí de 4,1/100 000 niños menores de 5 años (11). En la ciudad de Concepción, entre los meses de setiembre y diciembre de 2004, se diagnosticaron dos casos de SUH. Sin embargo, no se realizaron estudios previos sobre la detección de STEC O157 y no-O157 en alimentos. El objetivo de este trabajo fue detectar, aislar y caracterizar STEC O157:H7 y no-O157 en muestras de carne molida fresca obtenidas en las bocas de expendio de la ciudad de Concepción, provincia de Tucumán.

Entre los meses de setiembre y diciembre de 2004, se recolectaron 53 muestras de carne molida, por triplicado, en 53 carnicerías habilitadas de la ciudad de Concepción, abastecidas por diferentes frigoríficos. Se utilizó el procedimiento de muestreo establecido en el Código Alimentario Argentino. Las muestras fueron recolectadas por personal de la Dirección de Bromatología de la provincia de Tucumán en conjunto con personal municipal.

Las muestras de carne molida fueron procesadas por duplicado en el Laboratorio de Bacteriología de la FBQF-UNT. La detección de *E. coli* O157:H7 se realizó según la metodología del USDA-FSIS 2002 (15). Esta metodología se basa en las siguientes etapas: 1) enriquecimiento de 65 g de carne molida en caldo EC modificado adicionado con novobiocina a 37 °C durante 20-24 h, 2) tamizaje a elección previamente validado, 3) aislamiento mediante separación inmunomagnética (SIM) y siembra en medios selectivos y diferenciales, 4) caracterización de los aislamientos. En este trabajo se utilizó la metodología USDA-FSIS con mínimas modificaciones. Para el enriquecimiento se utilizó caldo EC modificado (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Francia) adicionado con 20 mg/l de novobiocina (Sigma Chemical Co. St. Louis, EE.UU.). No se realizó el tamizaje a partir del caldo de enriquecimiento. A todas las muestras se les realizó SIM utilizando perlas inmunomagnéticas (Dynabeads® Dynal). El cultivo inmunocentrado fue sembrado en agar MacConkey sorbitol (Becton Dickinson) adicionado con cefixime-telurito (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y CHROM agar (CHROM agar, París, Francia). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. Las colonias

características fueron conservadas a -20 °C en caldo cerebro corazón (Britania, Buenos Aires, Argentina) adicionado con 30% de glicerol. La identificación bioquímica de las colonias que presumiblemente podrían ser STEC se realizó mediante la evaluación de la fermentación de celobiosa (Britania), el crecimiento en cianuro de potasio (Britania), la producción de pigmento y de lisina decarboxilasa (Britania). La detección de movilidad se realizó en medio de Craigie (9). La determinación del biotipo se realizó mediante la fermentación de sorbitol, dulcitol, rafinosa y ramnosa (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, EE.UU.). La serotipificación se realizó con los antisueros somáticos O157 (Oxoid, Ltd., Hampshire, Reino Unido) y flagelar H7 (Instituto de Producción de Biológicos-ANLIS "Dr Carlos G. Malbrán"). El aislamiento identificado como *E. coli* O157:H7 fue caracterizado por PCR en la ANLIS. Se utilizaron protocolos previamente estandarizados para la detección de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *rfb*<sub>O157</sub>, *ehxA* y *eae* (5, 7, 13). Además, se determinó la variante *stx* por PCR-RFLP (14). Sobre un total de 53 muestras analizadas se aisló una cepa de *E. coli* O157:H7 biotipo C y portadora de los genes *eae*, *ehxA* y *stx*<sub>2c(vha)</sub>.

Para la detección, el aislamiento y la caracterización de STEC no-O157, se pesaron 65 g de carne molida fresca en una bolsa Stomacher®, se agregaron 585 ml de caldo EC (Becton Dickinson) y se incubó a 37 °C durante 18 h. Se utilizó un control positivo (cepa *E. coli* EDL 933), un control negativo (cepa *E. coli* ATCC 25922) y un control de sistema (caldo de enriquecimiento sin muestra). Se tomó 1 ml del caldo de enriquecimiento y se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en 150 µl de buffer Tritón, se llevó a ebullición durante 10 min, se centrifugó nuevamente y una alícuota de 2 µl se utilizó como ADN templado. Simultáneamente, se tomó 1 ml del caldo enriquecido y se congeló a -20 °C con 30% de glicerol. Las muestras de ADN templado y las muestras de caldo enriquecido fueron remitidas la ANLIS para su procesamiento. La detección de los genes *stx* se realizó por PCR-MK incluyendo un control interno de amplificación competitivo (8) y por PCR múltiple para la detección de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub> y *rfb*<sub>O157</sub> (7). De cada muestra positiva al tamizaje, se sembró 1 ml del caldo conservado a -20 °C en 10 ml de caldo EC y se incubó a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se centrifugó 1 ml de cada caldo y el *pellet* fue sembrado por agotamiento en una placa de agar MacConkey (Becton Dickinson) y en tres placas de agar EMB-Levine (Becton Dickinson), luego se incubó a 37 °C durante 24 h. Del área de crecimiento confluyente en agar MacConkey se realizó la técnica de PCR múltiple (7). En los casos positivos se picaron 50 colonias de las placas de agar EMB-Levine, se sembraron en una placa grillada de agar MacConkey y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Finalmente se intentó identificar la colonia *stx* positiva mediante PCR (8). Sobre un total de 53 muestras de carne molida fresca analizadas, 4 fueron positivas en el análisis de los genes *stx* por PCR-MK (Fi-

gura 1). En 11 muestras, el control interno de amplificación (CIA) fue negativo, lo que se adjudicó a la presencia de algún inhibidor de la PCR en el ADN templado. Al analizar estas muestras por PCR múltiple, se demostró que 4 fueron positivas para los genes *rfb*<sub>O157</sub> y *stx*<sub>2</sub>. De estas muestras, 3 correspondieron a muestras inhibidas en la PCR-MK. Sin embargo, no fue posible identificar si en el resto de las muestras la PCR estuvo inhibida, ya que la PCR múltiple no incluye un CIA. Si bien se intentó aislar STEC de las muestras positivas en el tamizaje, no fue posible recuperar ningún aislamiento.

La mayoría de los serotipos de STEC no presentan características fenotípicas que permitan diferenciarlos de otras *E. coli*. Es por ello que para su detección, y en particular para su aislamiento, se requiere la aplicación de estrategias más complejas, algunas de las cuales fueron propuestas en la última década (2, 8). Además, cabe destacar que este grupo bacteriano puede encontrarse en muy bajo número, puede sufrir daño subletal y, generalmente, está acompañado de grandes poblaciones de microbiota competitiva. En este trabajo, sobre un total de 53 muestras analizadas mediante una técnica de tamizaje por PCR, se detectó la presencia de genes *stx* en 7 (13,2%), aunque no fue posible aislar al microorganismo portador. Entre las posibles causas podemos citar: a) estrés bacteriano, ya que las muestras se enriquecieron en Tucumán y se procesaron en Buenos Aires, es decir, sufrieron diferentes cambios de temperatura y subcultivos, b) desarrollo excesivo de la microbiota acompañante, c) presencia de inhibidores en la muestra.

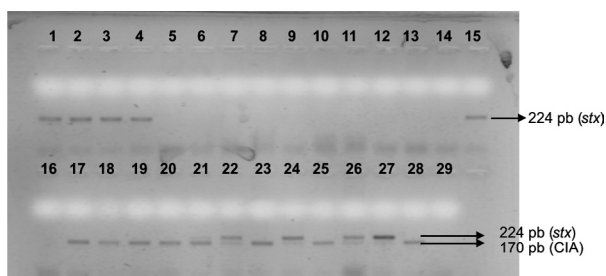
A diferencia de lo que sucede respecto de STEC no-O157, la metodología para el aislamiento de *E. coli* O157:H7 es específica y diferencial. La única cepa aislada en este trabajo por la metodología del USDA-FSIS fue portadora de todos los factores de virulencia, como la mayoría de las cepas

O157:H7 aisladas de casos de SUH en Argentina (12). Sin embargo, cuando se procesaron las mismas muestras por la metodología para detección de STEC no-O157 se identificaron 4 muestras positivas para los genes *rfb*<sub>O157</sub>, aunque no fue posible aislar al microorganismo portador. Este resultado se adjudica a la posibilidad de que el número de *E. coli* O157:H7 en las muestras haya sido inferior al límite de detección de la metodología utilizada (15). Si bien el USDA-FSIS considera negativo un resultado con tamizaje positivo del cual no se puede aislar el microorganismo blanco, nosotros sostenemos que la portación de los genes *stx*<sub>2</sub> debe ser considerada por las autoridades sanitarias encargadas del control bromatológico, para establecer medidas de intervención pertinentes. Cabe mencionar que la metodología recomendada por USDA-FSIS para la detección, aislamiento y caracterización de *E. coli* O157:H7 fue actualizada (16).

En conclusión, teniendo en cuenta que en nuestro país el consumo de carne bovina es elevado, que *E. coli* O157:H7 es endémico en Tucumán (4, 10) y que las fuentes de infección rara vez son identificadas, el presente trabajo refleja la importancia de implementar alguna metodología que permita detectar STEC (O157 y no-O157) en productos cárnicos para realizar un control eficiente en la etapa de comercialización de la carne bovina en áreas donde el SUH es endémico. Este es el primer trabajo realizado en la provincia de Tucumán en el que se aisló STEC O157:H7 y se detectó STEC no-O157 en muestras de carne molida fresca en las bocas de expendio.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chinen I, Tanaro JD, Milliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, et al. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Prot* 2001; 64: 1346-51.
- Duffy G, Thomas K, Mc Cann M, Murphy M, Lynch MJ, O'Connor, et al. Assessing and managing the risk posed by verocytotoxigenic *E. coli* in foods of animal origin. 7th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) – Producing *Escherichia coli* Infections 2009. Resúmen S11.3, p. 25, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.
- Galli L, Leotta GA, Gugliada MJ, Rivas M. Análisis *in silico* de la capacidad de dos técnicas de PCR para la detección del gen *stx*. *Rev Argent Microbiol* 2008; 40: 9-12.
- Jure MA, Castillo M, Aulet O, Micelli S, Sesma F, Ruiz Holgado A, et al. Association between hemolytic uremic syndrome and verotoxin-producing strains of *E. coli*. *Rev Latinoam Microbiol* 1998; 40: 1-8.
- Karch H, Meyer T. Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-like-toxin genes by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2751-7.
- Karmali MA. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1989; 2: 15-38.
- Leotta GA, Chinen I, Epsztejn S, Milliwebsky E, Melamed IC, Motter M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 1-10.
- Leotta GA. Validación de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Escherichia*



**Figura 1.** Productos de amplificación obtenidos por PCR-MK. Calles 1 a 14 y 16 a 26: muestras de carne recolectadas en carnicerías de la ciudad de Concepción, Tucumán. Calles 1 a 4, 17 a 21, 23 y 25: muestras negativas para *stx* y positivas para el CIA. Calles 5 a 14 y calle 16: muestras sin amplificación del CIA, PCR inhibida. Calles 22, 24, 26 y 27: muestras positivas para *stx* y negativas para el CIA. Calles 15 y 27: control positivo (*E. coli* O157:H7 EDL933, 224 pb). Calle 28: control negativo (cepa *E. coli* ATCC 25922), CIA: control interno de amplificación (170 pb). Calle 29: control de sistema, reactivos sin ADN templado.

- coli* productor de toxina Shiga en alimentos cárnicos. Tesis, Buenos Aires. ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" y Universidad Nacional de San Martín; 2006.
9. Rivas M, Leotta GA, Chinen I. WHO Global *Salmonella* Survival. Manual de procedimientos para el diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 Productor de toxina Shiga a partir de alimentos. 2007. Disponible en: [http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/manual\\_Ecoli.pdf](http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/manual_Ecoli.pdf)
  10. Micelli S, Jure MA, Saab O, Castillo M, Rojas S, Ruiz Hologado A, et al. Clinical and bacteriological study of children suffering from haemolytic uraemic syndrome in Tucumán, Argentina. *Jpn J Infect Dis* 1999; 52: 33-7.
  11. Ministerio de Salud de la Nación. Documento de notificaciones de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) en la provincia de Tucumán, año 2007. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar>.
  12. Rivas M, Miliwesky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina* (Buenos Aires) 2006; 66 suppl 3: 27-32.
  13. Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. *Infect Immun* 1995; 63: 1055-61.
  14. Tyler SD, Johnson WM, Lior H, Wang G, Rozee KR. Identification of verotoxin type 2 variant B subunit genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1339-43.
  15. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (nonmotile) from meat products. USA, 2002, p.1-13.
  16. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat products. MLG 5.04. USA, 2008.