

Trabajos de Investigación

**PRIMER AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* O157:H7
A PARTIR DE HAMBURGUESAS EN PARAGUAY****Copes J¹, Pellicer K¹, del Hoyo G¹, Lopez Cabrera M², Estigarribia M²,
Pineda Olmedo G², Loup V², Florentin C², Alonso M², Cardozo L³**

¹Consultor JICA, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Laboratorio de Microbiología de los Alimentos SENACSA, Paraguay,

³Cátedra de Microbiología, Facultad de Veterinarias Asunción, Paraguay.

Resumen: En los últimos veinte años las infecciones por *Escherichia coli* Enterohemorrágico (EHEC) representan una gran preocupación para la Salud Pública mundial. *E. coli* O157:H7/NM es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. El objetivo del trabajo fue aislar *E. coli* O157:H7 de alimentos obtenidos en mercados habilitados para la venta en la ciudad de Asunción, Paraguay. Se analizaron 50 muestras, para el aislamiento se realizó un enriquecimiento en caldo *Escherichia coli* adicionado con novobiocina y luego se sembró en medios sólidos PRS-Mug y Fluorocult. Las colonias características fueron confirmadas por pruebas bioquímicas y serológicas. A partir de hamburguesas de carne bovina cruda se obtuvieron dos cepas de *E. coli* O157:H7, ambas portadoras del gen *eae*, y negativas para los genes *ehxA*, *stx*₁ y *stx*₂. Este es el primer reporte sobre el aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de alimentos en Paraguay.

Palabras Clave: *Escherichia coli* O157:H7, STEC, hamburguesas crudas.

**FIRST ISOLATION OF *Escherichia coli* O157:H7
FROM HAMBURGERS IN PARAGUAY**

Abstract: In the last twenty years the infections caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) represented a great concern for the world public health. *E. coli* O157:H7/NM is the prototype into a group of more than 150 serotypes that share the same pathogenical potential. The purpose of this work was to isolate *E. coli* O157:H7 from food obtained in markets qualified for sale in Asunción city, Paraguay. Fifty samples were analyzed, for the isolation and enrichment in *Escherichia coli* broth added with novobiocin was carried out, and then it was streaked into solid media PRS-Mug and Fluorocult. Typical colonies were confirmed by biochemical and serological tests. From hamburgers of raw bovine meat two *E. coli* O157:H7 strains were obtained, both carriers of *eae* gene and negatives for *ehxA*, *stx*₁ and *stx*₂ genes. This is the first report about the isolation of *E. coli* O157:H7 from foods in Paraguay.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, STEC, raw hamburger.

Fecha de recepción: 23/05/08

Fecha de aprobación: 02/0908

Dirección para correspondencia: Julio A. Copes, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: jcopes@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli Enterohemorrágico (EHEC) es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica (CH) ocurridos en Oregon y Michigan, EE.UU., atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas. La infección por EHEC puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (6, 10). *Escherichia coli* O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico, cuyo principal factor de virulencia son las toxinas Shiga (7, 9, 28). A este grupo se lo denomina *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). Según la OMS (1997), las cepas de EHEC deben presentar los siguientes factores de virulencia: a) toxinas Shiga, b) intimina, y c) enterohemolisina (27). Debido a que no todas las cepas STEC presentan estos factores de virulencia, y solo son productoras de toxina Shiga, se considera que las cepas EHEC son un subgrupo entre las STEC.

La habilidad de las cepas EHEC O157:H7 para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para producir Stx1, Stx2, y sus variantes, responsables del daño del endotelio vascular (29). El segundo factor de virulencia es una proteína de membrana externa de 94-kDa, llamada intimina codificada por el gen *eae* localizado en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement). Este locus está asociado con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, la iniciación de las señales de transducción, y la desorganización de las microvellosidades con la formación de la lesión AE (del inglés, attaching-and-effacing) (14). La presencia de LEE le confiere a las cepas EHEC una mayor virulencia, pues los serotipos LEE-positivos aparecen con mayor frecuencia asociados a brotes y casos de SUH que los serotipos LEE-negativos. El tercer factor de virulencia que caracteriza a las cepas EHEC es la producción de una enterohemolisina (EHEC-Hly), codificada en el gen *ehxA* del megaplásmido de 90-kb, la cual estaría involucrada en la patogénesis (23).

Numerosos estudios realizados en diferentes países, incluyendo a la Argentina permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio de *E. coli* O157:H7 (2, 14, 20), aunque las ovejas y las cabras también fueron descritas como reservorios (2, 3, 13).

La principal vía de transmisión de *E. coli* O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga,

brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (21). La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino. En la Argentina, se detectó STEC O157:H7 en el 3,9 % de productos cárnicos a nivel de boca de expendio (5). Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral. Es importante destacar que la dosis infectiva capaz de ocasionar enfermedad por parte de este grupo bacteriano es de 10 a 100 bacterias por gramo de alimento.

En Argentina, donde el SUH es endémico, se producen aproximadamente 400 casos nuevos por año. La enfermedad constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica. El SUH es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (8, 21).

En Paraguay son escasos los estudios realizados sobre la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos, por lo cual la detección, identificación y caracterización de este patógeno emergente en alimentos y en los procesos de producción de los mismos, podría ser una herramienta fundamental para prevenir la posible infección en los consumidores (16).

El objetivo del trabajo fue aislar *E. coli* O157:H7 en muestras de alimentos obtenidas en supermercados de la ciudad de Asunción, Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los meses de noviembre y diciembre de 2006, el personal del SENACSA (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria, del Paraguay) recolectó 50 muestras de alimentos en 15 mercados habilitados para la venta en la ciudad de Asunción, Paraguay. Se recolectaron 35 muestras de quesos denominados "Paraguay", 10 muestras de carne picada y 5 muestras de hamburguesas crudas.

Para la detección y aislamiento de *E. coli* O157:H7, se inocularon 65 g de cada muestra en caldo *Escherichia coli* (Bio Pro Lab., EE.UU.) con novobiocina (Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, France), incubándose a 35°C por 18 h y sin agitación. Posteriormente, una alícuota de cada caldo enriquecido fue sembrada en Phenol Red Sorbitol-mug (PRS-Mug, Oxoid) y Fluorocult (Merck, Darmstadt Alemania), e incubada a 35°C por 24 h. Las colonias presuntivas se repicaron en medio sólido eosina azul de metileno (Britania Lab, Argentina) y en agar tripticasa soya (Britania Lab, Argentina) para su posterior tipificación bioquímica (24). Para el seroagrupamiento se utilizó el test aglutinación de Látex O157 (OXOID, U.K.).

Las cepas aisladas fueron enviadas al Servicio Fisiopatogenia del INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", para confirmar la presencia de los antígenos O157 y H7, la capacidad de producir citotoxicidad en células Vero, y la portación de los genes *rfb*_{O157}, *fliC*_{H7}, *eae*, *ehxA*, *stx*₁ y *stx*₂ (12).

RESULTADOS

Sobre 50 muestras analizadas, dos (4%) fueron positivas para *E. coli* O157:H7. Los dos aislamientos fueron recuperados de hamburguesas crudas y presentaron colonias sorbitol negativas en los medios de cultivo PRS-Mug, y Fluorocult. Las dos cepas aisladas presentaron movilidad y las pruebas bioquímicas arrojaron los siguientes resultados: oxidasa negativa, catalasa positiva, indol positivo, Voges Proskauer negativo, rojo de metilo positivo, citrato negativo, lisina y ornitina decarboxilasa positivas, hidrogeno sulfurado negativo, y fermentación de glucosa y lactosa. Ambos aislamientos fueron portadores del gen *eae* y no portaron los genes *stx*₁, *stx*₂ y *ehxA*.

DISCUSIÓN

Considerando que en la última década las enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7 ocasionaron una gran preocupación en la salud pública mundial (1, 19), el control de los alimentos para la detección de este microorganismo constituye una herramienta fundamental para prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos.

Cabe destacar que las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas no portaron dos de los factores de virulencia de EHEC (toxinas Shiga y enterohemolisina). Sin embargo, estos aislamientos son portadores del gen *eae* que codifica para la intimina y podrían ser potencialmente patógenos al adquirir los genes *stx* mediante fagos. Cabe destacar que según Karmali y col. (10), el serotipo O157:H7 pertenece al seropatótipo A según su potencial patogénico y epidémico, su asociación a enfermedades severas en el hombre y su capacidad para producir brotes (10, 18). Las cepas aisladas en el presente trabajo podrían ser consideradas un parámetro de contaminación por *E. coli* O157:H7 toxigénico ya que Wetzel Y LeJeune (26) reportaron la pérdida de los genes que codifican las toxinas Shiga.

El aislamiento de *E. coli* O157:H7 fue de gran importancia ya que se utilizó una metodología convencional menos exigente que la recomendada por United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) (24, 25). De lo anteriormente expuesto puede deducirse que una búsqueda más exhaustiva en este tipo de alimentos, podría arrojar mayor número de cepas.

Con respecto a la presencia de *E. coli* O157:H7 en Paraguay, los únicos datos en-

contrados se refieren a Ortiz (16), quien realizó estudios en media res bovina para exportación, los cuales arrojaron resultados negativos para el aislamiento. El presente es el primer reporte sobre el aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de alimentos en Paraguay. Es necesario realizar mayores estudios para evaluar la presencia de *E. coli* O157:H7 a los fines de determinar si existen serotipos patógenos en alimentos en Paraguay, y posteriormente implementar un plan de control sanitario.

Este trabajo fue realizado a los efectos de comenzar una vigilancia epidemiológica sobre *E. coli* O157:H7 en alimentos para lo cual se organizó este primer muestreo coordinado por el Laboratorio de Alimentos dependiente del SENACSA. Sin embargo, destacamos que sería muy importante realizar una búsqueda más exhaustiva con metodologías apropiadas para el aislamiento de las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga no-O157, cuya incidencia en casos clínicos se ha venido incrementando a nivel mundial (11, 17, 22) y por lo tanto, podrían estar presentes en Paraguay.

A partir de los aislamientos obtenidos, el laboratorio Oficial decidió implementar la metodología recomendada y validada por la USDA/FSIS, que incluye la separación inmunomagnética (4, 24, 25).

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecido reconocimiento al Dr. Gerardo Leotta por su experta asistencia técnica y sus valiosas discusiones.

BIBLIOGRAFIA

- Banatvala N, Griffin P M, Greene K D, Barret T J, Bibb W F, Green J H, Wells J G and the Hemolytic Huremic Syndrome Study Collaborators. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis* 2001; 183: 1063-70.
- Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 2005; 36:289-311.
- Carney E, O'Brien S B, Sheridan J J, McDowell D A, Blair I S, Duffy G. Prevalence and level of *Escherichia coli* on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiol* 2006, 23:52-59.
- CFSan/Bam, Bacteriological Analytical Manual Online. Diarrheagenic *Escherichia coli*. U.S. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. 2002 <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>
- Chinen I, Tanaro J D, Miliwebsky E, Lound L H, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retails meats in Argentina. *J Food Protect* 2001, 64: 1346-51.

- 6.El Síndrome Urémico Hemolítico. Consejo Profesional de Médicos Veterinarios 2006. <http://www.med-vet.com.ar/SUH-Informe.pdf>
- 7.El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). Pan American Health Organization 2001. <http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/CD/paraguay-red-junio-2001-5-suh.pdf>.
8. Exeni R. Síndrome Urémico Hemolítico. Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica 2001, 1:35-56.
- 9.Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 1991, 13: 60-98.
- 10.Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, and Kaper JB. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 2003, 41: 4930-40.
- 11.Krüger A, Padola N L, Parma A E and Lucchesi Paula M A. Intraserotype diversity among Argentinian verocytotoxinogenic *Escherichia coli* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. J of Medical Microbiol 2006, 55: 545-549.
- 12.Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev. Argent. Microbiol. 2005, 37(1): 1-10.
- 13.Marguet ER, Ledesma P. Aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en un tambo ovino. Vet. Arg.1999, 16:170-174.
- 14.McDaniel TK, Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K12. Mol Microbiol 1997, 2: 399-407.
- 15.Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinnen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth B E C, Masana M, Cataldi A, Rodríguez H R and Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. Int J Food Microbiol 2004, 96:189-98.
- 16.Ortiz N. FAO/IAEA First research coordination meeting of the coordinated research programme on "determination of profiles of human bacterial pathogens in foods for export by introduction of quality-assured microbiological assays". Occurrence of Bacterial Pathogens in Paraguayan Meat and Meat Products for Export, research contract N° 10277, pág 12. Viena, Austria, 1998 2-6 November. http://www.iaea.org/trc/micro-d61019_rcm1.pdf
- 17.Padola N L, Sanz M E, Blanco J E, Blanco M, Blanco J, Etcheverría A I, Arroyo G H, Usera M A and Parma A E. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. Vet Microbiol. 2004, 100(1-2):3-9.
- 18.Parma A E, Sanz M E, Blanco J E, Blanco J, Viñas M R, Blanco M, Padola N L & Etcheverría A I. Virulence genotypes and serotypes of verotoxinogenic *Escherichia coli* from cattle and foods in Argentina. Eur J Epidemiol 2000; 16:757-62.
- 19.Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, and Forestier C. 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 (3):1023-31.
- 20.Renwick SA, Wilson JB, Clark RC Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and human. J. Infect. Dis. 1993, 168: 792-793.
- 21.Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta G. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. Medicina (Buenos Aires) 2006, 66 (Supl.III): 27-32.
- 22.Sanz M E, Viñas M R & Parma A E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. European Journal of Epidemiology 1998, 14:339-403.
- 23.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.
- 24.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. <http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/Mlg5.03.pdf>
- 25.United States Food Safety Office of Laboratory QA/QC Division. Laboratory Guidebook. FSIS Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) Screening Tests. 2005 http://www.fsis.usda.gov/PDF/Mlg_5A_01.pdf
- 26.Wetzel A N, LeJeune J T. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. Letters in Appl Microbiol 2007, 45:504-507
- 27.World Health Organization. Consultation on prevention and control of enterohemorrhagic (EHEC) infections. In: World Health Organization. Proceedings of the Report of a WHO. Consultation, Geneva, Switzerland. 1997.
- 28.World Health Organization 1998. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response WHO/CSR/APH/98.8. Berlin, Germany.
- 29.Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 2002, 40: 1441-1446.