

Paraguay

EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PCR EN TIEMPO REAL PARA LA DETECCIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 A PARTIR DE CARNE BOVINA MOLIDA

BRUSA V¹, PALACIOS M², LOUP V³, COPEL J^{1, 4}, PINEDA G³, BROCARD S¹, ALIVERTI V¹, ALIVERTI F¹, GALLERI D¹, PERAL GARCIA P^{5, 6}, PELLICER K¹, LEOTTA G^{1, 5, 6 *}

¹ Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina, ² Medicatec, Buenos Aires, Argentina, ³ Servicio Nacional de Salud Animal - SENACSA, Paraguay, ⁴ PROVETSUR - Agencia de Cooperación Internacional del Japón, ⁵ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET),

⁶ Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" CCT-La Plata CONICET-Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: La infección por *Escherichia coli* O157:H7 es causa de diarrea con o sin sangre, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) en humanos. El principal reservorio animal de *E. coli* O157:H7 son los bovinos y la carne bovina molida es una potencial fuente de infección. El objetivo de este trabajo fue evaluar un sistema comercial de PCR en tiempo real para la detección de *E. coli* O157:H7. Se determinó límite de detección, selectividad y robustez. Se contaminaron experimentalmente 50 muestras de carne molida bovina con 10 cepas de *E. coli* O157:H7 (10, 100 y 1000 UFC/25 g) y 20 cepas de bacterias no-*E. coli* O157:H7 (1000 UFC/25 g). El límite de detección dependió de la cepa analizada, el valor mínimo fue 6,1 UFC/25 g. La robustez fue óptima al modificar diferentes variables. Se obtuvo 100% de inclusividad y 100% de exclusividad. La técnica evaluada es una alternativa apropiada para la detección de *E. coli* O157:H7 a partir de carne bovina molida.

Palabras clave: PCR en tiempo real, *E. coli* O157:H7, carne bovina.

EVALUATION OF A REAL TIME PCR SYSTEM FOR DETECTION OF *Escherichia coli* O157:H7 IN GROUND BEEF

ABSTRACT: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) cause non-bloody or bloody diarrhea, hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS) in humans. Cattle are a major animal reservoir for *E. coli* O157:H7 and the ground beef are a potential source of infection. The aim of the present study was to evaluate a real time PCR commercial system for detection of *E. coli* O157:H7. Detection limit, selectivity and robustness were established. Fifty samples of ground beef were experimentally contaminated with 10 *E. coli* O157:H7 strains (10, 100 y 1000 CFU/25 g) and 20 non-*E. coli* O157:H7 strains (1000 CFU/25 g). The detection limit depended on the strain analyzed, the minimum values was 6,1 cfu/15 g. A good robustness was observed when different variables were introduced. Inclusivity and exclusivity were of 100%. The evaluated technique is an appropriate alternative for detection of *E. coli* O157:H7 from ground beef.

Key words: real time PCR, *E. coli* O157:H7, ground beef.

Dirección para correspondencia: Gerardo Leotta, 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: gleotta@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCION

Escherichia coli O157:H7 es un patógeno emergente asociado a Enfermedades Transmitedas por Alimentos (ETA). Fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica (CH) atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de comidas rápidas (1).

La infección por *E. coli* O157:H7 puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea, CH y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina, el SUH es endémico y constituye la primera causa pediátrica de insuficiencia renal aguda y la segunda de insuficiencia renal crónica; además, es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes. Cada año se producen aproximadamente 400 casos nuevos de SUH, aunque existe un importante subregistro. Desde 1965 hasta el presente se registraron más de 7.000 casos (2)

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 (3). La principal vía de transmisión de este microorganismo son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas y embutidos fermentados, entre otros (4, 5, 6).

El objetivo de este trabajo fue evaluar un sistema comercial de PCR en tiempo real para la detección de *E. coli* O157:H7 a partir de muestras de carne bovina molida.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 100 muestras de 25 g cada una de carne bovina molida. Las muestras fueron analizadas para determinar la ausencia de *E. coli* O157:H7 según la metodología recomendada por *United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service* (USDA/FSIS) (10). Cada muestra fue colocada en una bolsa de Stomacher (BagFilter, Interscience, Francia) y conservada a 6 °C durante 24 h.

Se utilizaron 30 cepas; 10 cepas de *E. coli* O157:H7 y 20 cepas no-*E. coli* O157:H7 (Tabla 1). Las cepas *E. coli* EDL933 (O157:H7) y *E. coli* ATCC 25922 (no-O157:H7), fueron utilizadas como controles positivo y negativo, respectivamente. Las cepas utilizadas fueron identificadas por pruebas bioquímicas (8) y seroagrupadas según su antígeno somático (O) y flagelar (H). Para la detección del antígeno O se utilizó la técnica de aglutinación en látex (Denka Seiken, Tokyo, Japón) y para la detección del antígeno H se utilizó la técnica de aglutinación en tubo con antisuero anti-H (Denka Seiken).

Las cepas, conservadas a -70 °C en caldo cerebro corazón (CCC, Acumedia, Michigan, EE.UU.) con 30 % de glicerol, fueron sembra-

das en 5 ml de CCC (Acumedia) e incubadas a 37 °C durante 6 h, y luego en agar MacConkey (Acumedia) a 37 °C durante 18 h. A partir de una colonia se realizó un subcultivo en CCC a 37 °C durante 6 h hasta la fase de crecimiento exponencial (aproximadamente 10⁸ UFC/ml). La concentración bacteriana se determinó por recuento en agar para recuento en placa (Acumedia), por triplicado. Las placas se incubaron a 37°C durante 18 h. La concentración bacteriana se expresó en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Paralelamente, se realizaron 7 diluciones decimales en agua peptonada hasta obtener una concentración aproximada de 10, 100 y 1000 UFC/ml (Tabla 1). Sesenta muestras fueron contaminadas experimentalmente con 1 ml de cada una de las mencionadas diluciones correspondientes a las cepas *E. coli* O157:H7 y 40 muestras fueron contaminadas con 1000 UFC/ml de las cepas no-*E. coli* O157:H7. Posteriormente, se agregaron 225 ml de caldo EC (Acumedia) a cada muestra. Todas las muestras fueron procesadas durante 2 minutos en BagMixer (Interscience) y se incubaron a 37 °C durante 18 h.

PCR en tiempo real. Se utilizó el sistema de PCR en tiempo real R.A.P.I.D. LT Food Security System y el kit comercial *E. coli* O157:H7 LT Test Kit (Idaho Technologies Inc., Utah, EE.UU.), siguiendo las instrucciones específicas del fabricante.

Límite de detección. Se determinó la probabilidad de detección de *E. coli* O157:H7 al comparar el número de resultados positivos con la concentración de cada cepa en las muestras analizadas. El ensayo de PCR se realizó por duplicado en un intervalo de 1 a 3 días.

Selectividad. La determinación de selectividad se realizó de acuerdo a los conceptos propuestos por Feldsine *et al.* (9). Se analizaron muestras con todas las cepas detalladas en la Tabla 1, por duplicado.

Robustez. Los ensayos se realizaron por triplicado y se repitieron en las mismas condiciones, en 3 días consecutivos, con 3 operadores.

RESULTADOS

Límite de detección. Todas las muestras contaminadas con diferentes concentraciones de *E. coli* O157:H7 fueron positivas. El límite de detección dependió de la cepa analizada y la concentración bacteriana con la que se contaminaron las muestras, el valor mínimo se obtuvo con las muestras contaminadas con la cepa LAMA 74 y fue 6,1 UFC/25 g. El valor máximo se obtuvo con las muestras contaminadas con la cepa LAMA 40 y fue de 20 UFC/25 g de carne bovina molida.

Selectividad. Todas las muestras contaminadas con las cepas de *E. coli* O157:H7 fueron positivas en las tres concentraciones (N=30) y

Tabla 1. Cepas de *E. coli* O157:H7 y no-*E. coli* O157:H7 provenientes del cepario del Laboratorio de Microbiología de los Alimentos (LAMA) y utilizadas para evaluar el sistema comercial de PCR en tiempo real.

Origen	Cepa	UFC/ 25 g	origen	cepa	UFC/ 25 g
LAMA 32	<i>E. coli</i> O157:H7	7,5	LAMA 65	<i>E. coli</i> O157:H7	11,6
		75			116
		750			1160
LAMA 39	<i>E. coli</i> O157:H7	8,5	LAMA 70	<i>E. coli</i> O157:H7	19,6
		85			196
		850			1960
LAMA 40	<i>E. coli</i> O157:H7	20	LAMA 73	<i>E. coli</i> O157:H7	7,5
		200			75
		2000			750
LAMA 46	<i>E. coli</i> O157:H7	19	LAMA 74	<i>E. coli</i> O157:H7	6,1
		190			61
		1900			610
LAMA 55	<i>E. coli</i> O157:H7	14	LAMA 81	<i>E. coli</i> O157:H7	6,4
		140			64
		1400			640
LAMA 90	<i>E. coli</i> O91:H21	610	LAMA 25	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1360
LAMA 67	<i>E. coli</i> O103:NM	955	LAMA 13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2190
LAMA 80	<i>E. coli</i> O113:H4	650	LAMA 2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1185
LAMA 88	<i>E. coli</i> O145:NM	930	LAMA 10	<i>Shigella flexneri</i>	735
LAMA 77	<i>E. coli</i> O146:H28	860	LAMA 20	<i>Shigella dysenteriae</i>	1515
LAMA 107	<i>Salmonella</i> Enteritidis	700	LAMA 23	<i>Shigella boydii</i>	800
LAMA 24	<i>Salmonella</i> Typhimurium	895	LAMA 21	<i>Morganella morganii</i>	1020
LAMA 1	<i>Salmonella</i> Newport	840	LAMA 16	<i>Proteus mirabilis</i>	1070
LAMA 28	<i>Enterobacter cloacae</i>	1295	LAMA 18	<i>Proteus vulgaris</i>	1010
LAMA 149	<i>Staphylococcus aureus</i>	3380	LAMA 8	<i>Escherichia hermannii</i>	350

todas las muestras contaminadas con las cepas no-*E. coli* O157:H7 (N=20) fueron negativas. Por lo tanto, se obtuvo un 100% de inclusividad y un 100% de exclusividad.

Robustez. Todos los resultados fueron reproducibles al analizar las muestras contaminadas con 10 cepas de *E. coli* O157:H7 en 3 días consecutivos y por 3 operadores.

DISCUSIÓN

En el Artículo 255 del Código Alimentario Argentino se especifica el criterio microbiológico que debe cumplir la carne picada fresca, en el cual se establece ausencia de *E. coli* O157:H7/NM en 5 muestras de 65 g cada una. Para el aislamiento y la caracterización de *E. coli* O157:H7 y O157:NM en productos cárnicos se recomienda la metodología validada por USDA/FSIS (7). En esta metodología se recomienda un tamizaje basado en el sistema de PCR BAX® (10).

El sistema evaluado en este trabajo se

basa en PCR en tiempo real y utiliza sondas específicas para la detección de los amplicones generados en el proceso. Si bien, no es el mismo fundamento que el sistema BAX®, este presenta valores similares en cuanto a límite de detección, inclusividad, exclusividad y robustez.

El sistema de PCR en tiempo real R.A.P.I.D. LT Food Security System y el kit comercial *E. coli* O157:H7 LT Test Kit presentaron un buen desempeño, ya que fue posible detectar hasta 6,1 UFC/25 g de carne bovina molida. No se observaron interferencias al utilizar diferentes concentraciones bacterianas. Si bien, este sistema de PCR en tiempo real cuenta con la validación de AOAC International (AOAC N° 100901), en el presente trabajo se demostró su utilidad para la detección de cepas de *E. coli* O157:H7 circulantes en Argentina.

En conclusión, el sistema de PCR en tiempo real evaluado es una técnica rápida, precisa y selectiva para la detección de *E. coli* O157:H7 en carne bovina molida.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del Proyecto de Desarrollo Profesional Continuo para los Veterinarios del Sur (PROVETSUR), Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). El sistema de PCR en tiempo real fue provisto por Idaho Technologies Inc., UTA, EE.UU.

BIBLIOGRAFIA

1. Riley LW, Remis RS, Helgerson, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Herbert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA, Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. N Engl J Med 1983; 308: 681-5.
2. Rivas M, Miliwebsky 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 (Supl.III): 27-32.
3. Masana MO, Leotta GA, Del Castillo LL, D'astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari CC, Rodríguez HR, Rivas M. Prevalence, characterization, and genotypic analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from selected beef exporting abattoirs of Argentina. J Food Prot 2010; 73: 649-656.
4. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. J Food Prot 2001; 64: 1346-51.
5. Chinen I, Epszteyn S, Melamed CL, Aguerre L, Martínez Espinosa E, Motter MM, Baschkier A, Manfredi E, Miliwebsky E, Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. Int Food Microbiol 2009;132:167-71.
6. Oteiza JM, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). Food Microbiol 2006; 23: 283-8.
7. United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. USDA/FSIS (2008) 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. MLG5.04. 2008.
8. Edwards and Ewing's. The Genus *Escherichia*. En: Ewing WH (Ed), Edwards and Ewing's, Identification of Enterobacteriaceae 4th Ed. Elsevier 1986, New York, p. 93-134.
9. Feldsine P, Abeyta C, Andrews W. AOAC International Methods Committee Guidelines for Validation of Qualitative and Quantitative Food Microbiological Official Methods of Analysis. J AOAC Internat 2002; 85: 1187-200.
10. Food Safety and Inspection Service Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 Screening Tests MLG 5A.01. 2008