

## Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche

M. L. ROLDÁN<sup>1</sup>, I. CHINEN<sup>2</sup>, J. L. OTERO<sup>3\*</sup>, E. S. MILIWEBSKY<sup>2</sup>, N. ALFARO<sup>1</sup>, P. BURNS<sup>1</sup>, M. RIVAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Bacteriología, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Paraje El Pozo, (3000) Santa Fe, Argentina; <sup>2</sup>Servicio Fisiopatogenia, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”, Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina; <sup>3</sup>Departamento de Salud Pública Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. R. P. Kreder 2805, Esperanza (3080) Santa Fe, Argentina.  
\*Correspondencia. E-mail: jotero@fcv.unl.edu.ar

### RESUMEN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (Stx) (STEC) O157:H7 es un patógeno asociado a enfermedades transmitidas por alimentos, fundamentalmente de origen animal. Se investigó la presencia de *E. coli* O157 en 250 muestras de carne picada y hamburguesas obtenidas de comercios de las ciudades de Santa Fe y Santo Tomé (Pcia. de Santa Fe) y en 150 muestras de leche provenientes de tanques de enfriado de tambos de la región, utilizando enriquecimiento selectivo y separación inmunomagnética. A partir de 3 muestras de carne (1,2%) se aislaron cepas *E. coli* O157:H7 *stx2*, *eae*, y *ehxA* positivas, que pudieron ser diferenciadas mediante electroforesis de campo pulsado, fagotipificación y genotipificación de *stx*. No se aislaron cepas STEC O157:H7 a partir de las muestras de leche. Estos hallazgos confirman la participación de los alimentos de origen animal en la epidemiología de las enfermedades producidas por *E. coli* O157:H7.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* O157:H7, productos cárnicos, leche

### ABSTRACT

**Isolation, characterization and typing of *Escherichia coli* O157:H7 strains from beef products and milk.** Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) is an emergent pathogen associated with foodborne diseases, especially foodstuffs of animal origin. A total of 250 beef samples (ground beef and hamburgers) obtained from retail outlets in Santa Fe and Santo Tomé cities, and 150 milk samples from bulk tank milk from dairy barns of the region were analyzed by selective enrichment and immunomagnetic separation. *Escherichia coli* O157:H7 *stx2*, *eae* and *ehxA* positive strains were isolated from three (1.2%) beef samples. The strains could be differentiated by pulsed-field gel electrophoresis, phagetyping and genotyping of *stx*. The milk samples were negative for STEC O157. These findings confirm the role of food of animal origin in the epidemiology of *E. coli* O157:H7 - associated diseases.

**Key words:** *Escherichia coli* O157:H7, meat products, milk

### INTRODUCCIÓN

En los últimos veinte años, *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) ha sido reconocido como agente causal de enfermedad gastrointestinal grave, con riesgo de complicaciones que ponen en peligro la vida de las personas afectadas.

Las cepas STEC pertenecen a un amplio rango de serotipos y han sido asociadas a diarreas con sangre o sin ella, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH) (32, 59). Superado el período prodromico diarreico, cerca del 8% de los pacientes evolucionan a SUH, una enfermedad extraintestinal severa caracterizada por la súbita aparición de anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y falla renal aguda, que

puede afectar también al sistema nervioso central, páncreas, pulmones y corazón (30). Los serotipos de STEC que causan enfermedad severa en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) (27).

Las toxinas Shiga (Stx1, Stx2 y variantes) son los principales factores de virulencia, pero existen otros marcadores que pueden contribuir a la patogenicidad de EHEC. Estos factores incluyen a la intimina, una proteína de membrana externa codificada por el gen cromosomal *eae* y responsable de la unión íntima a los enterocitos y del barrido de las microvellosidades de la mucosa colónica (lesión AE), y a una enterohemolisina (EHEC-Hly) perteneciente a la familia RTX (repeat in toxin) de las citolisinas formadoras de poros, codificada por un plásmido de 90 MDa (pO157) (59).

*Escherichia coli* O157:H7, históricamente asociado con grandes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, es el serotipo de STEC prevalente en muchas partes del mundo y uno de los más estudiados en animales productores de alimentos (59).

En Estados Unidos se ha estimado que las infecciones por *E. coli* O157:H7 son responsables de al menos 20.000 casos de enfermedad y 250 muertes por año, con un costo financiero de entre 250 y 500 millones de dólares (32).

En Argentina el SUH es endémico, con aproximadamente 400 casos nuevos informados anualmente por las Unidades Hospitalarias de Nefrología y más de 7000 casos notificados desde 1965 (20). Hasta el presente, la tasa anual de incidencia de SUH estimada es de 13,9 cada 100.000 en niños menores de 5 años (52). *Escherichia coli* O157:H7 productor de toxina Shiga 2 (Stx2) es el serotipo y genotipo prevalente en nuestro país (63).

Los bovinos y otros rumiantes son considerados los principales reservorios de STEC, el serotipo O157:H7 es comúnmente aislado de materia fecal de bovinos (35, 70, 71) y ovinos (35, 43). En nuestro país se ha descrito el aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de bovinos (19, 50) y ovinos (48).

Las infecciones por STEC pueden ser una consecuencia del consumo de leche cruda o carne poco cocida (55, 59). La contaminación de la carne durante la faena es el principal modo de transmisión de *E. coli* O157:H7 a los alimentos; los productos elaborados con carne picada han estado implicados en la mayoría de los brotes (4), fundamentalmente asociados al consumo de hamburguesas (5, 6, 9, 10, 60).

El consumo de leche cruda, inadecuadamente pasteurizada o contaminada después del proceso térmico (15, 25, 41, 68), de crema de leche (13) y de quesos elaborados con leche cruda (14, 28) ha sido asociado con brotes severos de enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7.

Otros alimentos identificados como vehículo de *E. coli* O157:H7 son carne asada, carne de venado ahumada, salame, yogurt, jugo de manzana no pasteurizado, melón, papas, brotes de rábanos y brotes de alfalfa (51).

La infección secundaria es común y presumiblemente refleja la baja dosis infectiva. Esto ha ocurrido en casas de familia, hospitales, residenciales geriátricos y unidades de cuidados diarios, particularmente jardines maternos (21).

Las bajas concentraciones de *E. coli* O157:H7 halladas en alimentos responsables de brotes (59) determina la necesidad de utilizar métodos altamente sensibles. La técnica de separación inmunomagnética (SIM) con posterior aislamiento en medios selectivos, como el agar Mac Conkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio (CT-SMAC) o medios cromogénicos, es un procedimiento sensible y eficaz para la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos de origen animal (16, 31, 72).

El propósito de este trabajo fue aislar STEC O157:H7 a partir de muestras de carne picada, hamburguesas y leche cruda; caracterizar los factores de virulencia y establecer la diversidad genética de los aislamientos y su relación clonal con cepas STEC O157:H7 aisladas de muestras de diferentes orígenes en nuestro país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 250 muestras de carne picada y hamburguesas provenientes de comercios de las ciudades de Santa Fe y Santo Tomé (Pcia. de Santa Fe), entre julio de 2001 y septiembre de 2004. Se analizaron, además, 150 muestras de leche de tanques de enfriado de tambos situados en la cuenca lechera santafesina, obtenidas entre julio de 2004 y abril de 2006.

Las hamburguesas eran del tipo casero, elaboradas en los propios comercios, o industriales, con registro legal del establecimiento elaborador y del producto. Las muestras, en su envase original o en el provisto por el comerciante, fueron colocadas en conservadoras con refrigerantes y llevadas inmediatamente al laboratorio. Allí fueron conservadas en refrigeración hasta su procesamiento.

Las muestras de leche (50 ml) fueron tomadas a partir de los tanques de enfriamiento en los tambos y fueron enviadas al laboratorio en recolectores estériles, en condiciones de refrigeración.

### Aislamiento e identificación bioquímica y serológica

El aislamiento se realizó mediante separación inmunomagnética, según lo descrito por Chinen et al. (18) con algunas modificaciones.

A 25 g de cada muestra de carne o producto cárnico se le agregaron 225 ml de caldo EC modificado (Oxoid Ltd., Hampshire, England) suplementado con novobiocina (20 mg/l) (MP Biomedicals, Escwege, Germany), (ECm+N) y se homogeneizó durante 5 min en bolsas del tipo Stomacher. A 25 ml de cada muestra de leche se le agregaron 225 ml de ECm+N. Las diluciones provenientes tanto de las muestras de carne como de las de leche se incubaron a 42 °C durante 18 h. La separación inmunomagnética se realizó con partículas sensibilizadas con anticuerpos anti-O157 (Neogen Corp., Lansing, MI, USA) a partir de 1 ml de caldo de enriquecimiento, según las instrucciones del fabricante. La muestra inmunocentrada fue sembrada en placas de agar Mac Conkey sorbitol (SMAC, Difco) y agar SMAC suplementado con cefixima (50 ng/ml) y telurito de potasio (2,5 µg/ml) (CT-SMAC), e incubadas a 37 °C durante 18 h.

Se seleccionaron hasta 10 colonias no fermentadoras de sorbitol de cada placa, las cuales fueron identificadas como *E. coli* mediante pruebas bioquímicas convencionales (45). La diferenciación entre *E. coli* y *E. hermannii* se realizó mediante las pruebas de fermentación de celobiosa, actividad de lisina decarboxilasa y producción de pigmento amarillo. La serotipificación se realizó con antisueros específicos para O157 y H7 provistos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

La sensibilidad a los antimicrobianos se evaluó mediante la prueba de difusión en agar para amikacina, ampicilina, ciprofloxacina, cloramfenicol, colistin, gentamicina, ácido nalidíxico, norfloxacina, estreptomycin, tetraciclina, y trimetoprima-sulfametoxazol, según el método y los patrones del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (56).

### Caracterización de los factores de virulencia

Las cepas identificadas bioquímica y serológicamente como *E. coli* O157:H7 fueron caracterizadas por PCR múltiple para la detección de los genes de Stx1, Stx2 y *rfbO157* (44). La caracterización de los marcadores de virulencia accesorios *eae* y *ehxA* se efectuó por PCR simple con los primers SK1/SK2 (39) y hlyA1/

hlyA4 (64), respectivamente. Se realizó el ensayo de citotoxicidad en células Vero para confirmar la capacidad de producción de toxinas Shiga (40).

La producción de EHEC-Hly se determinó mediante hemólisis en placa de agar sangre desfibrinada de oveja al 5% suplementado con  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (10mM), según metodología ya descrita (7).

### Subtipificación

La genotipificación de Stx2 y sus variantes se realizó analizando el polimorfismo del tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) de la región que codifica para la subunidad B, amplificada por PCR (67). Las cepas utilizadas como referencia, *E. coli* 92-3580 O157:H7 (stx2vh-a) y 93-016 O113:H21 (stx2vh-b), fueron gentilmente provistas por el Dr. D. Woodward (National Microbiology Laboratory, Canadian Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Manitoba, Canadá).

La fagotipificación se realizó mediante el método descrito por Ahmed y col. (2) y luego extendido por Khakhria y col. (42). El conjunto de fagos tipificadores de *E. coli* O157:H7 fue provisto por R. Ahmed (National Microbiology Laboratory, Canadian Centre for Human and Animal Health, Winnipeg, Manitoba, Canadá).

La separación de los fragmentos obtenidos por macro-restricción se realizó por electroforesis de campo pulsado (PFGE, pulsed-field gel electrophoresis) utilizando el protocolo estandarizado de 24 h de PulseNet para *E. coli* O157:H7, con modificaciones menores (11). La restricción enzimática del ADN inmovilizado en los *plugs* se realizó con 25 U de *Xba*I (Promega Corporation, Madison, WI) a 37 °C durante 18 h. *Bln*I (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ) fue utilizada como segunda enzima según lo requerido, con 30 U a 37 °C durante 18 h. La cepa *Salmonella* Braenderup H1298 (provista por el CDC, USA) fue utilizada como patrón de referencia para el análisis. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1% (Seakem Gold Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., ME) con el buffer Tris borato EDTA 0,5X. Para la corrida electroforética se utilizó el equipo CHEF DR-III system (Bio-Rad Laboratories) con las siguientes condiciones: tiempo inicial del pulso, 2,2 seg; tiempo final del pulso, 54,2 seg; duración total de la corrida, 18 h, a 200 V y 14 °C. La adquisición de la imagen se realizó mediante un equipo digital Gel Doc 2000 (Bio Rad). El análisis de los patrones electroforéticos se efectuó mediante el programa BioNumerics Software Package Ver. 4.0 (Applied Maths, Belgium), utilizando el coeficiente de Dice y UPGMA para generar los dendrogramas con un 1,5% de tolerancia.

Para la comparación con cepas STEC O157 de distintos orígenes (humano, animal, alimentos y medio ambiente) aisladas en Argentina durante el período 1988-2005, se utilizó la base de datos de *Escherichia coli* O157 de PulseNet Argentina, que contiene los resultados de 801 cepas correspondientes a un total de 366 patrones de *Xba*I-PFGE (BioNumerics). Dicha base incluye, además, los datos epidemiológicos de los casos y los resultados de las técnicas de caracterización y subtipificación.

## RESULTADOS

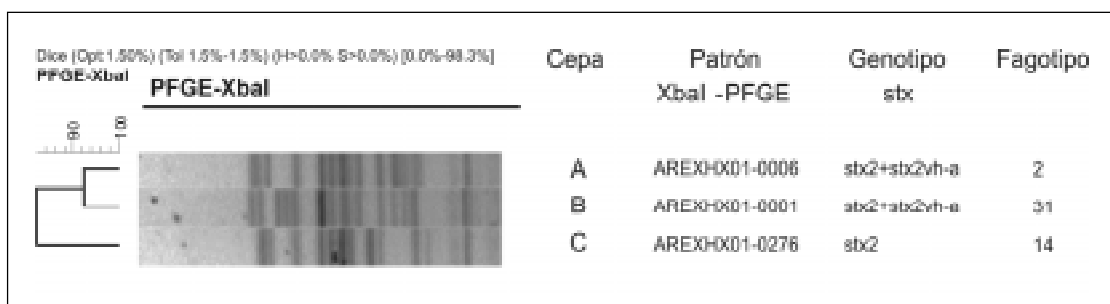
Mediante la metodología descrita se aisló STEC O157:H7 en 3 de las 250 muestras de carnes y productos cárnicos (1,2%). Las tres cepas (*a las que se denominó A, B y C*) fueron aisladas a partir de hamburguesas del tipo casero. Una de las cepas fue aislada en setiembre de 2003 y las otras dos en noviembre del mismo año. Todas correspondieron al biotipo C (fermentadoras de ramnosa y dulcitol) y portaron los genes de los marcadores de virulencia accesorios, el factor *eae* y *ehxA*.

Las cepas A y B fueron caracterizadas como stx2/stx2vh-a, fagotipo (PT) 2 y 31, respectivamente, y la cepa C como stx2vh-a, PT14.

Por *Xba*I-PFGE, las cepas A, B y C presentaron distintos patrones de restricción denominados AREXHX01-0006, AREXHX01-0001 y AREXHX01-0276, respectivamente, con 15 a 20 bandas definidas entre 30 y 750 kpb, aproximadamente. Los patrones de las cepas A (AREXHX01-0006) y B (AREXHX01-0001) presentaron un 92,3% de similitud entre ellos y sólo 3 bandas de diferencia, mientras que la cepa C se diferenció de las cepas A y B por más de 7 bandas, con un porcentaje de similitud del 82,2% (Figura 1).

Al comparar los patrones obtenidos con los existentes en la base de datos de *Escherichia coli* O157 de PulseNet Argentina, uno de ellos (AREXHX01-0006, correspondiente a la cepa A) mostró un 100% de identidad con 3 cepas aisladas de 2 casos de diarrea sanguinolenta y de un caso de SUH atendidos todos ellos en la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) en los años 1991, 2000 y 2002, respectivamente, y de un alimento (carne bovina) en el año 1999. El patrón de la cepa B (AREXHX01-0001) presentó identidad con los patrones de 9 cepas aisladas de casos clínicos, incluyendo 3 SUH, 3 diarreas sanguinolentas, 5 diarreas con sangre y un asintomático, detectados en la CABA, Gualaguaychú, Mendoza y La Plata, en los años 1988, 1997, 1998, 2000, 2001 (2 cepas), 2002 y 2003 (2 cepas). La cepa C mostró un perfil único y distinto de los detectados hasta el momento.

No se aislaron cepas de *E. coli* O157:H7 a partir de leche de tanque de enfriamiento en tambos.



**Figura 1.** Fenograma de las cepas STEC O157 aisladas, obtenido con los patrones *Xba*I-PFGE utilizando el coeficiente de Dice y el programa BioNumerics Ver. 4.0

Las tres cepas aisladas de productos cárnicos fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se aisló *E. coli* O157:H7 en el 1,2% de las muestras de carne picada y productos cárnicos.

Se han descrito diferentes metodologías para la detección y el aislamiento de STEC O157:H7 a partir de productos cárnicos (37). Sin embargo, es difícil comparar los resultados obtenidos en diferentes partes del mundo debido a la variedad de los procedimientos utilizados.

Con metodologías de aislamiento basadas en cultivo directo o con enriquecimiento previo, se notificó la detección de *E. coli* O157:H7 en 0,12% de muestras de carne vacuna cruda (n=1668), recolectadas como parte de la vigilancia nacional realizada en los Estados Unidos (32). En Holanda se describió el aislamiento de STEC O157:H7 en el 0,3% de 770 muestras de mezclas de carne picada vacuna y de cerdo, pero no fue posible aislar este microorganismo a partir de productos a base de carne vacuna (n=1000), de carne porcina (n=260), ni de aves (n=300) mediante el cultivo en SMAC con enriquecimiento previo (34). Estos resultados indican que la frecuencia de aislamiento de STEC O157:H7 a partir de carnes es baja o nula con los métodos tradicionales.

El porcentaje de detección aumenta cuando se utiliza la metodología de separación inmunomagnética (SIM) (16, 31), aun cuando se observa un rango variable de frecuencia de detección. Blanco *et al.* (8) utilizaron SIM y aislaron *E. coli* O157:H7 en 5% de 58 muestras de carne picada y hamburguesas. Sin embargo, otros autores obtuvieron menores tasas de aislamiento con la misma metodología. Chapman *et al.* (17) aislaron *E. coli* O157 en el 1,1% de 3216 muestras de productos de carne vacuna; Stampi *et al.* (66) detectaron este microorganismo en el 2% de 149 muestras de distintos tipos de hamburguesas; y Heuvelink *et al.* (36), en el 1,1% de las muestras de carne vacuna picada (n= 571) obtenidas de supermercados y carnicerías. En otros trabajos, Conedera *et al.* (23) detectaron STEC O157 solamente en el 0,43% de 931 muestras de carne picada, y Coia *et al.* (22) obtuvieron 2 aislamientos de *E. coli* O157 en 1190 muestras de carne cruda y productos cárneos.

En Argentina se describió la detección de STEC O157 en el 3,9% de 279 muestras de carne vacuna a nivel de boca de expendio, realizando el aislamiento con SIM (18). Estos resultados demuestran que la frecuencia de aislamiento de STEC O157:H7 a partir de productos cárnicos es baja, aun cuando se utiliza un método sensible como la SIM.

Coincidentemente, nuestros resultados mostraron una baja frecuencia de aislamiento. Sin embargo, las cepas O157 aisladas en este trabajo portaron los genes de los marcadores de virulencia accesorios *eae* y *ehxA*, neces-

sarios para causar enfermedad severa en el hombre. Es destacable que las cepas A y B presentaron el genotipo *stx2/stx2vh-a*, descrito como altamente citotóxico (57).

La subtipificación y la electroforesis de campo pulsado permiten establecer la relación epidemiológica existente entre cepas aisladas de distinto orígenes y realizar una vigilancia de los clones circulantes en distintas regiones del país. Mediante los estudios de subtipificación se pudo confirmar que las tres cepas aisladas eran diferentes. Dos de ellas presentaron patrones *Xba*I-PFGE con un 100% de similitud con cepas aisladas de casos clínicos y de alimentos en nuestro país, y codificaron los mismos factores de virulencia. Estos patrones detectados por *Xba*I-PFGE correspondieron a patrones ampliamente diseminados en diferentes años y en diferentes regiones del país, inclusive uno de ellos pudo ser detectado en un alimento. Teniendo en cuenta que la base de datos de *E. coli* O157 de PulseNet Argentina incluye un total de 801 cepas argentinas de *E. coli* O157 correspondientes a 366 patrones *Xba*I-PFGE diferentes, los patrones AREXHX01-0006 y AREXHX01-0001 detectados en este estudio representan el 0,7% y el 1,2% de la base, respectivamente. Esto estaría indicando que dichos patrones se detectan con cierta frecuencia, por lo que se deduce que existirían características epidemiológicas en el país que favorecen la persistencia de estas cepas en el medio ambiente o en distintos reservorios a través del tiempo. Por otra parte, el tercer patrón *Xba*I-PFGE fue único y poco relacionado genéticamente con las cepas STEC O157 aisladas en nuestro país hasta el momento. Dicha cepa no fue asociada a enfermedad humana, a pesar de contener todos los factores de virulencia necesarios.

En este trabajo no fue posible aislar *E. coli* O157:H7 a partir de leche de tanque de enfriado en tambor. No existen referencias bibliográficas de aislamiento de estos microorganismos a partir de leche en Argentina. En los últimos años se ha evidenciado que STEC O157:H7 está presente en las granjas lecheras (33). Sin embargo, no es fácil su aislamiento a partir de leche y productos lácteos, y la mayoría de los trabajos han reportado una incidencia nula o muy baja.

Murphy *et al.* (54) detectaron contaminación por STEC O157 en los filtros de la línea de ordeño en el 12% de 97 tambors, aislando 16 cepas mediante SIM. Rey *et al.* (61) aislaron STEC O157 del 0,3% de 360 muestras de leche de ovejas y cabras almacenada en tanques de tambors. Otros autores describieron la detección de STEC con una frecuencia variable de 3,8 a 16,3% en leche de tanque, pero ninguna de las cepas era perteneciente al serotipo (O157:H7) (38, 53).

Con respecto a la leche cruda y a productos lácteos para consumo, Abdul-Raouf y col. (1) describieron la contaminación por STEC O157 en el 6% de 50 muestras de leche cruda de vaca en Egipto (confirmación bioquímica y serológica), mientras que en Grecia (58) y en Turquía

(26) informaron que el 1% de las 100 muestras de leche cruda de vaca analizadas fue positivo para *E. coli* O157:H7. Otros autores no detectaron *E. coli* O157:H7 a partir de muestras de leche y productos lácteos (22, 23, 69).

Es sorprendente la baja proporción de aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de leche almacenada en tanques, cuando se compara con la alta prevalencia de este patógeno en los establecimientos de ordeño (70). Esto puede explicarse por dos razones. En primer lugar, hay una baja prevalencia de *E. coli* O157:H7 en vacas en ordeño dentro del rodeo de un tambo, a pesar de que la prevalencia entre los rodeos puede ser alta (33). Además, existe un gran factor de dilución que representa el mezclado en el tanque de almacenamiento de la leche proveniente de todas las vacas del tambo, durante uno o más ordeños.

Por otra parte, algunos componentes de la leche tienen un efecto inhibitorio sobre las bacterias contaminantes, en especial el sistema lactoperoxidasa, que si bien actúa preferentemente sobre bacterias gram positivas, tiene poder bactericida sobre las gram negativas, incluyendo a *E. coli* (46). Estudios con leche contaminada artificialmente han demostrado que el agregado de los componentes del sistema lactoperoxidasa produce la inhibición o inactivación de STEC O157 (36). Este sistema es más efectivo cuando el inóculo inicial y la temperatura son bajos (29, 65), condiciones existentes en un tanque de almacenamiento, en donde la leche es mantenida a temperaturas cercanas a los 3 °C y en donde cabe esperar, además, una baja concentración de *E. coli* O157:H7 debido al efecto de dilución.

Sin embargo, varios trabajos han demostrado la capacidad de *E. coli* O157:H7 para sobrevivir en productos lácteos fermentados (24, 49) y quesos (47), por lo cual la presencia de *E. coli* O157:H7 en leche destinada a la fabricación de estos productos, aun cuando se encuentre en bajas concentraciones, puede constituir una amenaza a la salud del consumidor.

En este estudio se pone de manifiesto el papel de la carne y los productos cárnicos en la epidemiología de las enfermedades producidas por *E. coli* O157:H7 en humanos. En nuestro país se ha descrito la asociación entre un caso de SUH y el consumo de hamburguesas caseras, la que fue confirmada por epidemiología molecular mediante PFGE (62).

Dada la alta incidencia del SUH y de las infecciones por STEC en nuestro país, es fundamental remarcar la importancia de la detección en alimentos mediante la implementación de técnicas sensibles. En mayo de 2004 se incluyó en el Código Alimentario Argentino la obligatoriedad de la detección de STEC O157 en carnes y productos cárnicos crudos y cocidos a nivel de boca de expendio. La detección temprana contribuirá a determinar las estrategias de control de la diseminación del patógeno en forma oportuna, de manera de evitar la aparición de nuevos casos.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido subsidiado parcialmente por la Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 2000 y CAI+D 2002) y la Fundación Alberto J. Roemmers, Argentina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abdul-Raouf UM, Ammar MS, Beuchat LR. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from some Egyptian foods. *Food Microbiol* 1996; 29: 423-6.
2. Ahmed R, Bopp A, Borzyk A, Kasatiya S. Phage-typing scheme for *Escherichia coli* serotype O157:H7. *J Infect Dis* 1987; 155: 806-9.
3. Ansary SE, Kaspar CW. Survey of retail cheeses, dairy processing environments and raw milk for *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 1997; 25: 131-4.
4. Armstrong GL, Hollingsworth J, Glenn Morris J (Jr). Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed world. *Epidemiol Rev* 1996; 18: 29-51.
5. Bell BP, Goldoft M, Griffin PM, Davis MA, Gordon DC, Tarr PI, et al. A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. *JAMA* 1994; 272: 1349-53.
6. Belongia EA, MacDonald KL, Parham GL, White KE, Korlath JA, Lobato MN, et al. An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 colitis associated with consumption of precooked meat patties. *J Infect Dis* 1991; 164: 338-43.
7. Beutin L, Montenegro MA, Ørskov I, Ørskov F, Prada J, Zimmermann S, et al. Close association of Verotoxin (Shiga-like toxin) production with enterohemolysin production in strains of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2559-64.
8. Blanco JE, Blanco M, Mora A, Prado C, Rio M, Fernandez L, et al. Detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef using immunomagnetic separation. *Microbiologia* 1996; 12: 385-94.
9. Brandt JR, Fouser LS, Watkins SL, Zelikovic I, Tarr PI, Nazar-Stewart V, et al. *Escherichia coli* O157:H7-associated hemolytic-uremic syndrome after ingestion of contaminated hamburgers. *J Pediatr* 1994; 125: 519-26.
10. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with eating a nationally distributed commercial brand of frozen ground beef patties and burgers-Colorado, 1997. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46: 777-8.
11. CDC (Centers for Disease Control and Prevention), Foodborne and Diarrheal Diseases Branch, Division of Bacterial and Mycotic Diseases, National Center for Infectious Diseases. Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: A Training Manual 1998; Atlanta, GA, USA.
12. CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating minced meat-United States, June-July 2002. *MMWR Morb Mort Wkly Rep* 2002; 51: 637.
13. CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). Cases of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with unpasteurised cream. *Commun Dis Rep CDR Wkly* 1998; 8: 377.
14. CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). *Escherichia coli* O157 associated with eating unpasteurized cheese. *Commun Dis Rep CDR Wkly*. 1999; 9: 113-6.
15. CDSC (Communicable Disease Surveillance Centre). Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurised milk. *Commun Dis Rep CDR Wkly* 2000; 9: 203-6.
16. Chapman PA, Wright DJ, Siddons CA. A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the

- isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from bovine faeces. *J Med Biol* 1994; 40: 424-7.
17. Chapman PA, Siddons CA, Cerdan Malo AT, Harkin MA. A one year study of *Escherichia coli* O157:H7 in raw beef and lamb products. *Epidemiol Infect* 2000; 124: 207-13.
  18. Chinen I, Tanaro JD, Miliwebsky E, Lound LH, Chillemi G, Ledri S, *et al.* Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in retail meat in Argentina. *J Food Protect* 2001; 64: 1346-51.
  19. Chinen I, Otero JL, Miliwebsky ES, Roldán ML, Baschkier A, Chillemi GM, *et al.* Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from calves in Argentina. *Res Vet Sci* 2003; 74: 2836-40.
  20. CNSAP (Comité de Nefrología de la Sociedad Argentina de Pediatría). Incidencia del síndrome urémico hemolítico (SUH) en la República Argentina. *Arch Arg Pediatr* 1995; 93: 409-11.
  21. Coia JE. Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 20: 1-9.
  22. Coia JE, Johnston Y, Steers N, Hanson MF. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw meats, raw cow's milk and raw-milk cheeses in South-East Scotland. *Int J Food Microbiol* 2001; 66: 63-9.
  23. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E, *et al.* Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol* 2004; 96: 67-73.
  24. Dineen SS, Takeuchi K, Soudah JE, Boor KJ. Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in dairy fermentation systems. *J Food Protect* 1998; 61: 1602-8.
  25. Djuretic T, Wall PG, Nichols G. General outbreaks of infectious intestinal disease associated with milk and dairy products in England and Wales: 1992 to 1996. *Commun Dis Rep CDR Review* 1997; 7: R41-R45.
  26. Dontorou C, Papadopoulou C, Filioussis G, Economou V, Apostolou I, Zakkas G, *et al.* Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Int J Food Microbiol* 2003; 82: 273-9.
  27. Dorn RC. *Escherichia coli* O157:H7. *JAVMA* 1995; 206: 1583-5.
  28. Durch J, Ringhand T, Manner K, Barnett M, Proctor M, Davis J, *et al.* Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds - Wisconsin, June 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2000; 49: 911-3.
  29. Elliot RM, McLay JC, Kennedy MJ, Simmonds RS. Inhibition of foodborne bacteria by the lactoperoxidase system in a beef cube system. *Int J Food Microbiol* 2004; 91: 73-81.
  30. Fitzpatrick M. Haemolytic uraemic syndrome and *E. coli* O157. *Brit Med J* 1999; 318: 684-5.
  31. Fratamico PM, Schultz FJ, Buchanan RL. Rapid isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from enrichment cultures of food using an immunomagnetic separation method. *Food Microbiol* 1992; 9: 105-13.
  32. 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.
  33. Hancock DD, Besser TE, Rice DH. Ecology of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle and impact of management practices. En: Kaper JB, O'Brien AD, editors. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington D.C., A S M Microbiology Press, 1998, p. 85-91.
  34. Heuvelink AE, Wernars K, de Boer E. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in retail raw meats in The Netherlands. *J Food Protect*. 1996; 59: 1267-72.
  35. Heuvelink AE, van den Biggelaar FLAM, de Boer E, Herbes RG, Melchers WJG, Huis In 't Veld JHJ, *et al.* Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 878-82.
  36. Heuvelink AE, Zwartkruis-Nahuis JTM, Beumer RR, de Boer E. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Protect* 1999; 62: 1115-22.
  37. Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Sci* 2005; 71: 676-89.
  38. Jarayao BM, Henning DR. Prevalence of foodborne pathogens in bulk tank milk. *J Dairy Sci* 2001; 84: 2157-62.
  39. Karch H, Bohm H, Schmidt H, Gunzer F, Aleksic S, Heesemann J. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1200-5.
  40. Karmali MA, Petric M, Lim C, Cheung R, Arbus GS. Sensitive method for detecting low numbers of Verotoxin-producing *Escherichia coli* in mixed cultures by use of colony sweeps and polymyxin extraction of Verotoxin. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 614-9.
  41. Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, McKay RW, Barret TJ, *et al.* A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *J Infect Dis* 1997; 176: 815-8.
  42. Khakhria R, Duch D, Lior H. Extended phage-typing scheme for *Escherichia coli* O157:H7. *Epidemiol Infect* 1990; 105: 511-20.
  43. Kudva IT, Hatfield PG, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7 in microbial flora of sheep. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 431-3.
  44. Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Relamed IC, Motter M, *et al.* Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev Argent Microbiol* 2005; 37: 1-10.
  45. Mac Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Ed. Médica Panamericana, 1980; p. 302
  46. McLay JC, Kennedy MJ, O'Rourke RM, Elliot RS, Simmonds RS. Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *Int J Food Microbiol* 2002; 73: 1-9.
  47. Maher MM, Jordan KN, Upton ME, Coffey A. Growth and survival of *E. coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of a smear-ripened cheese produced from raw milk. *J Appl Microbiol* 2001; 90: 201-7.
  48. Marguet ER, Ledesma P. Aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en un tambo ovino. *Vet Arg* 1999; XVI: 170-4.
  49. Massa S, Altieri C, Quaranta V, De Pace R. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4 °C. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 347-50.
  50. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, *et al.* (2004) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol* 96: 189-98.
  51. Meng J, Doyle M. Microbiology of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in foods. En: Kaper JB, O'Brien AD, editors. *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington D.C. A S M Press, 1998, p. 92-108.
  52. Ministerio de Salud y Ambiente, 2005 ([www.msal.gov.ar](http://www.msal.gov.ar)).
  53. Muehlherr JE, Zweifel C, Corti S, Blanco JE, Stephan R. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3849-56.
  54. Murphy BP, Murphy M, Buckley JF, Gilroy D, Rowe MT, McCleery, *et al.* In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157:H7 surveillance of milk production holdings. *Int J Hyg Environ Health* 2005; 208: 407-13.
  55. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 142-201.
  56. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory

- Standards). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test 2004, 8th edition, Vol. 24, N° 1. Approved standard M100-S13. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
57. Nishikawa Y, Zhou Z, Ogasawara J, Cheasty T, Haruki K. Relationship of genetic type of Shiga toxin to manifestation of bloody diarrhea due to enterohemorrhagic *Escherichia coli* serogroup O157 isolates in Osaka City, Japan. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2440-2.
  58. Öksüz Ö, Arici M, Kurultay S, Gümüs T. Incidence of *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey. *Food Control* 2004; 15: 453-6.
  59. Paton JC, Paton AW. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11: 450-79.
  60. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Inf Dis* 2005; 11: 603-9.
  61. Rey J, Sánchez S, Blanco JE, Hermoso de Mendoza J, Hermoso de Mendoza M, García A, *et al.* Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *Int J Food Microbiol* 2006; 107: 212-7.
  62. Rivas M, Caletti MG, Chinen I, Refi SM, Roldán CD, Chillemi G, *et al.* Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg Inf Dis* 2003; 9: 1184-6.
  63. Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Roldán CD, Balbi L, García B, *et al.* Characterization and epidemiology subtyping of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremia syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis* 2006; 88-96.
  64. 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.
  65. Seifu E, Buys EM, Donkin EF, Petzer IM. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system against food-borne pathogens in Saanen and South African Indigenous goat milk. *Food Control* 2004; 15: 447-52.
  66. Stampi S, Caprioli A, De Luca G, Quaglio P, Sacchetti R, Zanetti F. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine meat products in Northern Italy. *Int J Food Microbiol* 2004; 90: 257-62.
  67. 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 analysis. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 1339-43.
  68. Upton P, Coia JE. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply (Letter). *Lancet* 1994; 344: 1015.
  69. Vernozy-Rozand C, Mazuy-Cruchaudet C, Bavai C, Montet MP, Bonin V, Dernburg A, *et al.* Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int J Food Microbiol* 2005; 105: 83-8.
  70. Wells JG, Shipman KD, Greene EG, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, *et al.* Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 985-9.
  71. Whipp SC, Rasmussen MA, Cray WC. Animals as a source of *Escherichia coli* pathogenic for human beings. *JAVMA* 1994; 204: 1168-75.
  72. Wright DJ, Chapman PA, Siddons CA. Immunomagnetic separation as a sensitive method for isolating *Escherichia coli* O157 from food samples. *Epidemiol Infect* 1994; 113: 31-9.