

DETECCION DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA (STEC) EN ALIMENTOS.

Autores: Gómez, Diana (1); Miliwebsky, Elizabeth (3); Fernández Pascua, Carlos (1); Amezttoy Ana María (1); Baschkier, Ariela (3); Manfredi, Eduardo (3); Zotta, Marcelo (1); Córdoba, Marcelo (1); Nario, Flavia (2); Piquín, Andrea (2); Rivas, Marta (3); Parma, Alberto (4).
 (1) Instituto Nacional de Epidemiología "Dr.J.H.Jara" - ANLIS "Dr.C.G.Malbrán"; (2) Laboratorio de Control de Calidad, Supermercados Toledo
 (3) Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "Dr.C.G.Malbrán"; (4) Universidad del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Veterinarias;

INTRODUCCION:

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC), importante patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), puede causar enfermedades severas en el hombre, como colitis hemorrágica (CH), Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y Púrpura Trombocitopénica Trombótica (PTT). Las cepas de esta categoría de *E. coli* producen potentes citotoxinas, llamadas toxinas Shiga (Stx1, Stx2 y variantes de Stx2). La infección por STEC fue reconocida por primera vez, por Riley y col. en 1982 en EE.UU. cuya cepa correspondió al serotipo O157:H7. Desde entonces, este serotipo ha sido asociado a numerosos brotes en distintas partes del mundo. Algunos de estos brotes se han relacionado con el consumo de alimentos: carnes, leche no pasteurizada, yogures artesanales, sandwiches de pollo, jugo de manzana no pasteurizado, agua de consumo y recreacional, entre otros. La transmisión persona a persona, por la ruta fecal-oral, es también muy importante especialmente en comunidades cerradas como guarderías, hogares de ancianos y escuelas. Menos de 10 UFC de *E. coli* O157:H7 pueden ser suficientes para causar la enfermedad en humanos. Dosis infectivas bajas, de 2 a 2.000 microorganismos, han sido asociadas con brotes. Las cepas STEC causantes de infecciones en seres humanos, pertenecen a un amplísimo número de serotipos, habiéndose detectado la producción de Stx en cepas pertenecientes a más de 50. A nivel mundial se han descrito brotes asociados a los serotipos O111:H-; O117:H4; O121:H19; O145:H-; O26:H11, entre otros.

PROPOSITO

-Contribuir con la prevención y control de la diarrea mucosanguinolenta y SUH, con el fin de disminuir su morbi-mortalidad, a través de la identificación de alimentos potencialmente causantes de infección.

OBJETIVO GENERAL

-Conocer la frecuencia de detección de STEC en hamburguesas y quesos de pasta blanda.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Establecer la frecuencia de aislamiento de *E. coli* O157:H7 y otros STEC en hamburguesas y quesos de pasta blanda, alimentos implicados como fuente de infección.
2. Caracterizar feno-genotípicamente las cepas STEC aisladas.
3. Realizar estudios de sensibilidad antimicrobiana de dichos patógenos.

MATERIAL y METODO:

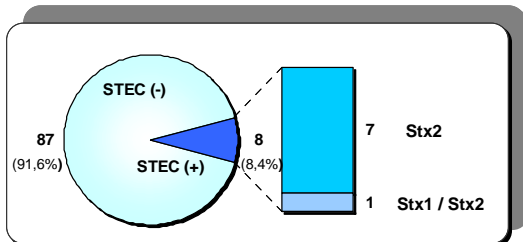
Durante el período 1998 - 2000, se recibieron aislamientos de *E. coli* provenientes de 95 muestras de hamburguesas congeladas y 114 muestras de quesos de pasta blanda. El protocolo de primo-aislamiento e identificación se realizó según Blanco J.E. y col. La caracterización genotípica de los factores de virulencia se realizó por:
 *PCR utilizando como "primers" los oligonucleótidos específicos que amplifican fragmentos de los genes de *stx1*, *stx2* (según Pollard y col. J Clin Microbiol 1990;28:540-5) y Enterohemolisina(*E-hly*) (según Schmidt y col. Infect Immun 1995; 63:1055-61)
 *Pruebas de hibridación con sondas genéticas marcadas con digoxigenina en condiciones de alta astringencia, para la detección de los genes que codifican el factor *eae* (según Nataro y col. J Infect Dis 1985; 152:560-5) y *stx1*, *stx2* (según Thomas y col. Mol cel Probes 1991; 5:129-35)
 *PCR y RFLP (análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción) para la caracterización de variantes de *stx2* (según Tyler y col. J Clin Microbiol 1991;29:1339-43)
 El serogrupo de las cepas se realizó con los antisueros somáticos O26, O55, O111, O119, O142, O157 y el flagelar H7, provistos por el Instituto de Producción de Biológicos, ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Se completó la serotipificación con antisueros O y H (Denka Seiken Co., Ltd. Japón) (según Ørskov y col. Methods in Microbiol 1984; 14: 43-112). Estos resultados fueron confirmados por la Dra. Beatriz Guth de la Disciplina Microbiología, EPM, UNIFESP, Sao Paulo, Brasil. Se realizaron ensayos de citotoxicidad específica en células Vero de sobrenadantes y extractos celulares periplásmicos, utilizando anticuerpos monoclonales Stx1 (MAb13C4) y Stx2 (MAb BC5BB12). (según Karmali y col. J Clin Microbiol 1985; 22: 614-9)
 El perfil de sensibilidad a ampicilina, neomicina, ciprofloxacina, trimetoprima-sulfametoxazol, cloranfenicol, norfloxacina, colistina, gentamicina y furazolidona de los aislamientos se determinó por el método de difusión por disco de Kirby-Bauer (NCCLS Standards Methods. Doc M2 A5. Vol.13 N°24, 1995).

RESULTADOS:

HAMBURGUESAS

Se analizaron 95 muestras de hamburguesas de carne vacuna, conservadas por supercongelación (-18 °C). En 86 (90,5 %) muestras se aisló *E. coli*.

Figura 1
Distribución de STEC y tipos de toxina Shiga en Hamburguesas Mar del Plata. 1998- 2000. (n=95)



Se detectó STEC en 8/95 (8,4%) de las muestras (Figura 1), 7 de esos aislamientos fueron caracterizados como *eae- /stx2 / E-hly+* y el restante como *eae- /stx1/2 / E-hly+*. Todas las cepas STEC produjeron Stx en los ensayos de citotoxicidad específica en células Vero y fueron sensibles a los antimicrobianos ensayados. Los serotipos detectados en orden de frecuencia fueron: O8:H19 (3), O113:H21 (2), O8:H16 (1), O39:H49 (1) y O113:H21 (1). Una cepa STEC O113:H21 portaba los genes que codifican para la variante *stx2vh-b*. (Tabla 2).

QUESOS:

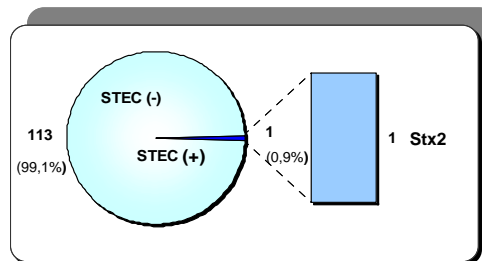
Se procesaron 114 muestras de quesos de pasta blanda cuyos tipos se presentan en la Tabla 1. En 94 (83 %) muestras se aisló *E. coli* y los recuentos oscilaron entre 10 y 10⁴ UFC/g (20).

Tabla 1
Tipos de quesos de pasta blanda Mar del Plata. 1998 - 2000.

Tipos de quesos	Frecuencia	Porcentaje
Port-salut	39	34,2 %
Cremoso	36	31,6 %
Cuartirollo	39	34,2 %
Total	114	100,0 %

De acuerdo a los criterios de aceptación de calidad bromatológica para quesos de pasta blanda con contenido de humedad > 46 % y < 55 %, adoptados según normas Mercosur, los recuentos de las muestras procesadas cumplieron con el rango de aceptabilidad permitido (coliformes/g; 30°C; m=10000 y M=100000).

Figura 2
Distribución de STEC y tipos de toxina Shiga en quesos de pasta blanda Mar del Plata. 1998-2000. (n = 114)



En 1/114 (0,9%) muestras (Figura 2) se detectó STEC O8:H19, *eae- /stx2 / hly+* sensible a los antimicrobianos ensayados.(Tabla 2). La cepa STEC fue aislada de una muestra de queso cuartirollo con un recuento de coliformes totales de 80 UFC/g. Las características feno-genotípicas de las cepas STEC aisladas de hamburguesas y quesos de pasta blanda se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2 Detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en alimentos. Mar del Plata. 1998-2000

ALIMENTO	MUESTRAS POSITIVAS Nº (%)	SEROTIPO	FACTOR DE VIRULENCIA		
			eaeA	stx	E-hly
Hamburguesas Congeladas (n=95)	8 (8,4)	O8:H16 (1)	-	2	+
		O8:H19 (2)	-	2	+
		O8:H19 (1)	-	1/2	+
		O39:H49 (1)	-	2	+
		O113:H21 (1)	-	2vh-b	+
		O113:H21 (1)	-	2	+
Quesos de pasta blanda (n=114)	1 (0,9)	O8:H19	-	2	+

CONCLUSION:

-En los alimentos estudiados se detectó la presencia de STEC en el 8,4% de las muestras de hamburguesas y en el 0,9 % de las muestras de quesos de pasta blanda.
 -El serotipo O8:H19 fue el más frecuente. El perfil genotípico prevalente fue *eae- /stx2 / hly+*. Ninguna cepa correspondió al serotipo O157:H7 frecuentemente asociado a casos de CH, SUH y PTT.
 -Se enfatiza la necesidad de utilizar técnicas de detección más sensibles para detectar STEC O157:H7, de manera de establecer la frecuencia de este patógeno en alimentos.
 -Se debe ampliar la búsqueda de STEC a otros alimentos, como posibles fuentes de infección, de manera de apoyar los programas de control de este microorganismo emergente en la Argentina.
 -Se considera de gran interés comunicar al sector productivo sobre estos hallazgos a los efectos de que tomen las medidas necesarias y correspondientes en los procesos, para evitar la aparición y sobrevida del microorganismo.

DISCUSION:

-A pesar que los quesos resultaron aptos para su consumo, debe considerarse de potencial importancia la presencia de una cepa STEC *stx2+*, por tratarse de un alimento que no requiere una cocción previa para su ingesta. -Nuestra investigación continúa, planteándonos nuevos interrogantes referidos a si el antagonismo de la flora acompañante sería suficiente para interferir con la supervivencia de estos patógenos que pueden producir enfermedad con una dosis infectiva muy baja (<100 UFC/g).