

Validación de la detección de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) en hamburguesas crudas mediante el uso de PCR a tiempo real (BAX® System Q7, DuPont) utilizando «WET POOLS»

Validation of the detection of STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 and O157) in raw burgers using real-time PCR (BAX® System Q7, DuPont) in «WET POOLS»

Mussio, Paula ⁽¹⁾, Martínez, Inés ⁽²⁾, Soumastre, Martina ⁽²⁾, Maquieira, Ana Ma. ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU – ⁽²⁾ Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

Contacto: imartin@latu.org.uy

RECIBIDO: 30/05/2014 – APROBADO: 20/10/2014

Resumen

Las Escherichia coli productoras de Toxinas Shiga (STEC) O157:H7 y no-O157 son patógenos alimentarios emergentes, responsables de numerosos brotes a nivel mundial. Muchos alimentos han sido vinculados a estos brotes, principalmente las hamburguesas de carne bovina insuficientemente cocidas. Dada la creciente producción y consumo de hamburguesas en nuestro país, es importante disponer de técnicas rápidas para el screening e identificación de estas cepas en alimentos.

En este trabajo se evaluó la sensibilidad y especificidad para detectar las siete cepas STEC: O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157 en hamburguesas congeladas crudas, utilizando los kits «STEC Screening stx/eae» para la búsqueda de los genes stx/eae y los kits «STEC Panel 1 E. coli O26, O111, O121», «STEC Panel 2 E. coli O45, O103, O145» y «E. coli O157:H7 MP» (DuPont) para los diferentes serogrupos. Se validó la utilización de muestras compuestas (wet pools), evaluando la recuperación de los positivos en medios selectivos luego de la inmunocentración específica de cada cepa y la detección de los genes de virulencia stx y eae en cultivos aislados mediante PCR multiplex a tiempo final. Se validó una técnica que permite la detección de las cepas STEC mencionadas utilizando wet pools, con límites de detección de 1-5 UFC en 65 gramos de hamburguesas congeladas crudas.

Palabras clave: Patógenos alimentarios emergentes, Escherichia coli shiga-toxigénicas, factores de virulencia, muestras compuestas, carne bovina.

Abstract

Shiga toxins-producing Escherichia coli (STEC) O157:H7 and no-O157:H7 have been identified as emerging foodborne pathogens responsible for an increasing number of outbreaks worldwide. Many foods have been associated to these outbreaks, mainly undercooked beef burgers. Due to the increasing production and consumption of burgers in our country, it is important to have a rapid technique to identify and isolate the most important STEC strains in foods matrices.

The objective of these investigation was to assess the sensitivity, specificity and limit detection for the screening of the most prevalent STEC in frozen raw beef burgers, using the «STEC Screening stx/eae» kit to detect the stx/eae genes and the «Panel 1 STEC E. coli O26, O111, O121» and «Panel 2 STEC E. coli O45, O103, O145» and «E. coli O157: H7 MP» (DuPont) kits for the detection of the different serogroups. The use of composed samples (wet pools), the recovery of each strain from the positives samples on selective media after specified immunocentration and the detection of stx/eae virulence genes in isolates by PCR were also evaluated. A technique that allows the detection of the mentioned STEC strains with limits of detection between 1-5 CFU in 65 grams of raw frozen hamburgers using wet pools, was validated.

Keywords: Emerging food pathogens, Escherichia coli Shiga toxigenic, virulence factors, composed samples, raw beef.

Introducción

Las *Escherichia coli* productoras de Toxinas Shiga (STEC) han sido identificadas como importantes patógenos transmitidos por alimentos. Los serogrupos de STEC O157:H7 y los no-O157, dentro de ellos *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 y O145, referidos en la literatura como «Big Six STEC», constituyen un problema creciente para la salud pública a nivel mundial (Brooks, et al., 2005). Las STEC son responsables de enfermedades gastrointestinales e infecciones graves tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica (HC) (D'Aoust, et al., 2007; Varela, et al., 2008).

La patogenicidad de las STEC depende mayoritariamente de la producción de factores de virulencia tales como las toxinas Shiga. Estas proteínas son codificadas por diferentes genes (*stx1* y *stx2*) con actividades biológicas similares (Hussein, 2007). Uno de los efectos de estas toxinas es el daño en las células endoteliales del intestino y riñón del huésped. Las cepas STEC patógenas también producen otros factores de virulencia que pueden aumentar la severidad de las enfermedades que provocan, por ejemplo, intimina y enterohemolisina, involucradas en la adherencia íntima a la superficie intestinal y posterior daño a los enterocitos (Hussein, 2007). La intimina y la enterohemolisina codificadas por los genes *eae* y *ehxA*, respectivamente, se encuentran en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 (Neill, 1997) y en la mayoría de las cepas STEC no-O157. Por definición, una STEC contiene uno o ambos genes involucrados en la producción de la toxina Shiga (*stx1* y/o *stx2*) y el gen *eae* (Paton y Paton, 2000; Hussein, 2007), por lo que los mismos suelen utilizarse como marcadores para la detección de estos microorganismos mediante técnicas moleculares.

En los brotes alimentarios ocasionados por cepas STEC se ha señalado al ganado vacuno como su principal reservorio y a la carne picada insuficientemente cocida como su vehículo más frecuente (Marzocca, et al., 2006; Hussein, 2007; Masana, et al., 2011). Esto se debe a que es probable que la carne se contamine durante el proceso de sacrificio y faenado de los bovinos. Asimismo, el procesamiento del picado y su manipulación suponen un riesgo extra en lo que a inocuidad respecta (Signorini, et al., 2009).

Según datos aportados por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Estados Unidos, del total de los casos de enfermedades humanas provocadas por STEC en el año 2006, 36% se debieron a cepas de *E. coli* O157 y 64% a cepas no-O157. De estas últimas, entre un 70 a un 83% fueron ocasionadas por alguno de los seis serogrupos STEC anteriormente mencionados (CDC, 2011).

Por otra parte, en Europa las infecciones ocasionadas por STECs no-O157 son más frecuentes que las producidas por O157:H7 (Pradel, et al., 2000; Varela, et al., 2008). En los últimos tres años, los casos de infecciones por no-O157 aumentaron vertiginosamente debido al brote ocurrido en Alemania en el año 2011 (EFSA y ECDC, 2013).

En América del Sur, desde fines de los años noventa en Chile y en Argentina se han reportado casos de diarrea y SUH vinculados tanto a *Escherichia coli* O157:H7 como a serogrupos no-O157 (Rios, et al., 1999; Rivas, et al., 2008). En Uruguay, el primer caso de diarrea sanguinolenta vinculada a *E. coli* O157:H7 se informó en una niña de 16 meses en el año 2002 (Gadea, et al., 2004).

Debido entre otros factores al último brote ocurrido en Europa en el año 2011, muchos países han aumentado significativamente el número de controles oficiales destinados

a la detección de la presencia de STEC en alimentos, tanto en aquellos que se importan como en los que se exportan (USDA, 2011; EFSA y ECDC, 2013).

Pese al creciente interés por la detección de las STEC no-O157 a nivel mundial, las técnicas de búsqueda e identificación de estas cepas en alimentos se encuentran aún en pleno desarrollo. Tanto en Europa como en Estados Unidos la detección de estos patógenos está remitida a unos pocos laboratorios especializados, ya que no resultan sencillas la detección y diferenciación de los diversos serogrupos en los medios de cultivo disponibles. Al mismo tiempo, no es fácil acceder a los insumos necesarios para su detección con la celeridad correspondiente (CDC, 2005; USDA, 2011).

En este trabajo se presenta una metodología que permite la detección rápida de los siete serogrupos de STEC más prevalentes a nivel mundial (O26, O45, O103, O111, O145, O121 y O157) en una matriz alimentaria compleja (hamburguesas congeladas crudas) mediante el uso de insumos accesibles en el mercado. La misma sigue los lineamientos de la técnica desarrollada y utilizada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para estos patógenos (USDA, 2013), que permite tanto la detección como el aislamiento e identificación de las cepas en las muestras positivas. Aplicando esta metodología es posible detectar mediante PCR a tiempo real las siete cepas STEC anteriormente mencionadas con límites de detección muy bajos, utilizando muestras compuestas (wet pools). Se evaluó además la recuperación de las muestras positivas en medios selectivos luego de la inmunocentración (IMS) específica de cada cepa y la detección de los factores de virulencia *stx/eae* en cultivos aislados mediante PCR multiplex a tiempo final.

Materiales y Métodos

Cepas de referencia

Se utilizaron seis cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) no-O157, adquiridas del Instituto Statens Serum (Copenhague, Denmark): O26, O45, O103, O111, O121 y O145 y la cepa *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) perteneciente a la colección del Departamento de Microbiología del LATU. En la Tabla 1 se muestran los perfiles de virulencia característicos de las cepas según información del proveedor, los cuales fueron confirmados mediante PCR multiplex en el laboratorio.

| Cepa de STEC | Genes de virulencia |
|--------------|----------------------|
| O26 | <i>stx1/eae</i> |
| O45 | <i>stx1/stx2/eae</i> |
| O103 | <i>stx1/eae</i> |
| O111 | <i>stx1/stx2/eae</i> |
| O121 | <i>stx2/eae</i> |
| O145 | <i>stx2/eae</i> |
| O157:H7 | <i>stx1/stx2/eae</i> |

Tabla 1. Perfiles de virulencia de las siete cepas de STEC de referencia utilizadas.

Preparación del inóculo

Las siete cepas STEC de referencia se sembraron individualmente en el medio Nutrient Broth (Oxoid, Basingstoke, UK) y se incubaron overnight a (37.0 ± 1.0) °C con agitación de 120 rpm. Cumplido el tiempo de incubación se realizaron diluciones sucesivas a partir de dicho caldo (concentración estimada mediante curva de recuentos del laboratorio $\approx 1 \times 10^9$ UFC/mL) hasta obtener una concentración final aproximada de 100 UFC/mL. Se inocularon las muestras con 50 μ L de esa suspensión (carga estimada: 0 a 5 UFC) y se realizaron recuentos por quintuplicado en Petrifilm™ AC (3M, USA) del mismo volumen inoculado.

Determinación de la sensibilidad y límite de detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna mediante Bax® System Real-Time PCR (DuPont)

Inoculación de las muestras

Se inocularon 65 g de hamburguesa 100% carne vacuna (perteneciente al establecimiento de mayor producción de hamburguesas de Uruguay) con 0 a 5 UFC de cada una de las siete cepas de STEC individualmente. Las muestras fueron homogeneizadas de forma manual y rápidamente llevadas a refrigeración (3.0 ± 2.0) °C con el fin de generar un estrés en el inóculo. Luego de 4 horas, las muestras se hidrataron con 195 mL de caldo Tryptic Soy Broth, Modified w/8mg/L Novobiocin & Acid Digest of Casein - mTSB (Acumedia, Michigan, USA) de modo de mantener una relación 1:4 (muestra: caldo de cultivo) y se incubaron en estufa a (41.5 ± 1.0) °C durante 18 a 22 horas.

Paralelamente, se realizó una muestra control (blanco) que consistió en 325 g de hamburguesa 100% carne vacuna sin inocular. El blanco se hidrató con 975 mL de mTSB y se incubó en las mismas condiciones que las muestras inoculadas.

Extracción de ADN

Cumplido el tiempo de incubación, se realizó la extracción de ADN genómico de todas las muestras. La lisis fue realizada siguiendo el protocolo establecido por el proveedor, utilizando Bax® System Lysis Buffer adicionado con Bax® System Proteasa (DuPont, USA).

Bax® System Real-Time PCR

Se realizó el screening de presencia de STEC en la muestra blanco utilizando el kit «STEC Screening *stx/ae*» (DuPont) en el equipo Bax® System Q7 (DuPont). Una vez confirmada la ausencia en la muestra blanco, se procedió al screening de las muestras inoculadas. Para ello se generaron wet pools mezclando una parte de la lisis de la muestra inoculada con cuatro partes de la lisis de la muestra blanco. Luego de someterlos al screening, los wet pools fueron evaluados frente a los kits «STEC Panel 1 *E. coli* O26, O111, O121», «STEC Panel 2 *E. coli* O45, O103, O145» y «*E. coli* O157:H7 MP» (DuPont). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Recuperación y confirmación de las siete cepas STEC inoculadas en hamburguesas 100% carne vacuna

Inmunoconcentración específica de los serogrupos y siembra a medios selectivos

Una vez realizado el screening de los serogrupos empleando wet pools, se realizó la inmunoconcentración de los caldos inoculados empleando perlas específicas para cada serogrupo: RapidCheck® CONFIRM O26 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O45 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O103 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O111 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O121 Magnetic Particles, RapidCheck® CONFIRM O145 Magnetic Particles (Sdix, Delaware, USA) y Dynabeads® Magnet Beads for *E. coli* O157:H7 (Life Technologies, USA). De manera de verificar la especificidad y la sensibilidad de la IMS para cada serogrupo, se realizó un pool de todos los caldos inoculados. Del mismo se tomaron siete alícuotas de 1 mL cada una y se sometieron a la separación magnética de cada serogrupo con las perlas correspondientes, según las instrucciones brindadas por el fabricante. El inmunoconcentrado correspondiente a cada cepa se sembró en diferentes medios selectivos y diferenciales. Para los productos de la separación inmunomagnética de las STEC no-O157 se usó Agar Sangre lavada con Mitomicina – MWBA (Sugiyama, et al., 2001) y Rainbow Agar – RA (Biolog, USA) suplementado con 0,8 mg/L de telurito de potasio y 10 mg/L de novobiocina. La descripción de las morfologías esperadas descritas por el fabricante para cada serogrupo en Rainbow Agar se muestra en la Tabla 2. Para las inmunoconcentradas con perlas de *E. coli* O157:H7 se utilizó el medio «CHROMagar™O157» (CHROMagar™, París, Francia) suplementado con telurito de potasio (2.5 mg/L) y novobiocina (5mg/L).

| Serogrupo | Descripción de colonias en Rainbow Agar |
|-----------|---|
| O26 | Colonias violeta con borde blanco |
| O45 | Colonias violeta, violeta-grisáceas, magenta claro. Borde blanco |
| O103 | Colonias gris, violeta, violeta-azuladas. Borde blanco |
| O111 | Colonias gris, gris-azuladas |
| O121 | Colonias violeta, magenta. Borde violáceo difuso |
| O145 | Colonias violeta-grisáceas, violeta-azuladas. Borde violáceo difuso |

Tabla 2. Descripción de morfologías esperadas de STEC en Rainbow agar.

Confirmación de colonias sospechosas de STEC: PCR y serología

Con el propósito de realizar la confirmación, se repicaron todas las colonias que presentaban fenotipo sospechoso en los diferentes medios selectivos a Tryptone Soya Agar (TSA, Oxoid, Basingstoke, UK). Se seleccionó un aislamiento por fenotipo y por medio de cultivo selectivo empleado, de acuerdo a las características descritas en la bibliografía de referencia. A las mismas se les realizó la búsqueda de los genes que codifican los factores de virulencia: toxinas Shiga (*stx1*, *stx2*) e Intimina (*eae*) mediante PCR multiplex a tiempo final, utilizando el kit comercial «*E. coli* DEC PCR» (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). La mezcla de reacción así como el ciclo de amplificación utilizado fueron los descritos por el fabricante del kit empleado. Los productos de PCR se corrieron en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed™ (Biotium, USA). En la Tabla 3 se muestran los tamaños de los amplicones esperados para cada gen de virulencia. Luego de la confirmación de la presencia de los genes de virulencia por PCR en cada aislado, se prosiguió a la identificación serológica.

Para las pruebas serológicas se seleccionó una sola colonia por cada serogrupo que previamente hubiese confirmado la presencia de los genes de virulencia mediante PCR. Para las presuntas colonias de *E. coli* O26, O103, O111 y O145 se utilizó la prueba de latex «Dry Spot Technology Serocheck (Oxoid, Basingstoke, UK)», para O45 y O121 se utilizó «*E. coli* Antisera» (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark) y para O157:H7 «RIM™ *E. coli* O157:H7 Latex Test» (Remel, Lenexa, USA).

| Gen diana | Tamaño del amplicón esperado (pb) |
|-------------|-----------------------------------|
| <i>stx1</i> | 260 |
| <i>eae</i> | 377 |
| <i>stx2</i> | 420 |

Tabla 3. Tamaños de los amplicones esperados para cada gen de virulencia al utilizar el kit «*E. coli* DEC PCR» (Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark).

Extrapolación de la detección de STEC a otras formulaciones de hamburguesas y establecimientos

Se validó la detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna y en hamburguesas con agregado de proteína de soja, así como provenientes de diferentes establecimientos de producción (cinco mayores productores del mercado interno). Para esto se inocularon 20 muestras de hamburguesas de 65 g (dos muestras de cada tipo por establecimiento) con 0-5 UFC de *E. coli* O26 y se realizaron los screenings correspondientes en el Bax® System Q7 (DuPont), según procedimiento previamente detallado. El recuento del inóculo utilizado se realizó mediante Petrifilm™ AC (3M, USA) por quintuplicado. Se optó por la utilización de la cepa *Escherichia coli* O26 para estas pruebas por tratarse de la STEC no-O157 con mayor prevalencia a nivel internacional (Varela, et al., 2008;

Mathusa, et al., 2010). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Validación de la especificidad y recuperación de las siete cepas de STEC

Se realizó el recuento de aerobios totales de diez hamburguesas, correspondientes a las dos formulaciones de los cinco establecimientos productores, mediante el método de siembra incorporado en Plate Count Agar (Oxoid, Basingstoke, UK). Se seleccionó el tipo de hamburguesa (formulación y establecimiento) que presentó el mayor valor de recuento de aerobios totales, y se inoculó 65 g de dicha muestra con 0 a 5 UFC de cada una de las siete cepas. Se prosiguió a la incubación y detección de los serogrupos inoculados según el procedimiento previamente descrito. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Determinación del límite de detección de STEC de la técnica

A partir de las diferentes pruebas en las que se realizaron inoculaciones de las muestras se determinó el límite de detección de la técnica ensayada para cada serogrupo, tomando el menor valor de recuento para el cual se obtuvo un resultado positivo para el screening y la confirmación del serotipo en cuestión.

Resultados

Detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna mediante Bax® System Real-Time PCR (DuPont)

Al confirmar la ausencia de STECs en la muestra blanco, se procedió a la realización de los wet pools para llevar a cabo el screening de las muestras inoculadas. La detección de los genes de virulencia (*stx/eae*) y de los serogrupos de STEC inoculados en las muestras de hamburguesas fue positiva en todos los casos, con una carga bacteriana comprendida entre 0 a 5 UFC (Tabla 4).

Recuperación y confirmación de las cepas inoculadas en hamburguesas 100% carne vacuna

Recuperación en medios selectivos

Los productos de las inmunocentraciones correspondientes a cada cepa fueron sembrados en los medios específicos: MWBA, Rainbow agar y CHROMagar O157. En el primero se obtuvieron colonias blancas y pequeñas rodeadas de hemólisis. En Rainbow Agar se obtuvieron colonias sospechosas con diferentes morfologías, y por último, en el medio CHROMagar O157 las colonias presuntivas de *Escherichia coli* O157 presentaron color malva. La descripción completa de lo recuperado se describe en la Tabla 5.

| Cepa inoculada | Concentración de inóculos (UFC) | Screening <i>stx/eae</i> | Panel 1 (O26, O111, O121) | Panel 2 (O45, O103, O145) | <i>E. coli</i> O157:H7 |
|----------------|---------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------|
| O26 | 2 [1;4] | + | O26+ | | |
| O45 | 4 [2;5] | + | | O45+ | |
| O103 | 2 [1;3] | + | | O103+ | |
| O111 | 3 [2;5] | + | O111+ | | |
| O121 | 1 [0;2] | + | O121+ | | |
| O145 | 5 [4;6] | + | | O145+ | |
| O157 | 2 [1;4] | + | | | + |

Tabla 4. Resultados obtenidos de la detección de las siete cepas de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) utilizando los kits del Bax[®]SystemQ7 (DuPont). La concentración de cada inóculo se presenta como n [x;y], siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

Confirmación de la presencia de genes de virulencia mediante PCR multiplex a tiempo final

En la Figura 1 se presenta el resultado de la PCR multiplex a tiempo final de las colonias sospechosas de STEC, descritas previamente en la Tabla 5, subcultivadas desde los medios selectivos a TSA.

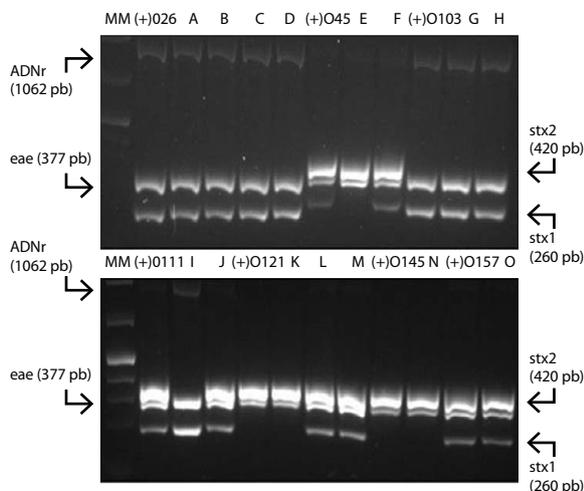


Figura 1. Productos de amplificación de PCR multiplex en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed. Carriles (A-D): Aislados presuntivos de *E. coli* O26, Carriles (E-F): Aislados presuntivos de *E. coli* O45, Carriles (G-H): Aislados presuntivos de *E. coli* O103, Carriles (I-J): Aislados presuntivos de *E. coli* O111, Carriles (K-M): Aislados presuntivos de *E. coli* O121, Carril (N): Aislado presuntivo de *E. coli* O145, Carril (O): Aislado presuntivo de *E. coli* O157. (+) O26: Control positivo de *E. coli* O26, (+) O45: Control positivo de *E. coli* O45, (+) O103: Control positivo de *E. coli* O103, (+) O111: Control positivo de *E. coli* O111, (+) O121: Control positivo de *E. coli* O121. (+) O145: Control positivo de *E. coli* O145, (+) O157: Control positivo de *E. coli* O157: H7. MM (Marcador Tamaño Molecular): GeneRuler[™] 1kb Plus DNA ladder (Fermentas, USA).

En la mayoría de las muestras se observa una banda de 1062 pb del control positivo de amplificación del kit utilizado, correspondiente al gen ADNr 16S. Se observa además que al menos una colonia sospechosa de cada serogrupo inmunocentrado confirmó mediante PCR multiplex a tiempo final el perfil de virulencia esperado.

Para los aislamientos de *E. coli* O26 (carriles A-D) y *E. coli* O103 (carriles G y H), se observan dos bandas de 260 y 377 pb correspondientes a los genes *stx1* y *eae*, respectivamente. Para *E. coli* O45 (carriles E-F), únicamente el aislamiento sembrado en el carril F presentó tres bandas de 420, 377 y 260 pb, correspondientes a los genes *stx2*, *eae* y *stx1*, respectivamente. De manera similar, en los aislamientos de *E. coli* O111 (carril I-J) se logró confirmar una única colonia sospechosa (carril J) al obtenerse las tres bandas correspondientes a *stx2*, *eae* y *stx1*. Por otra parte, de tres colonias presuntivas de *E. coli* O121 (carril K-M) solo la sembrada en el carril K presentó dos bandas de 420 pb (*stx2*) y 377 pb (*eae*). Los mismos patrones de banda se obtuvieron para el aislamiento de *E. coli* O145 (carril N). Finalmente, para *E. coli* O157 (carril O) se observaron tres bandas de 420, 377 y 260 pb, correspondientes a los genes *stx2*, *eae* y *stx1*.

Confirmación mediante serología

A aquella colonia correspondiente a cada serogrupo de STEC que mediante PCR multiplex a tiempo final presentó el perfil genético esperado (ver Tabla 1), se le realizaron pruebas serológicas específicas para el serogrupo en cuestión. El resultado de dichas pruebas fue positivo en todos los casos.

Extrapolación de la detección de STEC a otras formulaciones de hamburguesas y establecimientos

Tal como se muestra en la Tabla 6, el screening de los genes *stx/eae* y del serogrupo O26 en las muestras de hamburguesas de carne y proteína de soja correspondientes a diferentes establecimientos fue positivo. La concentración del inóculo utilizado determinado mediante Petrifilm[™]AC (3M, USA) fue de 3 UFC.

| Serogrupo Inmunoconcentrado | Descripción de las colonias recuperadas | | |
|--------------------------------|--|--|-----------------|
| | Rainbow Agar | MWBA | CHROMagar O157 |
| O26 | A - Violeta con borde blanco B - Violeta azuladas | C - Blanca pequeña, poca hemólisis D - Blanca mediana, poca hemólisis | n.s. |
| O45 | E - Violeta con borde blanco | F - Blanca pequeña con hemólisis | n.s. |
| O103 | G - Violeta con borde blanco | H - Blanca pequeña con hemólisis | n.s. |
| O111 | I - Gris Azuladas | J - Blanca pequeña con hemólisis | n.s. |
| O121 | K - Púrpura con halo violáceo difuso L - Púrpura | M - Blanca con hemólisis | n.s. |
| O145 | N - Púrpura con halo violáceo difuso | No se recuperaron colonias hemolíticas | n.s. |
| O157 | n.s. | n.s. | O - Color malva |

Tabla 5. Descripción de colonias sospechosas aisladas en cada medio utilizado a partir de la IMS para cada serogrupo de STEC inoculado en las muestras. (n.s.): No sembrada.

| Muestra hamburguesa: Establecimiento - Tipo | Concentración de Inóculo (UFC) | Screening serogrupo |
|--|-----------------------------------|------------------------|
| 1 - 100% carne | 3 [0;5] | O26+ |
| 1 - Con agregado de prot. de soja | | |
| 2 - 100% carne | | |
| 2 - Con agregado de prot. de soja | | |
| 3 - 100% carne | | |
| 3 - Con agregado de prot. de soja | | |
| 4 - 100% carne | | |
| 4 - Con agregado de prot. de soja | | |
| 5 - 100% carne | | |
| 5 - Con agregado de prot. de soja | | |

Tabla 6. Resultados de la recuperación del serogrupo O26 en los dos tipos de formulación de todos los establecimientos. La concentración del inóculo se presenta como n [x;y]; siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

Validación de la especificidad en la recuperación de las siete cepas de STEC

En la Tabla 7 se presentan las concentraciones de aerobios totales obtenidas en las 10 muestras de hamburguesas sembradas. Se seleccionó la muestra que presentó la mayor

concentración (Hamburguesa 6), para evaluar con ella la especificidad de la recuperación de las siete cepas STEC inoculadas simultáneamente. En la Tabla 8 se resumen las concentraciones de los inóculos de cada serogrupo y el resultado del screening de los mismos, el cual resultó positivo en todos los casos.

| Muestras | Concentración de aerobios totales (UFC/g) |
|----------|---|
| 1 | 4,8 x 10 ⁴ |
| 2 | 7,7 x 10 ⁴ |
| 3 | 2,1 x 10 ⁵ |
| 4 | 6,8 x 10 ⁵ |
| 5 | 2,8 x 10 ⁶ |
| 6 | (E) 4,2 x 10 ⁷ |
| 7 | 4,1 x 10 ³ |
| 8 | 2,4 x 10 ⁴ |
| 9 | 5,7 x 10 ³ |
| 10 | 6,9 x 10 ⁴ |

Tabla 7. Concentraciones de aerobios totales en los diferentes tipos de hamburguesas (cinco establecimientos, dos formulaciones). (E): Valor estimado.

Determinación del límite de detección de STEC de la técnica

La Tabla 9 resume el límite de detección de la técnica para cada serogrupo, teniendo en cuenta los diferentes inóculos realizados durante las etapas del estudio.

| Cepas STEC | Límite de detección (UFC) |
|------------|---------------------------|
| O26 | 2 [1;4] |
| O45 | 3 [1;5] |
| O103 | 2 [1;2] |
| O111 | 3 [2;5] |
| O121 | 1 [0;2] |
| O145 | 5 [2;8] |
| O157 | 2 [1;4] |

Tabla 9. Límite de detección determinado para cada serogrupo inoculado. Se presenta como n [x;y]; siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

Discusión

Detección de STEC en hamburguesas 100% carne vacuna mediante Bax[®] System Real-Time PCR (DuPont)

Los resultados de la Tabla 4 demuestran la sensibilidad de la metodología utilizada en este trabajo, ya que la detección de

| Cepa STEC inoculada | Concentración del Inóculo (UFC) | Panel 1 | Panel 2 | <i>E. coli</i> O157:H7 |
|---------------------|---------------------------------|---------|---------|------------------------|
| O26 | 5 [3;6] | O26+ | | |
| O45 | 3 [1;5] | | O45+ | |
| O103 | 2 [1;2] | | O103+ | |
| O111 | 5 [3;6] | O111+ | | |
| O121 | 2 [1;3] | O121+ | | |
| O145 | 5 [2;8] | | O145+ | |
| O157 | 4 [2;5] | | | + |

Tabla 8. Resultados de los inóculos y detección de las 7 cepas de STEC en la muestra de mayor concentración de aerobios totales mediante Bax[®] System Real-Time PCR. La concentración de cada inóculo se presenta como n [x;y]; siendo «n» el valor promedio recuperado, y «x» e «y» los valores inferior y superior del intervalo de confianza calculado.

las cepas STEC inoculadas en las muestras de hamburguesas fue exitosa, incluso utilizando inóculos muy bajos y wet pools. Por tanto, la metodología validada demostró que el empleo de muestras compuestas resultó adecuado y no interfirió en la detección de STEC en hamburguesas congeladas crudas.

Recuperación y confirmación de las cepas inoculadas en hamburguesas 100% carne vacuna

Recuperación en medios selectivos

Respecto a la recuperación de las cepas en medios selectivos, las mismas presentaron colonias de morfología típica de STEC O157 y no-O157, según lo detallado en los catálogos comerciales disponibles. De todos modos, las morfologías de los diferentes serogrupos son muy similares entre sí, no siendo sencilla su discriminación basada en las características que se describen en las referencias bibliográficas provistas por los proveedores de los medios. Por esto resulta importante seleccionar más de un fenotipo de cada cepa para proseguir con las etapas de confirmación. Asimismo, cabe destacar la buena funcionalidad del medio MWBA para diferenciar las colonias de STEC, debido a la clara zona de hemólisis producidas por las mismas, en coincidencia con lo descrito en la literatura (Sugiyama, et al., 2001).

Confirmación de la presencia de genes de virulencia mediante PCR multiplex a tiempo final

La amplificación de los controles positivos de cada cepa de referencia demostró que durante la reacción de PCR multiplex a tiempo final no hubo inhibiciones. Esta etapa permitió confirmar que al menos una de las colonias sos-

pechosas recuperadas mediante IMS correspondía a las cepas inoculadas en las muestras de hamburguesas, ya que los genes que amplificaron coinciden con los descritos por el proveedor para cada cepa de referencia (Ver Tabla 1).

En el gel de electroforesis presentado (Figura 1) se puede apreciar que algunos de los aislamientos no presentaron el perfil genético esperado para cada serogrupo. Este hecho se debe principalmente a que la inmunoconcentración no es 100% específica. Es decir, si bien permite «limpiar» concentrando las cepas del serogrupo deseado, otras *E. coli* presentes en las muestras continúan en el producto final de la inmunoconcentración y crecen en los medios selectivos haciendo más compleja la selección de colonias.

El resultado obtenido era esperado, ya que la concentración se realizó a partir del caldo de cultivo que contenía las siete cepas de STEC, y por tanto era posible que durante la etapa confirmatoria mediante PCR multiplex se obtuvieran perfiles asociados a los diferentes serogrupos. A pesar de que estos resultados evidencian las principales limitaciones de esta técnica (reacciones cruzadas y falsos positivos), es importante resaltar que la misma permitió la confirmación de al menos una colonia sospechosa de cada cepa de STEC inoculada en las muestras de hamburguesas.

Se considera que a la hora del análisis de muestras en el laboratorio resultaría interesante incorporar en esta etapa del protocolo una reacción de PCR a tiempo final que permita confirmar el serogrupo buscado, dado que al seguir esta metodología desde una muestra naturalmente contaminada no se conoce qué genes de virulencia están presentes en la cepa aislada. El PCR a tiempo final es una técnica económica y nos permitiría asegurar que la colonia aislada corresponde al serogrupo buscado y que, a la vez, contiene los genes asociados a los factores de virulencia.

Confirmación mediante serología

Al igual que en las técnicas habituales de detección de patógenos, las pruebas serológicas se utilizan con el objetivo de culminar la confirmación de la identidad de las cepas aisladas. Estas resultan definitivas al momento de verificar el cumplimiento de las reglamentaciones actuales referentes a STECs, debido a que se considera un resultado positivo con la presencia de determinados serotipos de *E. coli* shigatoxigénica, confirmados finalmente por estas técnicas.

Es importante destacar que en el mercado existen disponibles pruebas serológicas que permiten la confirmación de varios serogrupos de STECs en simultáneo. Estos, así como nuevos productos que se desarrollen, podrían ser de gran utilidad como tamizaje en la etapa de confirmación. Sin embargo, al finalizar la técnica de búsqueda se debería realizar la confirmación con sueros específicos para cada serotipo buscado.

Extrapolación de la detección de STEC a otras formulaciones de hamburguesas y establecimientos

Los resultados obtenidos de la detección de *Escherichia coli* O26 en hamburguesas de distinta formulación (100% carne vacuna o con agregado de proteína de soja) y producidas por diferentes establecimientos demostraron que estos parámetros no influyen en la performance de la metodología de

screening validada en este trabajo. Por tanto, podría emplearse adecuadamente para la búsqueda rápida de estos patógenos en hamburguesas congeladas crudas, independientemente de la composición de la mezcla cárnica.

Validación de la especificidad en la recuperación de las siete cepas de STEC

La recuperación de las siete cepas de STEC cuando estas fueron inoculadas simultáneamente demostró la alta especificidad de la técnica validada para detectarlas y aislarlas cuando se encuentran compitiendo entre sí y con la carga microbiana propia del alimento.

Determinación del límite de detección de STEC de la técnica

Al ser las STECs patógenos alimentarios, las técnicas que se utilizan para su detección incluyen técnicas cualitativas de gran sensibilidad. Estas tienen la capacidad de detectarlas aun cuando estos patógenos están presentes en los alimentos en muy bajas concentraciones y en distintos tamaños de muestra.

Si bien en Uruguay no existe normativa con respecto a estas cepas, dada la importancia y el impacto a la salud de las STECs y de la *E. coli* O157:H7 en particular, los países que las reglamentaron exigen ausencia en 65 g de muestra. Por este motivo, la técnica de detección de STEC evaluada en este trabajo fue desafiada con valores menores a 10 UFC de estos patógenos.

Los resultados observados en la Tabla 8 muestran que para todas las cepas de STEC ensayadas la técnica validada tiene en promedio un límite de detección por debajo de 5 UFC. De acuerdo a lo anteriormente planteado, este valor se considera sumamente adecuado para la detección de estos patógenos alimentarios.

Conclusiones

Durante la realización de este trabajo se llevó a cabo la validación de la detección mediante PCR a tiempo real de las siete cepas *Escherichia coli* shigatoxigénicas: O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157, mediante la utilización de los kits disponibles comercialmente: «STEC Screening *stx/eae*», «STEC Panel 1 *E. coli* O26, O111, O121», «STEC Panel 2 *E. coli* O45, O103, O145» y «*E. coli* O157:H7 MP» (DuPont) y el equipo Bax® System Q7 (DuPont).

Se evaluó la utilización de muestras compuestas (wet pools), la recuperación de los positivos en medios selectivos luego de la inmunoconcentración específica de cada cepa y la detección de los genes de virulencia *stx/eae* en cultivos aislados mediante PCR multiplex a tiempo final.

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la validación se logró poner a punto una técnica de detección rápida y confiable que puede ser aplicada en laboratorios especializados e industriales para el screening de las siete cepas de STEC más prevalentes a nivel mundial en hamburguesas crudas, empleando muestras compuestas, con límites de detección menores a 5 UFC (valor adecuado para la búsqueda de este tipo de patógenos en alimentos).

Reconocimientos

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), al Instituto Nacional de Carnes (INAC) y al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por la financiación del proyecto de investigación gracias al cual se desarrolló este trabajo.

Referencias

- Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M. y Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States 1983-2002. En: *The Journal of Infectious Disease*. 192, pp.1422-9.
- CDC, 2005. Bacterial foodborne and diarrheal disease national case surveillance [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/fbsurvsumm2005.pdf>
- CDC, 2011. *National enteric disease surveillance: shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC). Annual Report 2011* [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/national-stec-surv-summ-2011-508c.pdf>
- D'Aoust, J.Y., Barnes, R., Carter, M., Drake, S.L., Evanson, D., Fanning, S., Flowers, R., Giaccone, V., Jaykus, L.A., Jouve, J.L., Kennedy, J., McClure, J., McNamara, A., Madsen, M., Nesbakken, T., Notermans, S., O'Brien, S., Ottaviani, F., Ottaviani, M., Smoot, M., Swaminathan, B., Vernozy-Rozand, C., Wall, P. y Whyte, P., 2007. *Food safety handbook. Microbiological challenges*. Montreal: Biométrieux. ISBN: 978-2-917162-08-8.
- EFSA y ECDC, 2013. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011 [En línea]. En: *EFSA Journal*, 11(4), pp.1-250 [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3129.htm>
- Gadea, M.P., Varela, G., Bernadà, M., Sirok, A., Mota, M.I., Sabelli, R., Grittiuz, G., Schelotto, F., Chinen, I., Chillemi, G. y Rivas, M., 2004. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. En: *Revista Médica Uruguaya*, 20, pp.79-81.
- Hussein, H. S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. En: *Journal of Animal Science*, 85 (E. Suppl.), pp.E63-E72.
- Marzocca, M. A., Marucci, P. L., Sica, M. G. y Álvarez, E. E., 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 38, pp.38-40.
- Masana, M.O., D' Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Castillo, L. L., Carbonari, C., Leotta, G.A., Vilacoba, E., Irino, K. y Rivas, M., 2011. Genotypic characterization of non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. En: *Journal of Food Protection*, 74(12), pp.2008-2017.
- Mathusa, E.C., Yuhuan, C., Enache, E. y Hontz, L., 2010. Non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in foods. En: *Journal of Food Protection*, 73(9), pp.1721-1736.
- Neill, M.A., 1997. Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. En: *Journal of Food Protection*, 60, pp.1444-1446.
- Paton, J.C. y Paton, A.W., 2000. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. En: *Science & Medicine*, 8(3), pp.28-37.
- Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J.B., Reynaud, A., Scheutz, F., Sirot, J., Joly, B. y Forestier, C., 2000. Prevalence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food and children during a one-year prospective study in France. En: *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), pp.1023-1031.
- Rios, M., Prado, V., Trucksis, M., Arellano, C., Borie, C., Alexandre, M., Fica, A. y Levine, M., 1999. Clonal diversity of Chilean isolates of enterohemorrhagic *Escherichia coli* from patients with hemolytic-uremic syndrome, asymptomatic subjects, animal reservoirs, and food products. En: *Journal of Clinical Microbiology*, 37(3), pp.778-781.
- Rivas, M., Sosa-Estani, S., Rangel, J., Caletti, M.G., Vallés, P., Roldán, C. D., Balbi, L., Marsano D.E., Mollar, M.C., Amoedo, D., Miliwebsky, E., Chinen, I., Hoekstra, R.M., Mead, P. y Griffin, P., 2008. Risk factors for sporadic shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. En: *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), pp.763-771.
- Signorini, M. L., Marín, V., Quinteros, C. y Tarabla, H., 2009. Hábitos de consumo de hamburguesas y riesgo de exposición a *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC): modelo de simulación. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 41, pp.168-176.
- Sugiyama, K., Inoue, K. y Sakazaki, R., 2001. Mitomycin-supplemented washed blood agar for the isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than O157:H7. En: *Letters in Applied Microbiology*, 33, pp.193-195.
- USDA, Food Safety and Inspection Service, 2011. *Shiga toxin-producing Escherichia coli in certain raw beef products* [En línea]. Washington: USDA. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf>
- USDA, 2013. *Detection and isolation of non-O157 Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges* [En línea]. Washington: USDA. [Consulta: mayo 2013]. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>
- Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M.I., González, S., González, G., Gugliada M.J., Carbonari, C.C., Algorta, G., Bernadà, M., Sabelli, R., Pardo, L., Rivas, M. y Schelotto, F., 2008. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 40, pp.93-100.