



INFORME BREVE

Calidad higiénico-sanitaria en plantas de faena de la provincia de Tucumán. Detección, aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga



Gabriela B. Pérez Terrazzino^{a,*}, Marina S. Condori^{b,c}, Alejandro López Campo^d, Silvia Vega^{b,c}, Carolina Carbonari^e, Isabel Chinen^e, Marta Rivas^e, Marta C. de Castillo^a y María A. Jure^a

^a Cátedra de Bacteriología, Instituto de Microbiología «Luis C. Verna», Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

^b Dirección de Bromatología, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

^c Cátedra de Bromatología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

^d Dirección de Ganadería, Provincia de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina

^e Servicio Fisiopatogenia, Departamento Bacteriología, INEI-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán», Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

Recibido el 4 de julio de 2016; aceptado el 8 de noviembre de 2016

Disponible en Internet el 31 de mayo de 2017

PALABRAS CLAVE

Media res;
Calidad
higiénico-sanitaria;
STEC;
Caracterización
molecular

Resumen Los bovinos son el principal reservorio de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC); las estrategias para evitar su transmisión se concentran en la planta de faena. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad higiénico-sanitaria y la frecuencia de detección de STEC en medias reses bovinas de frigoríficos de tránsito provincial. Se procesaron 274 esponjados de media res; en 9 (3,3%) el recuento de *E. coli* genérico fue marginal, en 4 (1,4%) se aisló *E. coli* O157, de los cuales 2 fueron caracterizados como *stx_{2c}(vh-a)/eae/ehxA*, y los otros 2 como no toxigénicos. A partir de una (0,4%) muestra se aisló *E. coli* no-O157 ONT:H49, *stx_{2a}/ehxA/saa*. En este trabajo la calidad del producto analizado indica que en la provincia de Tucumán se cumplen las buenas prácticas de manufactura en la faena de bovinos.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gabrielaterrazzino@hotmail.com (G.B. Pérez Terrazzino).

KEYWORDS

Beef carcasses;
Hygienic-sanitary
quality;
STEC;
Molecular
characterization

Hygienic-sanitary quality in abattoirs from Tucuman province, Argentina. Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*

Abstract Cattle are the main reservoir of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC), and the strategies to prevent the transmission of these microorganisms are concentrated in the slaughtering plant. The aim of this study was to evaluate the hygienic-sanitary quality and the frequency of detection of STEC in beef carcasses in abattoirs from Tucuman province. Two hundred and seventy four beef carcass sponges were processed; the count of generic *E. coli* was marginal in 9 (3,3%) of them. *Escherichia coli* O157 was isolated in 4 (1,4%) samples; 2 of which were characterized as *stx_{2c}(vh-a)/eae/ehxA* whereas the other 2 were non-toxicogenic strains. Non-O157 *E. coli* ONT:H49, *stx_{2a}/ehxA/saa* was isolated from 1 sample (0,4%). In this work the quality of the analyzed product indicates that the good practices of manufacture are fulfilled in slaughtering facilities in Tucumán province.

© 2017 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Escherichia coli productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos. El serotipo O157:H7 es el prototipo de un grupo más amplio de cepas STEC, entre los que se incluyen las cepas O26:H11, O103:H2, O111:NM, O113:H21 y O145:NM, reconocidas por la Organización Mundial de la Salud por su potencial patogénico. La infección por STEC puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico¹.

Los rumiantes, en particular los bovinos, son considerados como el principal reservorio de STEC, y la contaminación de las carcasas bovinas con el contenido intestinal durante el proceso de faena está relacionada con los procedimientos de remoción del cuero y las vísceras. Los recuentos elevados de *E. coli* genérico, microorganismo indicador de contaminación fecal, se relacionan con la carencia de buenas prácticas de higiene en el frigorífico⁹.

Estudios de STEC en frigoríficos de Argentina mostraron una prevalencia del serotipo O157 del 4,1% en heces de bovinos y del 2,6% en carcasas⁴, y de STEC no-O157, del 22,3 y el 9%, respectivamente⁵. En la provincia de Tucumán, Jure et al.² reportaron un porcentaje de aislamiento de STEC O157 inferior al 1%; no existen estudios previos sobre detección de STEC no-O157 en media res.

En Argentina, los frigoríficos habilitados se clasifican como A (productos de exportación y mercado interno), B, C y rurales (tránsito provincial). Esta habilitación se basa en una estimación del régimen «animal-hora» y «producción-hora» en relación con la capacidad útil de las instalaciones del establecimiento (Reglamento SENASA Decreto 4238/68 actualizado <http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File753-Capitulos.pdf>)

El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad higiénico-sanitaria en el proceso de faena y determinar la frecuencia de detección y aislamiento de STEC en medias reses bovinas en frigoríficos de tránsito provincial.

Recolección de muestras: en el período febrero del 2011-diciembre del 2015, se tomaron 274 muestras de medias reses en 8 establecimientos de faena de diferentes localidades de la provincia de Tucumán: Capital (n=51), Bella Vista (n=46), Santa Bárbara (n=23), Lules (n=17),

La Reducción (n=24), Famaillá (n=37), Aguilares (n=36) y Monteros (n=40).

La toma de muestra se llevó a cabo en el momento de la faena, en la cámara de oreo, según normativas del SENASA (Circular 3192/96-Anexo II). Para el recuento de *E. coli* genérico, cada media res fue hisopada en 4 áreas diferentes de 100 cm² cada una: cuadril, vacío, pecho y cogote. Los hisopos se colocaron en bolsas con agua peptona bufferada (Britania S.A., CABA, Argentina). Para la detección de *E. coli* O157 y STEC, se utilizaron esponjas 3M[®] con caldo tripticasa de soya modificado con 8 µg de novobiocina y casaminoácidos (TSBm, Neogen, Michigan, EE.UU.). Las muestras se trasladaron refrigeradas al laboratorio para su posterior análisis.

Control higiénico-sanitario: se realizó el recuento de *E. coli* en placas Petrifilm 3M[®] (PETRIFILM[®] AOAC Official Method 991.14 o 998.08). Según normativas del SENASA, se consideró como valor «aceptable» un conteo menor de 5 UFC/cm², como «marginal» uno de 5 a 100 UFC/cm² y como «inaceptable» aquel mayor de 100 UFC/cm².

Detección, aislamiento y caracterización de *E. coli* O157:H7: se siguió la normativa USDA MLG 5.05 (*United States Department of Agriculture-Food Safety Inspection Services*¹³). Las etapas metodológicas fueron las siguientes:

1. Enriquecimiento en medio selectivo: a cada bolsa que contenía un esponjado de media res se le agregaron 40 ml de TSBm, este material se incubó a 37 °C durante 24 h.
2. Tamizaje a partir del caldo de enriquecimiento: se utilizaron tiras inmunocromatográficas RapidCheck[®] *E. coli* O157 Test Kit (Strategic Diagnostic Inc., Newark, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
3. Separación inmunomagnética: se utilizaron perlas inmunomagnéticas (Dynabeads[®] Dynal Brown Deer, EE. UU. y Beijing, China, pertenecientes a Dynal Biotech). El producto inmunocentrado (100 µl) se separó en 2 alícuotas de 50 µl, una de estas alícuotas se sembró en agar MacConkey sorbitol (Becton Dickinson, EE. UU.) adicionado con cefixima-telurito (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) (CT-SMAC), la otra se sembró en CHROMagar

- (París, Francia). Las placas fueron incubadas a 37 °C durante 24 h. De cada placa se seleccionaron colonias presuntivas para su identificación bioquímica.
4. Caracterización fenotípica y serotipificación: la identificación bioquímica se realizó mediante las pruebas de fermentación de celobiosa, crecimiento en cianuro de potasio, producción de pigmento y lisina descarboxilasa (Britania). La detección de movilidad se realizó en medio de Craigie¹¹ y la determinación del biotipo mediante la fermentación de sorbitol, dulcitol, rafinosa y ramnosa (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio, EE. UU.). La serotipificación se realizó con antisuero somático O157 (Oxoid, Ltd., Hampshire, Reino Unido) y flagelar H7 (Instituto Nacional de Producción de Biológicos-ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán»).
 5. Determinación del perfil de sensibilidad a los antimicrobianos: se realizó por el método de difusión en agar con discos siguiendo las normas del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), documento M100-S24 (http://clsi.org/blog/2014/01/27/m100-s24_em100_2014), y se utilizó como cepa control *E. coli* ATCC 25922. Se evaluaron los siguientes antimicrobianos: ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), colistina (10 µg), estreptomina (10 µg), gentamicina (10 µg), nitrofurantoína (300 µg), tetraciclina (30 µg) y trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg).
 6. Caracterización molecular: se realizó por PCR múltiple para los genes *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157}. La caracterización de los marcadores de virulencia accesorios *eae*, *ehxA* y *fliC*_{H7} se realizó por PCR simple mediante protocolos previamente estandarizados¹¹.
 7. Subtipificación de toxina Shiga: se efectuó mediante el estudio de polimorfismo utilizando PCR-RFLP¹².

Detección y aislamiento de STEC no-O157: las muestras de esponjados de media res se incubaron en agua peptona bufferada a 37 °C durante 24 h. Se utilizó como control positivo la cepa *E. coli* EDL 933, como control negativo, la cepa *E. coli* ATCC 25922, y como control de sistema, caldo de enriquecimiento sin muestra. A partir del caldo enriquecido de cada una de las muestras se tomó una alícuota de 1 ml y se realizó la extracción de ADN total. Simultáneamente, se conservó 1 ml de este caldo con 30% de glicerol a -20 °C para continuar con su procesamiento, en caso de que la muestra resultara positiva al tamizaje para los genes *stx* por PCR-MK¹¹.

Los caldos de las muestras positivas se reactivaron en medio EC y se sembraron en placas agar MacConkey y EMB-Levine. De las placas con medio MacConkey, se realizó el análisis por PCR-MK de los extractos de ADN obtenidos de la zona de confluencia. De las placas de Levine, se seleccionaron 50 colonias que se repicaron en una placa grillada de agar MacConkey y a partir de estas se realizaron *pools* de 5 colonias cada uno, de los que se extrajo el ADN total para utilizarlo como templado en una segunda PCR-MK. En los *pools stx* positivos se realizó una tercera PCR-MK a cada una de las 5 colonias que los conformaban, para individualizarlas.

Caracterización fenotípica y genotípica: se realizaron pruebas bioquímicas y serotipificación con antígenos

somáticos y flagelares¹¹. Todas las colonias se ensayaron con el antisuero anti-O siguiendo la técnica de aglutinación en lámina y la detección del antígeno H se realizó según la técnica de aglutinación en tubo con antisuero anti-H⁶. Para la determinación del serogrupo se utilizaron antisueros producidos por el Instituto Nacional de Producción de Biológicos ANLIS «Dr. Carlos G. Malbrán». Para la determinación del antígeno flagelar se utilizaron diferentes antisueros (Denka Seiken, Japón). La caracterización molecular de las colonias *stx* positivas se realizó mediante PCR múltiple para los genes *stx*₁, *stx*₂, *rfb*_{O157}, los marcadores de virulencia accesorios *eae*, *ehxA* y *saa* (adhesina autoaglutinante) se detectaron también por PCR mediante protocolos previamente estandarizados¹¹.

Para determinar la asociación entre recuentos de *E. coli* genérico marginal y aislamientos de *E. coli* O157 y no-O157 en las 4 estaciones del año, se realizaron tablas de contingencia basadas en el test de chi al cuadrado de Pearson con el *software* InfoStat versión 2014 (Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Recuento de *E. coli* genérico: de los 274 hisopados de media res recolectados, en el 96,7% (n=265) se obtuvo un recuento aceptable (<5 UFC/cm²) y en el 3,3% (n=9) un recuento marginal (5-100 UFC/cm²).

Detección, aislamiento y caracterización de *E. coli* O157: el 11% (n=29) de las 274 muestras analizadas fue positivo presuntivo para la detección de *E. coli* O157.

Se identificaron 4 aislamientos de *E. coli* O157; 2 de ellos fueron caracterizados como STEC O157:H7 *stx*_{2c(vh-a)}/*eae/ehxA*. Dos aislamientos no toxigénicos fueron O157: NM/*eae(-)/ehxA(-)*. Ningún aislamiento presentó resistencia a los antimicrobianos ensayados.

Detección, aislamiento y caracterización de *E. coli* no-O157: el 3,3% (n=9) de las 274 muestras analizadas fueron positivas al primer tamizaje por PCR-MK. El segundo tamizaje (zona de confluencia de placas de MacConkey agar) fue positivo en el 2,2% (n=6) de las muestras. Solo de una de ellas, que no presentó recuento marginal de *E. coli* genérico, se aisló *E. coli* no-O157, caracterizado como ONT:H49, *stx*₂/*ehxA/saa*.

En un período de muestreo de 5 años, *E. coli* O157 se aisló en otoño en 1/69 muestras de media res, en invierno en 2/76 y en primavera en 1/89. En verano se aisló STEC no-O157 en 1/40 muestras. No se detectaron variaciones en la frecuencia de aislamiento de *E. coli* O157 y no-O157 al comparar las estaciones del año.

Los 4 aislamientos de *E. coli* O157 obtenidos correspondieron a 3 de los 8 frigoríficos estudiados. En el frigorífico A se obtuvieron 2 aislamientos de *E. coli* O157 de 46 muestras procesadas (4,65%) y en el frigorífico B se obtuvo un aislamiento de 51 muestras procesadas (1,96%); esos aislamientos no se correlacionaron con un recuento de *E. coli* genérico marginal. En el frigorífico C se obtuvo un aislamiento de 24 muestras procesadas (4,17%), que se correlacionó con un recuento de *E. coli* genérico marginal (fig. 1).

En este estudio el recuento de *E. coli* genérico presentó valores marginales en el 3,3% de las muestras (9/274), los que difieren de los reportados por Martínez-Chávez et al.³, que informan un 12% (16/138) de muestras con recuento marginal.

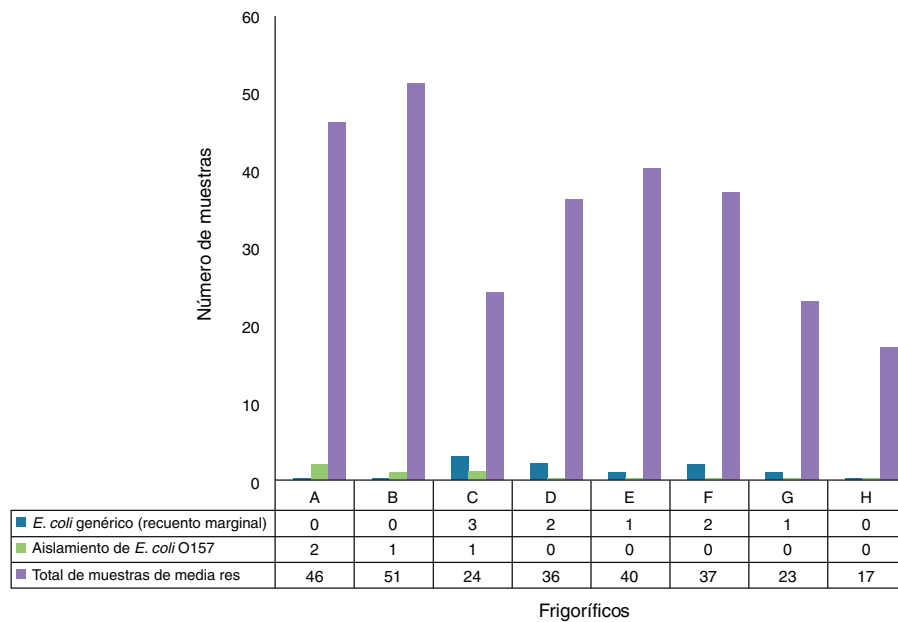


Figura 1 Distribución de aislamientos de *E. coli* O157 y recuentos marginales de *E. coli* genérico. Frigoríficos de Tucumán (2011-2015).

El porcentaje de aislamiento de STEC O157 en carcasas es variable, ya que influyen factores como el tipo de animal, la edad, los regímenes de alimentación, la cantidad de muestra procesada y las metodologías de detección⁸.

En el presente estudio la frecuencia de aislamiento de STEC O157 fue inferior al 1%, lo que difiere del dato aportado por Varela Hernández et al.¹⁴, del 2,7%.

Las cepas STEC O157 fueron caracterizadas como *stx*_{2c(vh-a2)}/*eae/ehxA/fliC*_{H7}. Esta variante de toxina Shiga es detectada en casos de enfermedad humana en baja frecuencia en Argentina, la variante prevalente es la *stx*_{2a}/*stx*_{2c}¹⁰.

Reyes Rodríguez et al.⁷ detectaron aislamientos de STEC O157 resistentes a cefalotina, carbenicilina y amicacina. Estos resultados difieren de los obtenidos en esta investigación, pues los aislamientos fueron sensibles a todos los antimicrobianos ensayados.

En el estudio realizado por Masana et al.⁵, el 9% de las carcasas presentaron contaminación con STEC no-O157. Los principales serotipos identificados fueron O178:H9, O8:H19, O130:H11 y O113:H21, descriptos como productores de SUH en Argentina. En nuestro estudio, la frecuencia de detección de genes *stx* en media res fue del 3,3%, pero *E. coli* no-O157 solo se aisló en una de las muestras (1,9%) y fue caracterizada como ONT:H49.

Si bien en Argentina las normas vigentes para el control de la calidad microbiológica (tanto para muestras ambientales como de carcasas) y el control higiénico-sanitario en las plantas de faena están implementadas en los establecimientos clasificados como exportadores (categoría A) y no rigen en las plantas de faena de tránsito provincial (categorías B o C), la carencia de datos referidos a la cadena de producción-comercialización de carne bovina en Tucumán hace necesario profundizar los estudios en las distintas etapas de este proceso, para poder detectar los puntos críticos de contaminación.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Tucumán. Programa CIUNT D 543/3; y por Agencia Nacional de Promoción Científica – PICTO OTNA N°79. Préstamo BID.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos a la Lic. Elena Bru, Profesional Principal CERELA-CONICET por su asesoramiento en el análisis estadístico de los datos.

Bibliografía

- Griffin PM, Brooks JT, Sowers EG, Weels JG, Greene KD. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. Public Health Resouces.

2005. Paper 230. [Online]. [acceso Jul 2016]. Disponible en: <http://digitalcommons.unl.edu/publichealthresources/230>
- Jure MA, Condorí MS, Pérez Terrazzino G, Catalán MG, López Campo A, Zolezzi G, Chinen I, Rivas M, Castillo M. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. *Rev Argent Microbiol.* 2015;47:125–31.
 - Martínez Chávez L, Cabrera Díaz E, Pérez Montaña JA, Garay Martínez LE, Varela Hernández JJ, Castillo A, Lucía L, Ávila Novoa MG, Cardona López MA, Gutiérrez González P, Martínez Gonzáles NE. Quantitative distribution of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* on beef carcasses and raw beef at retail establishments. *Int J Food Microbiol.* 2015;210:149–55.
 - Masana MO, Leotta GA, del Castillo LL, d'Astek BA, Palladino PM, Galli L, Vilacoba E, Carbonari C, 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;73:649–56.
 - Masana MO, d'Astek BA, Palladino PM, Galli L, del Castillo LL, Carbonari C, Leotta GA, Vilacoba E, Irino K, Rivas M. Genotypic characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. *J Food Prot.* 2011;74:2008–17.
 - Ørskov F, Ørskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. En: Bergan T, editor. *Methods in microbiology*, 14. London: Academic Press; 1984. p. 43–112.
 - Reyes Rodríguez NE, Talavera Rojas M, Varela Guerrero JA, Barba León J, Gutiérrez Castillo AC, Alonso Fresán U. Prevalencia y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* O157:H7 aislada de canales de bovinos sacrificados en rastros del altiplano central Mexicano. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2013;4:235–42.
 - Rhoades JR, Duffy G, Koutsoumanis. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiol.* 2009;26:357–76.
 - Rigobelo EC, Stella AE, Ávila FA, Macedo C, Marin JM. Characterization of *Escherichia coli* isolated from carcasses of beef cattle during their processing at an abattoir in Brazil. *Int J Food Microbiol.* 2006;110:194–8.
 - Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta G. Epidemiología del síndrome urémico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina (B Aires).* 2006;66(III):27–32.
 - Rivas M, Leotta GA, Chinen I. WHO Global *Salmonella* Survival. Manual de procedimientos para el diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de alimentos. 2013. [acceso Jul 2016]. Disponible en: <http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/manual E.coli.pdf>
 - 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.
 - United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service Office of Public Health and Science. En: Deyand BP, Lattuada CP, editores. Detection, isolation and identification of *Escherichia coli* O157:H7 from meat products MLG 5.05 in Micro-biology Laboratory Guidebook. Washington DC: Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service; 2010. p. 1-12.
 - Varela Hernández JJ, Cabrera Díaz E, Cardona López MA, Ibarra Velazquez LM, Rangel Villalobos H, Castillo A, Torres Vitela MR, Ramirez-Alvarez A. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. *Int J Food Microbiol.* 2007;113:237–41.