

IDENTIFICACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 EN CARNES BOVINAS QUE ABASTECEN LA CIUDAD DE QUEVEDO-ECUADOR

Joaquín T. Morán-Bajaña¹ y María Isabel Lantero-Abreu²

¹Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Agraria del Ecuador UAE. Ave. Jacobo Bucaram y Emilio Mogner, Milagro-Guayas.

²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, La Habana, Cuba.

E-mail: jmoran@uagraria.edu.ec

RESUMEN

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria patógena de interés epidemiológico para los sistemas de salud pública en los países en vías de desarrollo. Se ha vinculado el microorganismo con la carne molida. El objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de *E. coli* O157:H7 en canales bovinas que abastecen de carnes frescas a la ciudad de Quevedo-Ecuador, mediante muestras obtenidas por hisopaje a las canales y aplicación de la técnica del tamizaje (PCR MK). Destaca que el 0,42 % de las muestras fueron positivas y se ubicaron en el área dorsal de las canales. Dos casos fueron sensibles al primer MK1 y el tercero lo fue para el MK2. Las canales bovinas pueden portar la serovariedad que presenta bajos niveles de detección.

Palabras clave: *Escherichia coli*, ganado bovino, canal, técnicas de análisis, PCR.

ABSTRACT

Identification of *Escherichia coli* O157:H7 in meat bovine carcasses that provide to Quevedo City from Ecuador

Escherichia coli O157: H7 is a pathogenic bacterium of epidemiological concern for public health systems in developing countries. The microorganism has been linked to the ground beef. The objective of the present work was to identify the presence of *E. coli* O157: H7 in bovine carcasses that supply fresh meat to the city of Quevedo-Ecuador, obtained by carcass swab samples and the application of the screening technique (PCR MK). It indicates that 0.42% of the samples were positive and located in the dorsal area of the carcasses. Two cases were sensitive to MK1 and the third one was sensitive to the MK2. The bovine carcasses can carry the serovarity that presents low levels of detection.

Keywords: *Escherichia coli*, cattle, carcasses, analytical techniques, PCR.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli O157:H7 es una bacteria reconocida como patógeno causante de un cuadro de colitis hemorrágica (CH) que puede llegar a ser severo, de compromiso para la vida en niños especialmente de cero a cinco años y adultos más vulnerables (1).

El cuadro inicial con frecuencia evoluciona hacia estados clínicos complicados como cuadros neurológicos y el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) que pueden dejar importantes secuelas (2). Se ha vinculado el microorganismo con la carne molida, cuya forma principal de consumo son las hamburguesas. Su característica principal es la producción de toxinas y otros factores de virulencia (3).

***Joaquín Teodoro Morán Bajaña:** Docente e investigador de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Agraria del Ecuador. Es Ingeniero Zootecnista (Universidad Técnica Estatal de Quevedo-Ecuador, 1997), con estudios en Producción Animal (Universidad de Granma-Cuba, 1997). Diplomado en Mercadotecnia y Ventas (Universidad Técnica Estatal de Quevedo, 2001) y Maestro en Ciencias en Procesamiento de Alimentos (Universidad Agraria del Ecuador, 2014), actualmente candidato a Doctor en Ciencias de los Alimentos por el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana-Cuba. Ejerce la docencia y la investigación en la Universidad Agraria del Ecuador en Milagro-Guayas. Ha sido considerado como evaluador externo de programas carrera del Consejo de Educación Superior del Ecuador. Es becario de la Secretaría Nacional de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación SENESCYT.

Este patógeno se considera en general subreportado debido a factores de diferente naturaleza pero que incluyen la necesaria especificidad que aportan los métodos más modernos de identificación de especies y serotipos bacterianos (4).

La incidencia de este patógeno por lo tanto constituye un aspecto de interés epidemiológico y un desafío para los sistemas de salud pública fundamentalmente en los países en vías de desarrollo debido a las deficientes condiciones higiénicas que prevalecen en la industria. Sólo en Argentina se reportan 13,9 personas enfermas por cada 100 000 habitantes (5).

Desde que tuvo lugar el primer brote causado por esta bacteria, en Oregón, EE.UU., en 1982 (6) se vinculó el microorganismo con la carne bovina y en especial, la carne molida, cuya forma principal de consumo son las hamburguesas.

Diversos estudios ubican a los bovinos como reservorio natural de esta enterobacteria que produce toxinas relacionadas con otros factores de virulencia que la convierten en un peligro latente para la salud de los consumidores. Los bovinos, por su condición de reservorios naturales y por faenarse en los mataderos bajo condiciones de salubridad cuestionables, constituyen la fuente de contaminación de las carnes y refrenda con ello el rol que estas juegan en la prevalencia y epidemiología de la enfermedad (7).

La carne de res es parte importante de la dieta diaria de los ecuatorianos. Se sacrifican anualmente aproximadamente 1 700 000 cabezas de ganado bovino que rinden 220 000 t de carne para el consumo nacional (8).

El objetivo del presente trabajo fue identificar la presencia de *E. coli* O157:H7 en canales bovinas que abastecen de carnes frescas a la ciudad de Quevedo, mediante muestras obtenidas por hisopaje y aplicación de la técnica del tamizaje (PCR MK).

MATERIALES Y MÉTODOS

El pesquisaje se realizó en el municipio de Quevedo, ciudad de mayor crecimiento comercial e industrial de la provincia de Los Ríos y novena en importancia en Ecuador.

En el camal municipal se faenan diariamente entre 30 y 50 animales, provenientes de las localidades Guasaganda-Cotopaxi (G2); Santo Domingo de los Tsáchilas (SD1) de la provincia homónima y de fincas ganaderas de alrededor de Quevedo, particularmente Balzar-Pichincha (BP3). Los animales pertenecen a razas mestizas Holstein, Brown Swiss, Gyr y Brahman; con una edad promedio de 2,5 años y un peso entre 260 y 350 kg.

Se consideraron para el aislamiento, las dos medias canales (derecha e izquierda), divididas imaginariamente en seis áreas cada una, que identifican zonas ventrales y dorsales.

La toma de muestras tuvo lugar en la época invernal del año 2015, se realizó de manera aleatoria simple y consistió en aplicar el procedimiento del hisopaje en un total de 711 áreas pertenecientes a ambas medias canales (izquierda, i y derecha, d) en las zonas ventrales (V) y dorsales (D), provenientes de 237 animales sacrificados.

Utilizando un hisopo estéril se frotaron las áreas musculares tomadas al azar, tres por animal faenado, e introducidos en tubos de ensayo con tapa rosca conteniendo 15 mL de caldo ECnov (Acumedia, EE.UU.) modificado con novobiocina. Se procedió a incubar a 37,5 °C por 24 h.

Del material incubado se extrajo una alícuota de 1 mL y se centrifugó (Labnet, EE.UU.) a 8 000 min⁻¹ por 15 min. El pellet obtenido fue mezclado con 150 µL de agua destilada estéril y calentado a 100 ± 2 °C por 15 min. Con el objetivo de comprobar la presencia de cepas productoras de las toxinas de interés, se aplicó la reacción en cadena de la polimerasa conocida como PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), aplicando el protocolo para el PCR MK utilizando los primers MK1 y MK2 que contienen secuencias de los genes que codifican para dichas toxinas. Se utilizó el protocolo recomendado por la OPS (1), el cual consiste en la aplicación de un proceso de termociclado que utiliza temperaturas de 94, 53,72 y 4 °C y se desarrolla en 29 ciclos.

La visualización de los pares de bases que codifican para las toxinas se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % (Invitrogen, EE.UU.) en tampón

TAE 1X al que se le añadió bromuro de etidio (0,4 µL) para observar las muestras aplicando 80 v/ 40 min. Se empleó azul bromofenol (0,4 µL) para colorear cada amplicón obtenido (1).

Los reactivos e insumos (Invitrogen, EE.UU.) para el termociclado (Labnet, EE.UU.) fueron: Buffer TAE (5 µL), dNTP (2 µL), MgCl₂ (1,5 µL), los *primers* MK1 y MK2 (0,5 µL) cada uno y la Taq polimerasa a razón de 0,2 µL, 2 µL de templado y 36,3 µL de agua estéril libre de endonucleasas para un volumen final de 50 µL (1, 9).

Las muestras que resultaron positivas para las toxinas mediante el PCR MK fueron incubadas en agar EMBnov a 37,5 °C por 24 h. Se observaron los cambios de coloración de las cepas y se procedió a realizar las pruebas bioquímicas mediante el kit API 20E (10).

Los controles positivo y negativo fueron las cepas *E. coli* O157:H7 y la ATCC 22925 respectivamente y facilitadas por el Instituto Nacional de Salud Pública e Investigación del Ecuador, INSPI. Las muestras se analizaron en el laboratorio de biología molecular de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

Los resultados finales se expresan en lo fundamental, como cantidad (%) de resultados positivos a *E. coli* O157:H7 en relación al total de las áreas muestreadas (9, 13)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La aplicación de los procedimientos anteriores permitió demostrar la presencia de cepas positivas a la producción de toxinas en tres de las áreas muestreadas. Las muestras positivas se encontraron en ambas medias canales (izquierda, i y derecha, d) en las zonas ventrales (V) y dorsales (D).

Se detectó un caso por cada una de las áreas DdM, DiS, DdS pertenecientes a tres animales diferentes provenientes de dos zonas geográficas en particular. Destaca que las muestras positivas han sido identificadas en el área dorsal de las canales. Esto habla a favor de una mayor probabilidad de contaminación relacionada con las partes externas del animal, pelo y cuero, las cuales resultan con alto grado de suciedad que incluye restos de material fecal. Es probable que la evisceración de los animales la realice personal de experiencia cuya pericia conlleva una menor contaminación en zonas

ventrales. Estos resultados se obtuvieron en una época de invierno y en el Ecuador las épocas invernales han estado marcadas por las constantes inundaciones y desbordamiento de los ríos. Es conocido que *E. coli* al igual que muchos microorganismos puede ser transportada por las fuentes hídricas que pudieran ser el medio por el cual llega a través de su contacto con los pastizales, fuente principal de alimento de los animales.

Se ha indicado la prevalencia de *E. coli* STEC en espacios acuáticos y fuentes pluviales que han tenido contacto con heces fecales de bovinos (11, 12).

La aplicación del PCR MK ha permitido en diversos casos la identificación de microorganismos en alimentos y en especial en carnes y productos cárnicos (10). En muestreos realizados a las canales bovinas en mataderos en México, mediante hisopaje como método de recolección de células bacterianas, se ha detectado *Salmonella spp.*, *E. coli* STEC, *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos, cuya presencia ha impulsado la implementación de medidas sanitarias y de control de inocuidad (14).

Se ha reportado que empleando una técnica similar de hisopaje pero en el área pectoral de 120 canales de res provenientes de dos mataderos mexicanos, uno municipal y otro Tipo Inspección Federal para comprobar la ausencia de microorganismos patógenos en las carnes que se exportan hacia EE.UU., en el tamizaje no se detectó *E. coli*, pero sí *Salmonella spp* en dos muestras del matadero municipal (16).

El PCR y la electroforesis revelaron que dos casos fueron sensibles al primer MK1 y por lo tanto para la toxina Stx1a/b mientras que el tercero lo fue para el MK2 y por consiguiente para la toxina Stx2a/b.

Esta técnica de detección ha permitido identificar cepas patógenas por amplificación de los fragmentos de los genes que codifican para las toxinas indicadas (16, 17).

Se han encontrado cepas de *E. coli* en canales bovinas portadoras de las toxinas Stx1 pero algunos autores han expresado una mayor presencia de Stx2, inclusive de otros factores de virulencia (7).

Las cepas de *E. coli* O157:H7 no siempre pueden contener los genes que codifican para la síntesis de las toxinas y se pueden encontrar en canales porcinos además

de las bovinas pero es en estos últimos a las que se asocia con frecuencia por su particularidad de ser su reservorio natural, no obstante se ha detectado en otras especies de cápridos, óvidos, equinos, canes y aves (1, 7).

Se ha detallado la vinculación del patógeno y su traslado desde las canales, las carnes y piezas cárnicas hasta los consumidores (18).

Los mataderos de los países en desarrollo presentan en su mayoría deficiencias en cuanto a la implementación de medidas sanitarias y modelos de gestión de inocuidad y Ecuador no es la excepción, se ha manifestado la ausencia de prácticas higiénicas en algunos de esos puntos de faenamiento (19). De acuerdo a estudios anteriores (20) se ha calculado que por cada animal identificado como positivo para *E. coli* STEC se contaminan 0,5 canales adicionales por efecto de la contaminación cruzada.

Las tres muestras positivas representaron apenas el 0,42 % del total de áreas hisopadas (711) lo que señala que la prevalencia es baja aunque no por eso menos importante.

La incidencia encontrada de *E. coli* toxigénica en las canales, puede en términos abstractos, considerarse baja, sin embargo, queda la posibilidad real de incremento posterior de la presencia del microorganismo favorecido por la contaminación cruzada y por el aumento de la superficie de contacto al picarse y molinarse las carnes.

REFERENCIAS

1. Rivas, M.; Chinen, I. y Leotta, A.G. *Manual de procedimientos diagnóstico y caracterización de Escherichia coli O157 productor de toxina shiga a partir de alimentos*. Buenos Aires, Organización Panamericana de la Salud, 2008.
2. Chamorro, L.A. Órgano Oficial de la Sociedad Paraguaya de Pediatría 36(2):131-137, 2009. http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/sindrome-uremico-hemolitico-coli-entero-hemorragica-0157-h7-stx2-primer/id/59304382.html
3. Jiménez, E.M.; Chaidez, Q.C.; León, F.J. Rev. Vet. Méx. 43(4):273-284, 2012.
4. Stanford, K.; Stephens, P.T. y McAllister, T.A. J. Anim. Sci. 89(1):237-244, 2011.
5. Signorini, L.M. y Frizzo, S.L. Rev. Arg. Microbiol. 41(4):1-11, 2009.
6. Paton, J.C. y Paton, A.W. Clin. Microbiol. Rev. 11(3):450-458, 1998.
7. Gallegos, M.; Morales, A.; Álvarez, G.; Vásquez, J.; Morales, L.; Martínez, I. y Maldonado, J. Rev. Cient. Ven. LUZ XIX(2):139-146, 2009.
8. Mestanza, J.C. y Velasco, B. *La Costa produce el 70% de la carne de res* [en línea]. Consultado 20 mayo 2015 en <http://www.elcomercio.com/actualidad/costa-produccion-carnederes-ganado-consumo.html>.
9. Leotta, G.A.; Chinen, I.; Epszteyn, S.; Miliwebsky, E.; Melamed, I.C.; Motter, M.; Ferrer, M.; Marey, E. y Rivas, M. Rev. Arg. Microbiol. 37(1):1-12, 2005.
10. Biomériux. *Api 20E Sistema de Identificación para Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-Negativos*. No. 20100. Biomériux S. A. (de.) Francia, 24 p., 1989.

El hallazgo de las toxinas en las muestras analizadas coincide con las referencias que señalan la peligrosidad de la serovariedad y su articulación como agente causal del síndrome urémico hemolítico y colitis hemorrágica en poblaciones inmunocomprometidas pero sobre todo en niños menores de siete años y ancianos (20). Las cepas aisladas presentaron frente a API, un comportamiento bioquímico coincidente con lo reportado para esta especie.

De este modo, la elevada peligrosidad de este patógeno, asociado a las consecuencias sobre la salud humana, constituye un llamado a progresar en la aplicación de sistemas de gestión de inocuidad y medidas de control durante el faenamiento, que garanticen a la población un producto cárnico seguro.

CONCLUSIONES

La técnica del PCR es precisa y rápida para localizar al patógeno mediante la identificación de sus toxinas. Las muestras positivas a la producción de toxinas se presentaron en la zona dorsal de las canales muestreadas. El PCR y la electroforesis revelaron que dos casos fueron sensibles a las toxinas de la familia Stx1a/b mientras que el tercero lo fue para la toxina Stx2a/b. Las canales bovinas pueden portar *E. coli* O157:H7, aunque su nivel de detección puede ser bajo.

11. Guillén, O.A.; Rojas, L.R. y Guerrero, B.C. *Rev. Cátedra Villarreal* 1(1):35-45, 2013.
12. Tanaro, J. D.; Leotta, G.A.; Lound, L.H.; Deza, N.; Ledri, S.E.; Carbonari, C. y Rivas, M. *Ciencia, Docencia y Tecnología* 3(3):1-17, 2013.
13. Jiménez, E.M.; Chaidez, Q.C. y León F.J. *Rev. Vet. Méx.* 43(4):273-284, 2012.
14. Bonivento, C.J.C.; Molina, C.A.; Maestre, S.R. y García, C.A. *Biocencias* 6(2):53-61, 2011.
15. García, L.E.; Rubio, L.M.S.; Alonso, M.R.A.; Gayosso, V.A.; Miranda, C.S.P.; Nicoti, T.M. y Núñez, E.J.F. *Cyta-J. Food* 7(1):31-36, 2009.
16. Galli, L.; Leotta, G.; Rivas, M. y Gugliada, M.J. *Rev. Arg. Microbiol.* 40(1):9-12, 2008.
17. Tanaro, J.D.; Galli, L.; Lound, L.H.; Leotta, G.A.; Piaggio, M.C.; Carbonari, C.C.; Kinue I. y Rivas, M. *Rev. Foodborne Pathogens and Disease* 9(10):878-884, 2012.
18. Méndez, C.R.; Vergaray, G.; Morante, H.Y.; Flores, P.R. y Gamboa R.A. *Rev. Peruana Biol. Fac. Cienc. Biol.* 20(2):159-164, 2013.
19. Delgado, H.; Cedeño, C.; Montes de Oca, N. y Villoch, A. *Rev. Salud Animal* 37(1):1-9, 2015.
20. Signorini, M.L. *Rev. Ciencias Vet.* 2(1):12-19, 2008.