

**ESTUDIO DE PREVALENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROHEMORRÁGICA
EN CANALES DE VACUNO Y CERDO FAENADAS
EN LA REGIÓN METROPOLITANA, CHILE**

**PREVALENCE STUDY OF ENTEROHEMORRAGIC *ESCHERICHIA COLI*
IN BOVINE AND SWINE CARCASSES SLAUGHTERED
IN THE REGION METROPOLITANA, CHILE**

MARISOL BURGOS²; M. CRISTINA MARTÍNEZ¹; BERNARDITA BARRÍA¹; MARCO PÉREZ²; MARCELO ULLOA²;
ALEJANDRA VAQUERO²; GERMÁN AYALA²; JULIO OJEDA²; DAVID FUENTES²; HUGO SCHENONE².

ABSTRACT

The purpose was to determine Enterohemorrhagic E.coli in carcasses inside Metropolitan Region of Chile. Sampling was done between April 2000–Dic 2001 in all slaughterhouses, the number of samples was determined by Vetstat Statistic Program, 3% error and 5% significance, 250 g of meat was taken just after been slaughtered. Suspicious colonies were confirmed using biochemical tests for E. coli and confirmed ones were run by PCR. Citotoxin identification were done using specific primers for 348 bp and 581 bp regions for stxI and stxII genes. 406 samples were analyzed, 226 (56%) cattle and 180 (44%) pork. StxII gen presence were detected in two beef samples out of 226 (0.89%). ECEH prevalence in beef meat is occasional on the other hand the microorganism was not detected in pork, this could be due to the slaughtering good practices and properly handling of carcasses that has been implemented on slaughterhouses, as well as permanent sanitary surveillance on this establishments by SESMA. (Environmental Health Service of Metropolitan Region).

KEY WORDS: ECEH, swine carcass, bovine carcass.

PALABRAS CLAVE: ECEH, canales de cerdo, canales de vacuno.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados con microorganismos patógenos constituyen la mayor causa de morbimortalidad en el mundo, uno de ellos es *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH), y es considerado como uno de los mayores problemas de salud pú-

blica a nivel mundial. Ésta corresponde a una de las seis categorías de *E. Coli* diarreogénicas y es catalogada como un patógeno emergente. Los primeros brotes de intoxicación alimentaria se describen en el año 1982 en los estados de Oregon y Michigan, EE.UU. (Riley *et al.*, 1983), y estuvo asociado al consumo de hamburguesas en diferentes locales de una cadena de comida rápida. A partir de entonces, se han descrito numerosos brotes de ETA causadas por este patógeno en distintas partes del mundo (EE.UU., Italia, Alemania, Australia, Japón, Suecia, Gran Bretaña y Chile).

Los cuadros clínicos producidos por ECEH van desde una infección asintomática, a una diarrea moderada, colitis hemorrágica severa, síndrome hemolítico urémico (SHU), púrpura trombocitopénica y muerte (Dorn *et al.*, 1984). El SHU se pro-

¹Laboratorio de Salud Ambiental, Servicio de Salud del Ambiente de la Región Metropolitana.

²Subdepartamento Calidad de los Alimentos, Servicio de Salud del Ambiente de la Región Metropolitana.

E mail: mburgos@sesma.cl; cmartinez@sesma.cl

Dirección: San Diego 630 piso 8, Santiago. Fax: 3992783.

duce aproximadamente en un 2 a 7% de los pacientes con colitis hemorrágica, principalmente en niños y ancianos (Prado y O'Ryan, 1994; Vizcaya *et al.*, 1996). A pesar de tener una tasa de mortalidad entre un 5 y 10%, un 30 a 60% sufrirán una insuficiencia renal crónica y varias anomalías del sistema nervioso central (Ammon, 1997).

La capacidad patogénica de este microorganismo reside en varios factores de virulencia, una de ellas es la producción de dos potentes citotoxinas conocidas como STX1 y STX2, que son codificadas por genes ubicados en fagos (Prado y O'Ryan, 1994). Algunas cepas producen un solo tipo de toxina y otras en cambio pueden producir ambos, hecho que no influye en el grado de virulencia de las cepas (Karmali, 1989). Estas toxinas se asociaron en un principio con el clásico serotipo O157:H7 que causó los primeros brotes descritos. Sin embargo, actualmente se describen las ECEH-no O157, que corresponden a más de 100 serotipos capaces de producir una o ambas citotoxinas (Report of a WHO scientific working groups meeting, 1998).

Los bovinos y porcinos sanos son el reservorio y principal fuente de infección en humanos (Blanco *et al.*, 1999; United States department of agriculture food safety and inspection service, 1995). Un estudio realizado en mataderos de la Región Metropolitana (RM) de Chile estableció tasas de aislamiento de ECEH, a partir de fecas de bovinos y cerdos sanos, de 28.7% y 68.3%, respectivamente (Borie *et al.*, 1997). Entre las posibles causas de contaminación de las carnes de ECEH se encuentran las malas técnicas de faenamiento de los animales tanto en los puntos de desollado como de evisceración (Blanco *et al.*, 1999).

En Chile, la faena de ganado porcino y vacuno ascendió en el año 2000 a 940.373 y 3.050.796, respectivamente; de los cuales un 45% de vacunos y 44% de porcinos se faenaron en la Región Metropolitana, repartidas en 12 plantas de faenamiento de vacuno y 6 de cerdos. De acuerdo a estudios realizados en nuestro país, en los que se analizaron carne de vacuno, de cerdo, hamburguesas y salchichón de té, se determinó que la prevalencia de ECEH en estos productos cárneos es de 4,4% (Alexandre *et al.*, 1999). Sin embargo, no se conoce la prevalencia de este microorganismo en las materias primas.

Considerando lo anterior, el objetivo del presente estudio es determinar la presencia de esta bacteria en las canales de animales de abasto (bovinos y porcinos) recién faenados en la Región Metropolitana.

MATERIAL Y MÉTODO

Obtención de las muestras

En este estudio las muestras de carne se obtuvieron de animales recién faenados, inmediatamente posterior al lavado final de la canal; el muestreo incluyó a todas las plantas faenadoras de la RM. Se tomaron 250 g de carne libre de grasa procedente de entraña (músculo diafragmático), parte interna de la pierna (músculo recto interno), pecho y cuello del animal (músculos pectorales y músculo esternohioideo). En la colección de las muestras se utilizaron cuchillos de acero inoxidable, guantes, bolsas estériles y alcohol de 70°, éstas fueron transportadas en condiciones asépticas y de refrigeración al Laboratorio de Salud Ambiental del SESMA para su posterior análisis.

Tamaño muestral

Se determinó el tamaño muestral usando la fórmula del programa estadístico Vetstat, considerando un 3% de error y una significancia de un 5%. El muestreo se realizó entre los meses de abril de 2000 y diciembre de 2001, las muestras se obtuvieron al azar, distribuidas en forma proporcional según el programa de faenamiento de cada planta. El porcentaje de muestras tomadas por cada planta se determinó de acuerdo a la faena anual del año 1999 (Tabla 1).

Preparación de la muestra y obtención de colonias aisladas

Para la obtención de colonias aisladas se pesan 11 g de carne en forma estéril, se adicionan 225 ml de agua peptonada tamponada (pH 7,2), se homogeneiza en stomacher por 1 minuto y se incuba a 35 °C por 16-18 hrs. Del preenriquecimiento se traspasa una azada a una placa de agar MacConkey, incubándose por 12-16 hrs., de manera de obtener colonias aisladas. De este reaislamiento se eligen al menos 5 colonias lactosa positiva, a las cuales se les realizan pruebas bioquímicas para *Escherichia coli*.

Detección de genes *stx1* y *stx2* de las citotoxinas STX1 y STX2

El DNA se obtuvo de las colonias lactosa positiva sospechosas de *Escherichia coli*, se homogeneizó una azada de cada colonia en 100 µl de agua desionizada estéril, de tal manera de llegar a una concentración no mayor de 10⁸ ufc/ml, luego se lisaron a 100 °C por 15 minutos. De la parte superior del lisado se tomaron 4 µl para ser utilizados en la reacción de PCR como DNA templado.

TABLA 1
CANTIDAD DE MUESTRAS TOMADAS POR PLANTA FAENADORA SEGÚN PRODUCCIÓN ANUAL

| Planta | Porcentaje de faena de vacunos (%) | Cantidad de muestras (N°) | Porcentaje de faena de cerdos (%) | Cantidad de muestras (N°) |
|--------------|------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|---------------------------|
| Faenadora 1 | 2 | 5 | | |
| Faenadora 2 | 1 | 2 | | |
| Faenadora 3 | 9 | 20 | 8 | 15 |
| Faenadora 4 | 2 | 5 | 13 | 24 |
| Faenadora 5 | 5 | 11 | | |
| Faenadora 6 | 18 | 41 | 46 | 83 |
| Faenadora 7 | 20 | 45 | 1 | 1 |
| Faenadora 8 | 4 | 9 | | |
| Faenadora 9 | 28 | 63 | 31 | 56 |
| Faenadora 10 | 6 | 14 | | |
| Faenadora 11 | 4 | 9 | | |
| Faenadora 12 | 1 | 2 | 1 | 1 |
| Total | 100 | 226 | 100 | 180 |

La amplificación de los genes de las citotoxinas *stx1* y *stx2* se realizó por PCR utilizando los partidores específicos LP30, LP31 que acotan para una región de 348 pb del gen *stx1* y los partidores LP43 y LP44 para una región de 584 pb del gen *stx2* (Cebula *et al.*, 1995), Tabla 2.

El PCR fue realizado en un volumen de 39 μ l que contenían MgCl 1,5 μ M, Buffer 1x, dNTPs 250 μ M, 1 U Taq DNA polimerasa y 256,4 μ M de cada partidor. (LP30, LP31, LP43, LP44) y 4 μ l de DNA templado. Las muestras fueron amplificadas de acuerdo al siguiente programa: denaturación inicial por 5 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos de denaturación a 94 °C por 1,5 minutos, alineamiento a 64 °C por 1,5 minutos y extensión a 72 °C por 1,5 minutos, la extensión final fue a 72 °C por 7 minutos.

La visualización de los genes se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% preparado con 5 μ l de bromuro de etidio por cada 100 ml, y corridos a 70 volts en buffer TAE 1X. Los geles fueron cargados con 8 μ l del amplificado y 3 μ l del buffer de carga, las bandas se visualizaron en un transiluminador UV. Como control positivo se utilizaron cepas de *Escherichia coli* de referencia: una productora de *stx1* (cepaC600J) y una cepa productora de *stx2* (cepaC600W).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizó un total de 406 muestras, de las cuales 226 (56%) correspondieron a carne de vacuno y 180 (44%) a carne de cerdo. Se aislaron 248 y 70

TABLA 2
PARTIDORES USADOS PARA PCR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS ESPECÍFICOS DE LOS GENES *STX1* Y *STX2*

| Gen | Tamaño del producto (pb) | Partidores | Secuencia |
|-------------|--------------------------|------------|------------------------------|
| <i>Stx1</i> | 348 | LP30 | 5'-CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG-3' |
| | | LP31 | 5'-CACCAGACAATGTAACCGCTG-3' |
| <i>Stx2</i> | 584 | LP43 | 5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3' |
| | | LP44 | 5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3' |

cepas sospechosas de *Escherichia coli* en muestras de vacuno y cerdo, respectivamente, a las que se les realizó la detección de los genes de las citotoxinas *stx1* y *stx2*.

Del total de muestras estudiadas, solamente se detectó el gen de la citotoxina *stx2* en dos cepas, que corresponden a dos muestras de carne de vacuno que provienen de la misma planta faenadora (2 de 226), lo que representa una prevalencia de 0,89%. En la Figura 1 se observa el gel de electroforesis con las bandas de los genes de la citotoxina *stx2* de las muestras positivas. En ninguna de las muestras de carne de cerdo analizadas se detectaron los genes de las citotoxinas (0 de 180). Las cepas positivas de *Escherichia coli* Enterohemorrágica fueron enviadas al Laboratorio de referencia de Bacteriología del Instituto de Salud Pública para su estudio, los resultados indicaron que fue no tipificable.

A través de la vigilancia sanitaria que realiza el Subdepto. Calidad de los Alimentos y el Laboratorio del Ambiente, se ha detectado la presencia de ECEH en muestras de hamburguesas crudas, queso de cabra, carne de pollo crudo y productos cárnicos en general (4,3%) (Alexandre *et al.*, 1999). Los serotipos encontrados corresponden a O113, O111, O6, siendo la gran mayoría de las cepas no tipificables. En Chile se ha descrito un brote ocurrido el año 2000 por ECEH serotipo O157:H7, que estuvo asociado al consumo de carne molida en un jardín infantil (Prado *et al.*, 2002), considerando que en nuestro país existe una subnotificación de las intoxicaciones por alimentos.

Los únicos datos registrados en cuanto al reservorio de este patógeno en nuestro país fueron realizados en intestino de vacunos y cerdos. Se detectó la presencia de ECEH en el 28,7% de los bovinos y en el 68,3% de los cerdos (Borie *et al.*, 1997). Estos datos indican una gran prevalencia de este microorganismo, por lo que el proceso de faena de estos animales debe ser riguroso en medidas sanitarias para evitar la contaminación de la carne que será distribuida al consumo. La presencia de ECEH en las carnes se debe principalmente a deficiencias en el sistema de faena, que se producen por descargas de material fecal sobre las canales o por contaminación con los cueros del animal y/o por una desinfección posterior deficiente.

Los resultados obtenidos en este estudio indican un bajo porcentaje de muestras con presencia de ECEH en carnes de vacuno (0,89%) y ninguna muestra positiva en carnes de cerdo, consideran-

do que se tomaron muestras en todas las plantas faenadoras de la Región Metropolitana. Las muestras positivas se detectaron solamente en la planta Faenadora 9 (2 de 63 muestras), en ésta se benefician aproximadamente 8.700 cabezas de vacuno al mes y corresponde a la planta faenadora de mayor porcentaje de faena de vacuno en la Región Metropolitana. Una razón para esta baja prevalencia podría deberse a la inspección veterinaria realizada por médicos veterinarios del SESMA, a partir del año 1998, en todos los mataderos de la Región Metropolitana. Esto significa que en todas las plantas faenadoras de la Región Metropolitana se realiza una inspección oficial con una dotación de médicos veterinarios en cada línea de la faena, de acuerdo a los niveles de producción y a las características particulares de los puntos de inspección en cada establecimiento.

El control en las plantas faenadoras comprende de la inspección médico-veterinaria del faenamien- to de las reses de abasto y sus carnes, con especial énfasis en la higiene de los procesos y la verificación del cumplimiento de la normativa vigente con relación a: uso de esterilizadores, uso alternado de cuchillos entre animales faenados, ligadura obligatoria de aparato digestivo (recto y esófago) para evitar descarga de material fecal a las carnes, sanitización y/o expurgo de las carnes contaminadas, y respeto del periodo de reposo previo a la faena. Este control cobra aún más importancia al

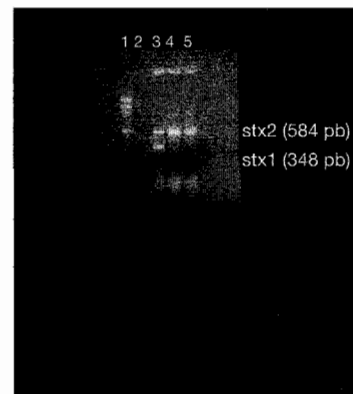


Figura 1.

Gel electroforesis de amplificación por PCR de genes *stx1* y *stx2*:

- Carriles: 1) Marcador de peso molecular (100pb).
 2) Control negativo.
 3) Control positivo *stx1* y *stx2*.
 4) Muestra carcasa vacuno 6174.
 5) Muestra carcasa vacuno 6179.

abrirse los mercados internacionales a los productos cárnicos de nuestro país.

La ausencia de hallazgo de ECEH en carne de cerdo podría explicarse debido a que la faena en la Región Metropolitana se concentra principalmente en plantas que realizan los procesos con estándares de exportación, lo que implica un mayor cuidado en la faena y una mayor vigilancia en los plantales, los que en su gran mayoría son crianzas intensivas con cercos sanitarios muy exigentes.

Debido a que la presencia de ECEH es endémica en el ganado vacuno y porcino, existe el riesgo de contaminación de la carne para consumo, incluyendo el factor de una manipulación deficiente que podría derivar en una contaminación cruzada. Por estas razones es importante advertir a los consumidores respecto a los riesgos involucrados en el consumo de carne cruda o con insuficiente cocción, destacando siempre que la carne debe consumirse bien cocida. Por último, podemos decir que uno de los beneficios del control riguroso de las plantas de faenamiento de animales de abasto ha sido disminuir el riesgo de contaminación de las carnes de consumo y, por lo tanto, prevenir en cierta forma las intoxicaciones alimentarias con éste y otros patógenos en la población de la Región Metropolitana.

BIBLIOGRAFÍA

- RILEY, L.W., R. S. REMIS, S. D. HELGERSON, H. B. MC GEE, J. G. WELLS, B. R. DAVIS. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. 1983. N. Engl J. Med. 308: 681-685.
- ALEXANDRE, M., C.G. PIÑONES, C. MARTÍNEZ, V. VÁSQUEZ, D. FUENTES. Detección de citotoxinas de *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos chilenos e importados. Rev. Chil. Infect.; 16(4): 277-282,1999.
- DORN, C.R., SCOTLAND, S.M., SMITH, H.R., WILLSHAW, G.A., ROWE, B. Properties of Vero cytotoxin producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serotypes other than O157:H7. Epidemiol. Infect. 1984; 103: 83-95.
- PRADO V, O'RYAN M. Acute gastroenteritis in Latin America. Infect Dis Clin North Amer 1994; 8: 77-106.

- VIZCAYA, M., C. SANDOVAL, M. SALIN, V. PRADO. 1996. Impacto del síndrome hemolítico urémico en las distintas áreas de salud de la Región Metropolitana. Rev. Chil. Infect. 13: 223-230.
- AMMON, A. Vigilancia de infecciones por *E. coli* enterohemorrágico (ECEH) y del síndrome hemolítico urémico (SHU) en Europa. Eurosintesis vol. 2 N° 12. 1997.
- KARMALI M.A. 1989 Infection by verocytotoxin- producing *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 2: 15-38.
- REPORT OF A WHO SCIENTIFIC WORKING GROUPS MEETING. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin- Producing *Escherichia coli* (STEC). Berlin, Germany, 23-26, June 1998.
- BLANCO, M., BLANCO, A. MORA, M. P. ALONSO, E. GONZÁLEZ, J. BLANCO. 1999. *Escherichia coli* verotoxigenicos (ECVT) en España ECVT 0157:H7 y no O-157 en humanos y alimentos del ganado bovino y ovino como reservorio, técnicas para la detección de ECVT.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE. *Escherichia coli* O157:H7 at a glance. 1995.
- BORIE, C. Z. MONREAL, P. GUERRERO, M.L. SÁNCHEZ, J. MARTÍNEZ, C. ARELLANO, V. PRADO. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovino y cerdos sanos faenados es Santiago, Chile. 1997 Arch. Med. Vet 29: 205-212.
- CEBULA TA, PYNE WL, FENG P. Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J. Clin. Microbiol, 1995; 33(1): 248-250.
- PRADO V. SOLARI,V., ALVEREZ I., ARELLANO C., VIDAL R., CARREÑO M., MAMANI N., FUENTES D., O'RYAN M., MUÑOZ V. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile. Periodo 1999-2000, Rev. Med. Chile 2002; 130: 495-501.

Agradecimientos:

Dra. Carmen Peñeipil, Dra. Lorena Muñoz, Dr. Alejandro Morales, Dr. Oscar Ibáñez, Dr. Gustavo Iglesias, Dra. Ximena Palominos, y Dr. Alejandro Rodríguez. Subdepto. Calidad de los Alimentos-Mataderos.

Mauricio Fuenzalida, Marcela Medina y Chyntia Rojas. Laboratorio de Salud Ambiental, SESMA.