



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS**  
**ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE  
TOXINA SHIGA AISLADA DESDE CARNE MOLIDA EN LA  
CIUDAD DE SANTIAGO DE CHILE**

**Daniel Jesús Rivera Rojas**

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva Animal

**MAGALY TORO IBACETA**

Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 11150491

SANTIAGO, CHILE  
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE  
TOXINA SHIGA AISLADA DESDE CARNE MOLIDA EN LA  
CIUDAD DE SANTIAGO DE CHILE**

**Daniel Jesús Rivera Rojas**

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Medicina Preventiva Animal

MAGALY TORO IBACETA  
Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA), Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 11150491

NOTA FINAL: \_\_\_\_\_

FIRMA

PROFESOR GUIA: MAGALY TORO I.

\_\_\_\_\_

PROFESOR CORRECTOR 1: PATRICIO RETAMAL

\_\_\_\_\_

PROFESOR CORRECTOR 2: LISETTE LAPIERRE

\_\_\_\_\_

SANTIAGO, CHILE  
2018

## **AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA**

Dedico esta memoria de título a mi tata, Luis Rojas, del cual aprendí cosas que no enseñan en ninguna sala de clases, ni en ninguna universidad. Gracias por tu apoyo constante, tu ayuda y entrega. Sin duda el estar aquí este día es en parte gracias a ti. Gracias por incitarme a seguir mis sueños y no bajar los brazos frente a las adversidades, hoy no estás físicamente conmigo, pero donde estés, esto es para ti.

Agradezco a mi profesor guía, Magaly Toro, por su paciencia y ayuda en estos 2 años. La rigurosidad y los consejos entregados ayudaron a mi formación profesional integral como Médico Veterinario.

A las personas del INTA, cuyos consejos, ayuda y trabajo en equipo permitieron que este proceso fuera ameno y grato.

A la gente del Centro de Salud Veterinario El Roble, quienes me guiaron a encontrar mi vocación, formaron como un profesional y apoyaron durante los últimos años de la carrera.

A los amigos que estuvieron ahí desde siempre, acompañándome y empujando cuando las cosas eran difíciles.

Y a mi familia, quienes siempre creyeron en mí. Gracias por permitirme seguir este camino y cumplir mis sueños. Por cada consejo o palabra de aliento, este largo camino hubiese sido mucho más complejo de no ser por ustedes.

## RESUMEN

*Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) es un patógeno emergente que puede provocar casos esporádicos y brotes de diarreas con y sin sangre, colitis hemorrágica y/o síndrome hemolítico urémico en humanos, especialmente niños y ancianos. La bacteria es transmitida por alimentos, principalmente a través de productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos.

El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de STEC en carne molida de vacuno obtenida en diferentes áreas del Gran Santiago y caracterizar los aislados obtenidos. Se recolectaron 430 muestras de carne molida de vacuno desde carnicerías y supermercados de la ciudad entre los meses de Marzo del 2016 a Enero de 2017, dividiendo en 4 zonas geográficas a la ciudad. Las muestras fueron sometidas a un tamizaje a través de PCR para los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> y desde las muestras positivas se aislaron colonias sospechosas a *E. coli*. La confirmación de los aislados se realizó mediante PCR para los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub> y pruebas bioquímicas para *E. coli*, además de un PCR para *E. coli*. Los aislados se caracterizaron para la presencia de los factores de virulencia de la intimina (*eae*) y hemolisina (*hlyA*), junto a la determinación de serotipos O157 y Big Six (O26, O45, O103, O111, O121, O145).

Un 9,3% (40/430) de las muestras resultaron positivas a STEC; 10,2% provenientes (22/215) de carnicerías y 8,4% (18/215) de supermercados. No se detectaron diferencias significativas entre las prevalencias de cada área de la ciudad. Desde las 40 muestras positivas se recuperaron 47 aislados de STEC, de las cuales 12,8% (6/47) contenía el gen *stx*<sub>1</sub>, 74,5% (35/47) *stx*<sub>2</sub> y 12,8% (6/47) tenía ambos genes de virulencia. Ninguna de los aislados contenía el gen de la intimina (*eae*), y un 40% fue positivo al factor de virulencia *hlyA*. Ninguno de los aislados fue de los serogrupos de STEC O157 o “Big Six”.

En conclusión, la carne molida ofrecida en Santiago es un vector de STEC, sin embargo, se requieren más estudios para determinar el potencial patogénico de las cepas y el riesgo que representa la carne molida para la población.

**Palabras claves:** STEC; Carne molida; carnicería; supermercado; *stx*; no-O157

## **ABSTRACT**

Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) is an emerging pathogen that can cause sporadic cases and outbreaks of diarrhea, hemorrhagic colitis and / or hemolytic uremic syndrome in humans, especially children and the elderly. The bacterium is transmitted by food, especially through raw or undercooked meat products.

The objective of the study was to determine the prevalence of STEC in ground beef obtained in the city of Santiago, Chile, and to characterize the isolates. We collected 430 ground beef samples from butcher shops and supermarkets across Santiago, from March 2016 to January 2017. The samples were screened through a PCR for the genes *stx<sub>1</sub>* and *stx<sub>2</sub>*, and presumptive *E. coli* colonies were isolated from each positive sample. STEC confirmation was carried out by PCR for the *stx<sub>1</sub>* and *stx<sub>2</sub>* genes and biochemical tests for *E. coli*. All the isolates were characterized for the presence of the virulence factors intimin (*eae*) and hemolysin (*hlyA*) and tested for the presence of serotypes O157 and Big Six (O26, O45, O103, O111, O121, O145).

From the ground beef samples, 9.3% (40/430) were positive to STEC: 10.2% (22/215) were from butcher shops and 8.4% (18/215) from supermarkets. No significant differences were detected among the prevalence of each area. From the 40 positive samples, 47 STEC isolates were recovered. Among the isolates, *stx<sub>1</sub>* gene was present in 12.8%, 74.5% carried *stx<sub>2</sub>*, and 12.8% had both virulence genes. None of the isolates contained the intimin (*eae*) gene, and 40% were positive for the *hlyA* virulence factor. None belonged to the serogroups STEC O157 or Big Six.

In conclusion, ground meat sold in Santiago, Chile carries STEC; however, more studies are required to determine the pathogenic potential of the strains and the risk that ground beef represents for the population.

**Keywords:** STEC; Ground beef; Butcher shop; Supermarket, *stx*; non-O157

## INDICE DE CAPITULOS

Introducción.	1
Revisión bibliográfica.	2
Generalidades de <i>Escherichia coli</i> y STEC.	2
ETA y STEC en productos cárnicos.	4
STEC en el mundo.	5
STEC en Chile.	6
Objetivo.	8
Objetivo General.	8
Objetivo Específico.	8
Materiales y Métodos.	9
Objetivo 1: Determinar la prevalencia de STEC en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.	9
Tamaño y obtención de muestras.	9
Procesamiento de las muestras.	10
Tamizaje.	11
Electroforesis.	11
Aislamiento STEC.	12
Pruebas Bioquímicas.	12
Prueba de PCR para <i>E. coli</i> .	13
Objetivo 2: Determinar la presencia de los serogrupos O157 y “Big Six” en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.	13

Objetivo 3: Caracterizar genotípicamente los aislados de STEC identificados en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago, mediante la determinación de la presencia de los genes de virulencia <i>eae</i> y <i>hlyA</i> .	15
Confirmación de presencia de factores de virulencia.	15
Controles positivos.	16
Análisis de Datos.	16
Resultados.	17
Objetivo específico N°1: Determinar la prevalencia de STEC en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.	17
Objetivo Especifico N°2: Determinar la presencia de los serogrupos O157 y “Big Six” en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.	18
Objetivo Especifico N°3: Caracterizar genotípicamente los aislados de STEC identificados en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago, mediante la determinación de la presencia de los genes de virulencia <i>eae</i> y <i>hlyA</i> .	18
Discusión.	20
Conclusión.	24
Bibliografía.	25

## INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Número de muestras de carne molida por zona geográfica y tipo de comercio.	9
Tabla N° 2: Distribución de comunas por zonas del Gran Santiago para el estudio.	10
Tabla N°3: Secuencia partidores <i>E. coli</i> y genes <i>stx<sub>1</sub></i> y <i>stx<sub>2</sub></i> .	12
Tabla N°4: Secuencia partidores serogrupos Big Six y O157.	14
Tabla N°5: Secuencia partidores para los factores de virulencia <i>eae</i> y <i>hlyA</i> .	15
Tabla N°6: Perfiles de genes de virulencia de cepas aisladas desde muestras de carne molida obtenidas en el Gran Santiago.	19



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Prevalencia de STEC en muestras de carne obtenidas de distintas zonas del gran Santiago.	17
Figura 2. Presencia de los genes <i>stx</i> de las cepas aisladas desde muestras de carne molida obtenidas en el Gran Santiago.	19

## INTRODUCCIÓN

Las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETA) representan una de las principales causas de cuadros gastrointestinales en nuestro país. Con los procesos de globalización, el creciente comercio internacional y los nuevos estilos de vida aumentan los hábitos culinarios y tipos de alimentación de la población. Bajo este contexto, y frente a un interés creciente por mejorar la inocuidad alimentaria, es que cobran relevancia los patógenos emergentes transmitidos por los alimentos, los que representan un riesgo para los consumidores nacionales e internacionales.

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria comensal que forma parte de la microbiota del intestino de humanos y animales. La mayoría de las *E. coli* son inocuas para la población humana. Sin embargo, existen grupos que pueden causar enfermedades, tales como las *E. coli* diarreogénicas. Entre ellas, las denominadas *E. coli* productoras de Shiga Toxina (STEC) son capaces de ocasionar cuadros clínicos de importancia en la población, especialmente niños y ancianos, en los cuales puede generar daño renal o incluso causar la muerte.

La carne de bovino constituye uno de los principales vehículos de transmisión STEC, y uno de los subproductos cárnicos más consumido es la carne molida. Este producto se vende bajo diversas presentaciones comerciales dentro del país y podría representar un riesgo para la población nacional debido al proceso de producción. Por ejemplo, la carne de vacuno se puede contaminar con heces de vacunos durante algunos de los procesos de la faena, y distintos estudios, tanto nacionales como internacionales, han detectado la presencia de STEC en las heces de bovinos.

En Chile se desconoce el nivel de contaminación de diversos alimentos con STEC, y existen escasos estudios en el tema. El presente estudio tiene como objetivo determinar la prevalencia de STEC en carne molida de bovino, en la ciudad de Santiago y caracterizar los aislados obtenidos con el fin de generar información relevante que pueda ser un aporte a la inocuidad alimentaria en nuestro país y establecer una base para futuros estudios en el área.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Generalidades de *Escherichia coli* y STEC

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una bacteria bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, móvil, no formador de esporas, que sobrevive a pH de entre 4,4 – 9, y que pertenece a la familia de las enterobacterias (ISP, 2012; OMS, 2016; Winn *et al.*, 2008). Para la serotipificación de la bacteria se utilizan dos antígenos; el antígeno somático (O) ubicado en la porción polisacárida del lipopolisacárido (LPS) y el antígeno flagelar (H) de naturaleza proteica y que corresponde al flagelo bacteriano (Vivanco, 2011). El primero determina la clasificación de diferentes serogrupos y al combinar esta nomenclatura con el segundo (Antígeno H) determinan la clasificación de *E. coli* en diferentes serotipos (Vivanco, 2011).

*E. coli* es una bacteria comensal de la microbiota intestinal de hombres y animales. Sin embargo, dentro de la especie se reconocen al menos seis grupos patógenos o patotipos (Baeza, 2013; Bettelheim, 2007; ISP, 2012): *-E. coli* Enteropatógena (EPEC), *-E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *-E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *-E. coli* productora de Toxina Shiga (STEC). *-E. coli* Enteroagregativa (EAEC) y *-E. coli* de Adherencia difusa (DEAC).

*E. coli* productor de toxinas del tipo Shiga (STEC) es un patógeno emergente que se transmite a través de alimentos. Recibe su nombre por la capacidad de generar la Toxina tipo Shiga, la que causa la muerte de células tipo Vero de forma similar a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* (Marchant, 2013; Vivanco, 2011). STEC es capaz de generar brotes y casos esporádicos de diarrea con y sin sangre, colitis hemorrágica y/o síndrome hemolítico urémico (SHU) (ISP, 2012; Mekata *et al.*, 2014). Las cepas de STEC que son capaces de producir estos cuadros graves son conocidas como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Bettelheim, 2007).

Las infecciones con STEC presentan un periodo de incubación estimado de 3 a 4 días. La sintomatología clínica varía de 4 a 6 días, y va desde calambres abdominales severos con o sin fiebre, y diarrea acuosa que puede o no ir acompañada de sangre (Baeza, 2013; Vivanco, 2011). Sin embargo, el cuadro clínico de mayor relevancia es el de síndrome hemolítico urémico (SHU) (Vivanco, 2011). Este cuadro se presenta del 2% al 7% de las

infecciones por STEC (Vivanco, 2011) y está definido por una anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y con falla renal aguda, precedidas habitualmente por diarreas con sangre, cuyos resultados fatales se pueden presentar entre los 5 a 14 días iniciado el cuadro diarreico (Baeza, 2013; Vivanco, 2011).

Los rumiantes, y en especial el ganado bovino, son el principal reservorio de STEC (Bai *et al.*, 2015; Erickson y Doyle, 2007; ISP, 2012; Karmali *et al.*, 2010), y aunque existen algunas cepas capaces de generar cuadros diarreicos en terneros, el ganado resulta ser un portador asintomático de STEC (Borie *et al.*, 1997; FAO, 2017). En Chile, un estudio realizado por Borie *et al.*, determinó una prevalencia de STEC del 28% en bovinos y del 68% en suinos (Borie *et al.*, 1997), y otro estudio determinó que el 11,9% de bovinos eran portadores de STEC (Vivanco, 2011).

Los alimentos se pueden contaminar con STEC principalmente por contacto con las excretas de rumiantes y animales silvestres portadores, puesto que la bacteria es capaz de sobrevivir a bajas temperaturas y alta humedad de forma exitosa (FAO, 2017; Marchant, 2013). Las heces pueden contaminar de forma directa o indirecta a los alimentos, a través de la contaminación de fuentes de aguas utilizadas para riego de cultivos, consumo o formación de compost (FAO, 2017). Así también, puede existir una contaminación en la manipulación de los alimentos durante el transporte, la elaboración o la preparación de estos (FAO, 2017).

Dentro de los alimentos asociados a brotes de STEC/EHEC se encuentran la carne molida y productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos como hamburguesas, salchichas o embutidos (Bai *et al.*, 2015; ISP, 2012; Masana *et al.*, 2011); otros alimentos como lácteos no pasteurizados, mayonesas, lechuga, soya y alfalfa también han sido asociados a brotes de STEC/EHEC (ISP, 2012; Masana *et al.*, 2011). Algunos autores mencionan que, dentro de los alimentos, la leche y la carne molida son los de mayor riesgo para la población (Karmali *et al.*, 2010), siendo solo 50 unidad formadora de colonias (UFC) la dosis mínima necesaria del patógeno para causar enfermedad (Mathusa *et al.*, 2010).

El primer brote de enfermedad en USA fue causado en 1982 por hamburguesas y se atribuyó al serotipo O157:H7 (Baeza, 2013) del cual se han registrado brotes en Canadá, Japón, Reino Unido y USA (Erickson y Doyle, 2007; Karmali *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016;

Masana *et al.*, 2011). El primer brote de enfermedad de STEC/EHEC no-O157 se detectó en 1986 en Alemania. Desde ese año en adelante se han confirmado brotes causados por una gran variedad de alimentos en Australia, Bélgica, Dinamarca, Noruega, USA, entre otros (Masana *et al.*, 2011). Las STEC/EHEC no-O157 de los serogrupos que más frecuentemente causan enfermedades en humanos son conocidos como los serogrupos “Big Six”, e incluyen a *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 y O145. Estos serogrupos están involucrados en el 71% de enfermedades producidas por STEC/EHEC diferente a O157 en los Estados Unidos (Bosilevac y Koohmaraie, 2011; Li *et al.*, 2016).

Los principales factores de virulencia de STEC son las toxinas Shiga Stx<sub>1</sub>, Stx<sub>2</sub> con sus variantes Stx<sub>1</sub>(a – c) y Stx<sub>2</sub>(a – h). La toxina Shiga, está compuesta por 2 subunidades: A y B. La subunidad B está implicada en la unión de la toxina a la membrana celular, permitiendo el ingreso de la subunidad A al citoplasma celular, la cual interfiere en la síntesis proteica a nivel ribosomal. Esto genera un daño irreversible que culmina en apoptosis (Baeza, 2013). A estos factores se suma el gen *eae* (Baeza, 2013; Masana *et al.*, 2011; Mekata *et al.*, 2014) el cual se ubica en la isla de patogenicidad LEE (locus de borrado del enterocito) y codifica para la proteína intimina, involucrada en la colonización bacteriana del epitelio intestinal, generando una serie de cambios a nivel de citoesqueleto celular y causando una lesión tipo A/E (adhesión y borrado) (Baeza, 2013). La presencia de intimina se describe en las cepas de mayor virulencia, sin embargo, no es esencial en la patogénesis de la enfermedad (Baeza, 2013). Otros genes que se han propuesto como factores de virulencia se encuentran en plásmidos, siendo uno de ellos el gen para la enterohemolisina (*hlyA*), ubicado en el plásmido pO157 cuyo principal rol es el de lisis células endoteliales liberando hierro el que queda disponible para ser utilizado por la bacteria (Baeza, 2013).

### **ETA y STEC en productos cárnicos**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son responsables de aproximadamente el 70% de las diarreas en Chile (Olea *et al.*, 2012). Según los datos obtenidos entre los años 2005 a 2010 por Olea *et al.* (2012), el 65% de las ETA correspondió a “ETA bacteriana no especificada” y un 10% a “Diarrea y gastroenteritis de presunto origen infeccioso”. Siendo

en el mes de noviembre cuando se presentan los mayores porcentajes de enfermedad diarreica (Thomas *et al.*, 2008). En el periodo comprendido entre enero a abril del año 2017, el 5,5% de las ETA fue causado por carne y productos cárnicos. Dentro de los patógenos identificados, *E. coli* causo el 2,7% de los brotes de ETA (Orellana y Salvador., 2017).

La carne, y en particular la carne molida, está involucrada en brotes de STEC/EHEC en el mundo y se han asociado a la contaminación que puede ocurrir durante el beneficio del animal (Bai *et al.*, 2015; Erickson y Doyle, 2007; ISP, 2012; Karmali *et al.*, 2010; Masana *et al.*, 2011).

Durante el proceso de elaboración de carne molida, la contaminación con *E. coli* se ha identificado en las etapas de descuerado, evisceración, enfriamiento de la canal, recorte, molienda y almacenamiento; asociado a las malas prácticas de faenado, higiene de los mataderos y manipulación de los animales. (FAO, 2011; FAO, 2017; FSIS, 2001). En estas etapas, la contaminación se puede dar tanto por la sobrevivencia de la bacteria en los insumos de trabajo, como por las malas prácticas en algunos procesos de la faena, puesto que la bacteria puede sobrevivir tanto en plástico como acero inoxidable, siendo estos los principales materiales utilizados en maquinaria e insumos de trabajo (Erickson y Doyle, 2007; FSIS, 2001).

### **STEC en el mundo**

Estudios realizados en Argentina muestran que un 25% de las carcasas de vacunos son positivas a *E. coli* O157 en carnicerías, 12,3% en matadero y 18,6% en frigorífico. Por otro lado, un 9% de las carcasas son positivas a STEC no-O157 (Etcheverría *et al.*, 2010; Masana *et al.*, 2011). En cuanto a productos cárnicos, se ha establecido una prevalencia del 28% en hamburguesas (Parma *et al.*, 2000), 8,4% en hamburguesas congeladas (Gómez *et al.*, 2002) y 1% en salchichas pre-cocidas (Oteiza *et al.*, 2006).

En USA, STEC O157 presenta una prevalencia de entre 2,4% – 36,4% en carne molida, 17,0% a 49,2% en salchicha, 11,4% a 49,6% en cortes no especificados y 1,7% a 58% en canales enteras (Erickson y Doyle, 2007; Karmali *et al.*, 2010). Para STEC no-O157 la

prevalencia en carne molida varía entre un 5%– 30% (Bosilevac y Koohmaraie, 2011; Ju *et al.*, 2012).

Estudios realizados en China muestran que STEC es frecuentemente detectada en carne de vacuno y cerdo. Un análisis realizado por Li *et al.* (2016) determina que el 11,2% de las muestras tomadas desde supermercado y pequeños negocios fueron positivas a *E. coli* O157 mientras que el 15,3% fueron positivas a STEC no-O157. Este mismo estudio reveló que el 12,3% de carne de vacunos, el 23,1% de carne de cerdos y el 1,4% de vegetales fueron positivos a STEC O157:H7. En el caso de STEC no-O157, el 48,3% en carne de vacunos, 14,7% en carne de cerdo y 4,3% en vegetales resultaron positivos a la presencia de la bacteria (Li *et al.*, 2016). Los resultados de estos estudios concluyeron que STEC no-O157 fue más frecuente en carne de vacuno (48,2%) que de cerdo (23,1%), y que STEC O157 fue más frecuente en carne de cerdo (23,1%) que en carne de vacuno (14,7%) (Li *et al.*, 2016). Otro estudio realizado en el mismo país por Bai *et al.* (2015), en donde se estudiaron cortes de carnes en ventas al por menor, arrojó como resultado una prevalencia del 11% de STEC en carnes de vacunos y de 4,4% en carnes de cerdos. Sin embargo, destaca la carne de cordero con una prevalencia del 20,6%. El estudio señala además una prevalencia del 0,5% en carne de pollo y 7,7% en carne de pato (Bai *et al.*, 2015).

### **STEC en Chile**

A nivel clínico, el Instituto de Salud Pública (ISP) identificó 607 cepas de STEC/EHEC aisladas en nuestro país desde pacientes con SHU o colitis hemorrágica entre los años 2010 y 2016. Los análisis indican que el serogrupo O157 fue el más frecuentemente aislado en un 58,6% (356/607), seguido por el serogrupo O26 con un 36,9% (224/607) (ISP, 2017). Los periodos comprendidos entre mayo y julio representaron los de menor muestras confirmadas, en cambio entre los meses de septiembre y marzo, existe una mayor cantidad de confirmadas (ISP, 2017).

A nivel de alimentos, un estudio reciente investigó 304 muestras de cortes de carnes nacionales e importadas, de las cuales un 6,6% resultó contaminado con STEC (Baeza, 2013). De las muestras positivas a STEC, el 55% presentó sólo el gen *stx*<sub>2</sub>, seguido por un 35% que presentó los genes *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub> y un 10% sólo el gen *stx*<sub>1</sub>. La presencia del gen *hlyA* se

detectó en el 65% de las cepas aisladas. El 100% de las muestras positivas a STEC pertenecieron a serogrupos no-O157. De los serogrupos identificados, el más prevalente fue el O113, correspondiendo al 30% del total de las cepas aisladas. Con una frecuencia menor fueron identificados los serogrupos O174 (10%), O141 (5%) y O8 (5%) (Baeza, 2013).

Un boletín emitido por el Instituto de Salud Pública (ISP) el año 2016, determinó que dentro de 164 muestras de carnes de vacuno recibidas. Once (6,7%) resultaron ser positivas a la presencia de STEC (ISP, 2017). De éstas, se determinó la presencia del gen *stx<sub>1</sub>* en el 18,2% (2/11) y el gen *stx<sub>2</sub>* en un 81,8% (9/11). En ningunos de los aislados se determinó la presencia del gen *eae* (ISP, 2017).

En Chile no existe un estudio que caracterice la presencia de STEC en carne molida. Este alimento es de gran consumo en la población nacional por su bajo costo, potencial para la gastronomía y variedad de presentación a la venta, representando un riesgo importante para la población. Por lo tanto, el presente estudio propone caracterizar *E. coli* productora de toxina tipo Shiga, aislada desde carne molida, comercializada en el gran Santiago.



## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Caracterizar la presencia de *E. coli* productora de toxinas tipo Shiga (STEC) aisladas de muestras de carne molida de vacuno del gran Santiago.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar la prevalencia de STEC en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.
2. Determinar la presencia de los serogrupos O157 y “Big Six” en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.
3. Caracterizar genotípicamente los aislados de STEC identificados en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago, mediante la determinación de la presencia de los genes de virulencia *eae* y *hlyA*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **Objetivo 1: Determinar la prevalencia de STEC en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.**

#### **Tamaño y obtención de muestras**

Se calculó un tamaño de 430 muestras de carne molida considerando una prevalencia de 7% (Baeza, 2013); poder estadístico 80%; error alfa un 5%. Las muestras fueron obtenidas desde la ciudad de Santiago, incluyendo las comunas de San Bernardo y Puente Alto, dividiendo la ciudad en cuatro zonas geográficas (zona Norte, zona Oriente, zona Poniente y zona Sur) siguiendo la clasificación del Servicio de Impuestos Internos para las comunas de Santiago. Se obtuvo la misma cantidad de muestras desde cada zona (Tabla N°1 y Tabla N°2).

Se tomaron 24 muestras cada dos semanas, 12 de cada tipo de comercio (carnicería o supermercado), alternando entre comunas de las zonas Oriente - Sur o Zona Norte – Poniente entre los meses de Marzo de 2016 y Enero de 2017. Las muestras fueron transportadas a 4°C al Laboratorio de Microbiología y Probióticos del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos donde fueron procesadas dentro de 6h tras su obtención.

**Tabla N°1:** Número de muestras de carne molida por zona geográfica y tipo de comercio.

<b>Zona</b>	<b>Carnicerías</b>	<b>Supermercados</b>	<b>Total</b>
<b>Sur</b>	54	54	108
<b>Norte</b>	54	54	108
<b>Oriente</b>	54	53	107
<b>Poniente</b>	53	54	107
<b>Total</b>	215	215	430

**Tabla N°2:** Distribución de comunas por zonas del Gran Santiago para el estudio.

<b>Zona Norte</b>	<b>Zona Oriente</b>	<b>Zona Poniente</b>	<b>Zona Sur</b>
Conchalí	La Reina	Cerrillo	El Bosque
Huechuraba	Las Condes	Cerro Navia	La Cisterna
Independencia	Lo Barnechea	Estación Central	La Florida
Quilicura	Macul	Lo Prado	La Granja
Recoleta	Ñuñoa	Maipú	La Pintana
Santiago ZN	Peñalolén	Pudahuel	Lo Espejo
	Providencia	Quinta Normal	Pedro Aguirre Cerda
	Santiago ZO	Renca	Puente Alto
	Vitacura	Santiago ZP	San Bernardo
			San Joaquín
			San Miguel
			San Ramón
			Santiago ZS

### **Procesamiento de las muestras**

Se pesaron 25g de carne molida de vacuno y se incubaron con 225mL de caldo tripticasa-soya modificado (30g TSB (DIFCO, Estados Unidos) + 1,5g sales biliares N°3 (DIFCO) + 1,5g de fosfato dipotásico ( $K_2HPO_4$ , Merck, Alemania) por 1L de agua destilada) por 15 – 22h a 42°C (Ju *et al.*, 2012).

## **Tamizaje**

Para determinar la posible presencia de STEC en las muestras, se realizó un tamizaje a través de una prueba de PCR en busca de los genes que codifican para la toxina Shiga 1 y 2 (*stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*) (Cebula, 1995; Toro *et al.*, 2013). En breve, luego de la incubación, se extrajo ADN directamente desde el caldo de enriquecimiento utilizando el kit de extracción Instagene<sup>TM</sup>Matrix (Bio-Rad, Hércules, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante. Paralelamente, las muestras fueron sembradas en agar Mac Conkey (MCC) por agotamiento y se incubaron a 37°C por 18–20h (Stromberg *et al.*, 2015). Desde la zona de crecimiento confluyente se extrajo ADN por la técnica del hervido para realizar un tamizaje complementario. Los PCR de tamizaje se realizaron utilizando GoTaq® Green Master mix, 2X siguiendo las instrucciones del fabricante, y con las concentraciones y temperaturas de alineamiento específicas para cada partidior (Tabla 3), con una cantidad de 10 µL final (Cebula, 1995; Toro *et al.*, 2013).

## **Electroforesis**

Para determinar la presencia y el tamaño de los productos de PCR, el resultado de la reacción de PCR se visualizó en un gel de agarosa con concentración entre 1% a 2% según cada PCR realizado. Se utilizó marcador de tamaño molecular de 100bp (Massruler DNA LadderMix, Invitrogen). Las condiciones de corrida fueron 100 volts por 30 a 45 minutos según el tamaño del producto de PCR.

**Tabla N°3:** Secuencia partidores *E. coli* y genes *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*.

Partidor	Gen	Secuencia del partidor	T° alineamiento	Tamaño de banda
<i>E. coli</i> F	<i>uspA</i>	(5 – CCGATACGCTGCCAATCAGT – 3)	58°C	884pb
<i>E. coli</i> R	<i>uspA</i>	(5 – ACGCAGACCGTAGGCCAGAT – 3)		
<i>stx<sub>1</sub></i> F	<i>stx<sub>1</sub></i>	(5 –CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG– 3)	59°C	348pb
<i>stx<sub>1</sub></i> R	<i>stx<sub>1</sub></i>	(5 –CACCAGACAATGTAACCGCTG– 3)		
<i>stx<sub>2</sub></i> F	<i>stx<sub>2</sub></i>	(5 –ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG– 3)	59°C	584pb
<i>stx<sub>2</sub></i> R	<i>stx<sub>2</sub></i>	(5 –GCGTCATCGTATACACAGGAGC– 3)		

### **Aislamiento de STEC**

Desde cada una de las muestras positivas al tamizaje, se seleccionaron 20 colonias desde la placa de agar MCC y se extrajo ADN para determinar la presencia de los genes *stx*. Los aislados positivos al PCR fueron sometidos a pruebas bioquímicas, tinción de Gram y prueba de PCR para confirmar la identidad de la bacteria *E. coli*. Todos los aislados confirmados como STEC, fueron guardados en congelación (-80°C) en caldo Brain Heart Infusion (BHI) con glicerol al 20% para análisis posteriores.

### **Pruebas bioquímicas**

Para la identificación presuntiva de la bacteria *E. coli* se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: TSI (triple – azúcar - hierro), LIA (agar – lisina - hierro), MIO (movilidad – indol – ornitina), Citrato de Simmons, Fenilalanina y Urea.

### **Prueba de PCR para *E. coli*.**

En todos los aislados de STEC se confirmó la identidad de *E. coli* a través de un PCR específico para el gen *uspA* (Chen y Griffiths, 1998). Para las reacciones de PCR se utilizó GoTaq® Green Master mix, 2X siguiendo las instrucciones del fabricante, con las concentraciones y temperaturas de alineamiento específicas para cada partidador (Tabla 3).

### **Objetivo 2: Determinar la presencia de los serogrupos O157 y “Big Six” en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.**

Para la búsqueda de los serogrupos Big Six y O157 se realizó una prueba de PCR específica (Toro *et al.*, 2013).

Para las reacciones de PCR se realizó utilizando GoTaq® Green Master mix, 2X siguiendo las instrucciones del fabricante, con las concentraciones y temperaturas de alineamiento específicas para cada partidador (Tabla 4), con un volumen final de reacción de 25uL (Toro *et al.*, 2013).

**Tabla N°4:** Secuencia partidores serogrupos Big Six y O157.

Partidor	Secuencia del partidor	T° alineamiento	Tamaño de banda
O26 F	(5 – CCGATACGCTGCCAATCAGT – 3)	56°C	438pb
O26 R	(5 – ACGCAGACCGTAGGCCAGAT – 3)		
O45F	(5 –CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG– 3)	56°C	341pb
O45R	(5 –CACCAGACAATGTAACCGCTG– 3)		
O103 F	(5 –ATCCTATTCCC GGGAGTTTACG– 3)	56°C	385pb
O103 R	(5 – CCGATACGCTGCCAATCAGT – 3)		
O111 F	(5 – ACGCAGACCGTAGGCCAGAT – 3)	56°C	362pb
O111 R	(5 –CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG– 3)		
O121 F	(5 –CACCAGACAATGTAACCGCTG– 3)	56°C	366pb
O121 R	(5 –ATCCTATTCCC GGGAGTTTACG– 3)		
O145 F	(5 –CCTGTCTGTTGCTTCAGCCCTTT– 3)	56°C	392pb
O145 R	(5 –CTGTGCGCGAACCACTGCTAAT– 3)		
O157F	(5 –TCGTTCTGAATTGGTGTGCTCA– 3)	56°C	278pb
O157R	(5 –TCGTTCTGAATTGGTGTGCTCA– 3)		

**Objetivo 3: Caracterizar genótipicamente los aislados de STEC identificados en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago, mediante la determinación de la presencia de los genes de virulencia *eae* y *hlyA*.**

**Confirmación de presencia de factores de virulencia.**

La detección de los factores de virulencia se determinó a través de PCR para el gen *eae* (Fratamico y Strobaught, 1998) y *hlyA* (Xia *et al.*, 2010). Todas las reacciones de PCR se realizaron utilizando GoTaq® Green Master mix, 2X siguiendo las instrucciones del fabricante, con las concentraciones y temperaturas de alineamiento específicas para cada partidor (Tabla 5).

**Tabla N°5:** Secuencia partidores para factores de virulencia *eae* y *hlyA*.

<b>Partidor</b>	<b>Gen</b>	<b>Secuencia del partidor</b>	<b>T° alineamiento</b>	<b>Tamaño de banda</b>
eae F	<i>eae</i>	(5 –ATTACCATCCACACAGACGGT– 3)	63°C	397pb
eae R	<i>eae</i>	(5 –ACAGCGTGGTTGGATCAACCT– 3)		
hlyA F	<i>hlyA</i>	(5 –AGCCGGAACAGTTCTCTCAG– 3)	60°C	526pb
hlyA R	<i>hlyA</i>	(5 –CCAGCATAACAGCCGATGT– 3)		



### **Controles positivos**

Como control de reacción de PCR para *E. coli* y para el serogrupo O157, así como para los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *eae*, *hlyA* se utilizó la cepa ATCC35150. Los controles positivos para las reacciones de PCR de las Big Six fueron las cepas 88-353 (O26), A9619-C2 (O45), B27828/95 (O103), P1338 (O111), SJ18 (O121) y CVM9777 (O145), los que fueron donados por el Laboratorio de Inocuidad de los Alimentos de la Universidad de Maryland, College Park, Estados Unidos. Como control negativo se utilizó agua libre de nucleasa como sustituyente del ADN.

### **Análisis de Datos**

Los valores de prevalencia de STEC en la ciudad de Santiago se obtuvieron como el porcentaje de muestras positivas a STEC por zona (norte, sur, oriente y poniente) y por tipo de comercio (supermercado y carnicerías) y total. Las diferencias entre la prevalencia por zonas o entre los tipos de comercio se analizaron con la prueba de bondad de ajuste de chi cuadrado.

Para caracterizar los aislados, se determinó el número y porcentaje perteneciente a los serogrupos O157 y a cada uno de los serogrupos “Big Six” y también se determinó la presencia de los genes *stx*<sub>1</sub>, *stx*<sub>2</sub>, *stx*<sub>1</sub>/*stx*<sub>2</sub>, *hlyA* y *eae*.

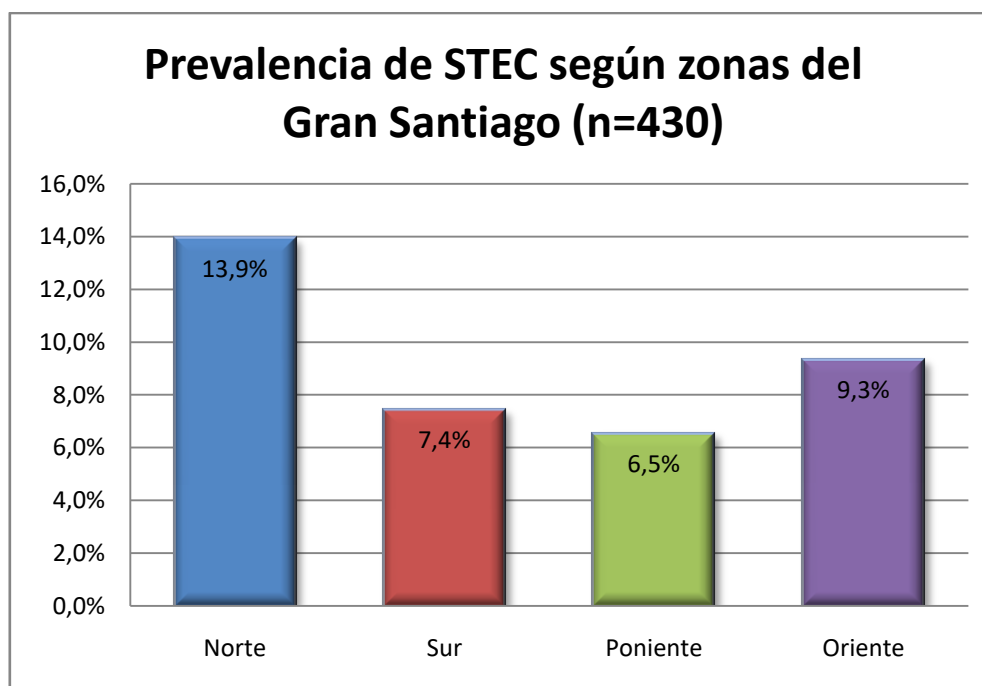
## RESULTADOS

**Objetivo específico N°1:** Determinar la prevalencia de STEC en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.

De las 430 muestras de carne molida de vacunos que fueron analizadas en el estudio, 40 resultaron positivas a la presencia de STEC, lo que corresponde a una prevalencia del 9,3% de STEC en el gran Santiago.

Los resultados obtenidos determinan que la zona que presentó una prevalencia mayor fue la zona Norte, seguida por la zona Oriente, luego zona Sur y finalmente la zona Poniente (Figura 1). Estos resultados no representan diferencias significativas entre las diferentes zonas (Valor de  $\chi^2$  con 3 grados de libertad y un error del 5% = 12,8381; valor del estadístico=3,46).

**Figura 1.** Prevalencia de STEC en muestras de carne obtenidas de distintas zonas del gran Santiago.



En cuanto a la prevalencia determinada según lugar de obtención de las muestras, se estableció que el 10,2% (22/215) de las muestras de carnicería fue positivas a STEC, en cambio, el 8,4% (18/215) de las muestras de Supermercados tenía STEC. Sin embargo, estos resultados no son significativamente diferentes (Valor de  $\chi^2$  con 1 grado de libertad y un error del 5%=7,8794; valor del estadístico =0,18).

**Objetivo Especifico N°2: Determinar la presencia de los serogrupos O157 y “Big Six” en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago.**

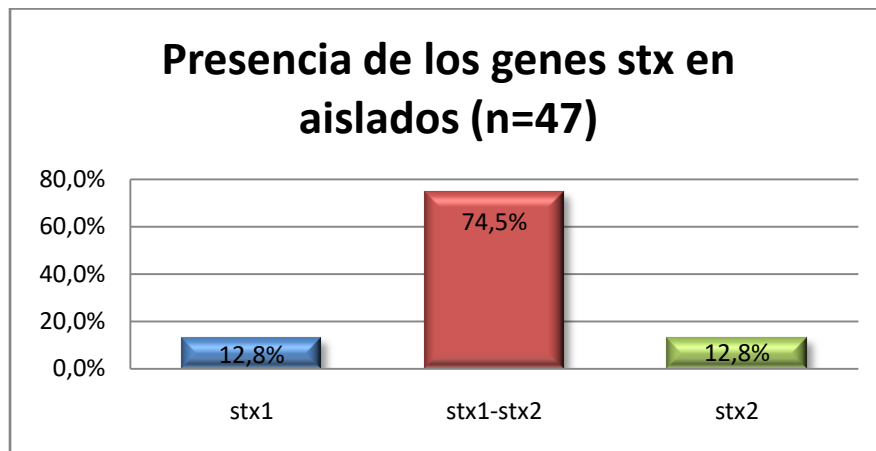
Se estudiaron 47 aislados de STEC obtenidos desde las 40 muestras de carne molida de vacuno analizadas para determinar si pertenecían a uno de los siete serogrupos más prevalentes de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145). Los resultados indican que en ninguno de los aislados perteneció a los serogrupos O157 y Big Six.

Cabe mencionar que un aislado resultó positivo al PCR múltiple para los serogrupos Big Six, sin embargo, al PCR individual de serogrupo el aislado resultó ser negativo para cada uno de los serotipos Big Six, por lo cual, se determinó que el aislado era un falso positivo.

**Objetivo Especifico N°3: Caracterizar genotípicamente los aislados de STEC identificados en muestras de carne molida de vacuno en la ciudad de Santiago, mediante la determinación de la presencia de los genes de virulencia *eae* y *hlyA*.**

En este estudio, determinamos que de los 47 aislados de STEC, se encuentra en mayor proporción el gen *stx*<sub>1</sub>, seguido por el gen *stx*<sub>2</sub> y por último los genes *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>, en conjunto (Figura 2).

**Figura 2.** Presencia de los genes *stx* de las aislados desde muestras de carne molida obtenidas en el Gran Santiago.



Para los factores de virulencia *eae* y *hlyA*, el 40,4% (19/47) de los aislados posee el gen *hlyA*, sin embargo, ninguno de los aislados presenta el gen *eae*.

Por otro lado, al combinar la presencia de los distintos factores de virulencia (*stx1*, *stx2*, *eae* y *hlyA*) se estableció la presencia de 6 perfiles distintos. La mayoría de los aislados obtuvo como único factor de virulencia el gen *stx2* (53,2%, 25/47), seguido por los aislados que poseen los factores *stx2* – *hlyA* (21,3%, 10/47), el resto de los perfiles se detalla en la tabla N° 6.

**Tabla 6:** Perfiles de genes de virulencia de cepas aisladas desde muestras de carne molida obtenidas en el Gran Santiago.

Perfiles de virulencia	Número de aislados
<i>stx2</i>	25/47 (53,2%)
<i>stx2-hlyA</i>	10/47 (21,2%)
<i>stx1</i>	4/47 (8,5%)
<i>stx1 – stx2</i>	4/47 (8,5%)
<i>stx1-hlyA</i>	2/47 (4,3%)
<i>stx1 – stx2 - hlyA</i>	2/47 (4,3%)
Total	47 (100%)

## DISCUSIÓN

STEC es un patógeno emergente transmitido por un gran número de alimentos, entre ellos la carne (Marchant, 2013; Vivanco, 2011). En particular, la carne molida puede contaminarse con distintos patógenos, en distintas etapas de su proceso, tales como la faena, la molienda y/o el envasado. En este estudio, determinamos que un 9,3%, de las muestras de carne molida tomadas en Santiago estaban contaminadas con STEC, entre las que se encontró que el gen *stx<sub>2</sub>* fue el más prevalente en los aislados (74,5%) seguido por *stx<sub>1</sub>* y la combinación *stx<sub>1</sub>/stx<sub>2</sub>* en misma cantidad (12,8%). En los aislados no se encontró el gen *eae* y se determinó la presencia del gen *hlyA* en un 40%.

Un estudio previo realizado en Santiago de Chile (Baeza, 2013) determinó una prevalencia de STEC del 6,6% en muestras de carne de bovino. Este valor es menor al valor encontrado en el presente estudio (9,3%). Esta diferencia puede deberse a que dicha investigación determinó la presencia de STEC en cortes de carnes de vacuno, y no en carne molida. Los cortes de carne de vacuno son un alimento que poseen menor manipulación y procesamiento que la carne molida, por lo tanto, los trozos de carne poseen un riesgo menor de contaminación. Al contrario, la carne molida es un alimento que se elabora desde muchos tipos de cortes de carnes distintos, muchos con origen desconocido en cuanto a lugar de procedencia o edad de los animales. A su vez, este producto tiene una mayor superficie de contacto, lo que aumenta el riesgo de contaminación por contacto entre carne de diferente origen, el equipamiento utilizado o incluso las manos de los operarios.

Las tasas de aislamiento de STEC en productos cárnicos en América Latina varían según país. Diversos estudios en Argentina han determinado prevalencias de STEC desde 9% a un 25% en productos cárnicos (Etcheverría *et al.*, 2010; Masana *et al.*, 2011). Cabe destacar que Argentina es el país con mayor prevalencia de SHU en el mundo. En Perú se encontró un 19,4 % positivo para STEC en productos cárnicos (Navarro *et al.*, 2017). La prevalencia de STEC en Uruguay en carne picada fue de 1,8% de STEC O157 (Varela *et al.*, 2008) y en Brasil se reportó un 3,5% de prevalencia de STEC en carne molida de vacuno obtenida desde carnicerías (Morato *et al.*, 2007). Según los datos reportados en nuestro país, Chile posee prevalencias superiores a las encontradas en Uruguay y Brasil, e inferiores a las reportadas en Argentina y Perú. Chile recibe importantes volúmenes de carne desde Brasil,

Argentina, Uruguay, Paraguay y también de USA. Estudios de carne molida en este último país han determinado prevalencias de STEC O157 entre 2,4% a 36,4% (Erickson y Doyle, 2007; Karmali *et al.*, 2010) y para STEC no-O157 la prevalencia en carne molida varía entre un 5% y un 30% (Bosilevac y Koohmaraie, 2011; Ju *et al.*, 2012), cifras en algunos estudios similares a las encontradas en nuestro territorio.

En nuestro estudio, de las 40 muestras positivas se obtuvieron 47 aislados de STEC. De estos, el 12,8% de los aislados poseía solo el gen *stx1*, el 74,4% portaba el gen *stx2* y el 12,8% tenía los genes *stx1* y *stx2*. Diversos estudios señalan que la presencia del gen *stx2* está asociada a casos más severos de SHU y colitis hemorrágica en humanos. (Bolton, 2010). El estudio realizado por Baeza 2013 en Chile en cortes de carne determinó, al igual que nuestro estudio, que el gen más encontrado fue *stx2* con un 55%, seguido por *stx1/stx2* (35%) y *stx1* (10%). En un reporte realizado por el ISP en el año 2017, donde estudiaron diversos alimentos, igualmente se concluyó que de los aislados el gen encontrado con mayor frecuencia es *stx2* con un 52,4%, seguido por *stx1* (36,6%) y *stx1/stx2* (11%).

En el presente estudio no se observó la presencia de *E. coli* de serotipos Big Six ni O157. Esto es similar a lo reportado por Baeza, quien tampoco encontró *E. coli* serogrupo O157 ni de serogrupos Big Six (Baeza, 2013). Es importante mencionar que el 50% de las cepas aisladas en dicho estudio no logró ser serotificada (Baeza, 2013). En estudios en América Latina se ha detectado STEC serotipo O157 en Argentina (6,2%), Perú (12,3%) y Uruguay (1,8%) (Brusa *et al.*, 2013; Etcheverría *et al.*, 2010; Miccio *et al.*, 2011; Mora *et al.*, 2007; Morato *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2008).

Pese a que en el presente estudio y en el de Baeza no se determinó la presencia de STEC O157 ni Big Six en muestras de carne de vacuno, un estudio del año 1997 (Borie *et al.*, 1997) determinó la presencia de STEC en heces de bovinos y suinos en Chile, encontrando cepas de serogrupos O157, O26 y O111 en ambas especies; en suinos se agrega la presencia de al menos 9 serotipos diferentes a Big Six y O157 (Borie *et al.*, 1997). Un estudio más reciente, realizado por Vivanco en el año 2011 en Chile, determinó que solo una cepa aislada de bovinos era del serogrupo O157, correspondiente al 1,9% de las cepas identificadas. El serotipo O171:H2 fue el de mayor proporción, con un 13,46%, seguido por el serotipo O20:H19 en un 9,6%. Considerando los serotipos Big Six se determinó al menos

dos cepas del serogrupo O103 (3,8%), y los serogrupos restantes correspondieron a No – O157 distintos a los Big Six (Vivanco, 2011).

*E. coli* O157 (55,7%) y O26 (34,9%) corresponden a los serogrupos más frecuentemente reportados como causantes de infección humana por STEC en Chile (ISP, 2017). En el presente estudio no se encontró cepas pertenecientes a ninguno de estos serotipos en las muestras cárnicas analizadas. Este resultado podría indicar que la carne que se expenden en Santiago no es vehículo de estos serogrupos, sin embargo, un mayor tamaño de muestra podría ayudar a dilucidar una respuesta. Por otro lado, existe la posibilidad de que otros alimentos pudieran ser la fuente de infección con estos serogrupos de STEC para la población humana como por ejemplo agua, verduras y frutas contaminadas. Por último, es importante destacar que existen diversos medios de transmisión de STEC a las personas como por ejemplo contacto persona a persona y con animales (FAO, 2017),

El factor de virulencia *eae* permite la adhesión de STEC al enterocito y es fundamental para producir la lesión de tipo A/E (adhesión y borrado). En el presente estudio no se encontró el gen *eae* en las muestras estudiadas. Similar resultado fue reportado por Baeza (Baeza, 2013). De los estudios realizados en el país, solo se encontró el gen *eae* en 4 cepas (7,7%) identificadas por Vivanco en muestras de heces de bovinos (Vivanco, 2011) y en 10 cepas (35%) identificadas en heces de bovinos por Borie y colaboradores (Borie *et al.*, 1997). Sin embargo, existen otros factores de virulencia que permitirían la adhesión de STEC a la célula intestinal (Baeza, 2013) por lo cual, la sola ausencia del factor de virulencia *eae* no descarta la patogenicidad de las cepas identificadas en este estudio. Un estudio realizado por Ju *et al.*, 2012 en USA, no reportó presencia del gen *eae* en cepas de STEC no-O157 (Ju *et al.*, 2012); en Brasil se reportó solo un aislado portador del gen *eae* dentro de 171 aislados de carne de porcino (Ristori *et al.*, 2017); en Argentina reportes no determinan la presencia del gen *eae* en carnes (Echeverría *et al.*, 2010).

Por otro lado, el gen *hlyA* fue detectado en el 40% de los aislados. El gen codifica para una toxina que causa la lisis de los eritrocitos y está asociado a aislados proveniente de cuadros clínicos en humanos (Vidal *et al.*, 2010; Lorenz *et al.*, 2013). Un estudio previo determinó que el 65% de cepas de STEC aisladas en Chile desde muestras de carne poseía el gen *hlyA*; cifra mayor a la encontrada en nuestro estudio (Baeza, 2013).

De los genes estudiados, se determinaron 6 perfiles de virulencia distintos, siendo los aislados portadores del gen *stx<sub>2</sub>* (53,2%) y *stx<sub>2</sub> – hlyA* (21,2%), los más prevalentes. Esto presume un riesgo para la población por la patogenicidad del gen *stx<sub>2</sub>*, sin embargo, se requieren más estudios para determinar el potencial patogénico de éstos aislados. Por ejemplo, sería de importancia determinar la presencia de genes que permitan la adhesión de STEC al enterocito, y que pudieran reemplazar la función del gen *eae* y así permitan la infección en humanos y el desarrollo del cuadro clínico. Algunos de estos genes son *efa*, *lpf* y *saa*.

La serotipificación completa de los aislados hubiese permitido determinar si los serogrupos aislados en este estudio son los mismos o similares a los encontrados en los otros estudios de Chile o de América Latina, permitiendo evaluar y comparar las semejanzas en los distintos serotipos encontrados en carnes y los reportados en cuadros clínicos en humanos. Además, la determinación de la presencia de STEC en carnes de otros tipos, como carne de cerdo, hubiese podido entregar un escenario más completo sobre la situación actual en Santiago.

El estudio realizado pone en manifiesto que en nuestro país existe la presencia de STEC en carne molida de bovino, por lo tanto, existe la posibilidad de que otros productos cárnicos también estén contaminados con esta bacteria. Existen pocos estudios de STEC en alimento en nuestro país, por lo cual la presente investigación entrega información valiosa con respecto a las tasas de aislamiento y caracterización de los aislados encontrados. En este escenario toma relevancia la vigilancia epidemiológica del patógeno en los alimentos comercializados en nuestro territorio. Es importante entregar recursos para generar nuevos estudios que permitan profundizar la información y educar a la población sobre los riesgos de STEC, para instruir en la prevención del patógeno al momento de consumir alimentos.



## CONCLUSIÓN

Este estudio entrega información relevante acerca de la identificación de *E. coli* productora de toxinas del tipo Shiga (STEC) en carne molida que se vende en Santiago. La importancia de este patógeno radica que es capaz de generar brotes y casos esporádicos de diarrea con y sin sangre, colitis hemorrágica y/o síndrome hemolítico urémico (SHU).

El estudio realizado determinó que, dentro de la carne molida que se expende en el Gran Santiago, un 9% está contaminada con STEC. Esta contaminación es independiente del lugar de expendio de la carne (supermercado o carnicerías). Si bien en este estudio no se aisló cepas de los serogrupos más frecuentemente involucrados en enfermedad humana, no se puede descartar el riesgo infección con STEC para la población que consume o manipula carne molida de vacuno, ya que algunas de las cepas obtenidas presentan factores de virulencia frecuentemente asociados a enfermedad. Por lo tanto, una caracterización más detallada podría ayudar a determinar el potencial patogénico de las cepas.

En conclusión, la carne molida ofrecida en Santiago es un vector de STEC, sin embargo, se requieren más estudios para determinar el potencial de patogenicidad que poseen estas cepas y el riesgo que representa la carne molida para la población.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**BAEZA, C.** 2013. Aislamiento y caracterización de cepas de *Escherichia coli* productor de Shiga toxina desde Carne de vacuno nacional e importada, distribuida en los principales supermercados de la provincia de Santiago. Tesis Magister en Salud Pública y Sistema de Salud. Santiago, Chile. Universidad Mayor. 77 pp.

**BAI, X.; WANG, H.; XIN, Y.; WEI, R.; TANG, X.; ZHAO, A.; SUNA, H.; ZHANG, W.; WANG, Y.; XU, Y.; ZHANG, Z., LI, Q.; XU, J.; XIONG, Y.** 2015. Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from retail raw meats in China. *Int J Food Microbiol.* 200: 31 - 38.

**BETTELHEIM, K.** 2007. The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*; Under-Rated Pathogens. *Crit Rev Microbiol.* 33: 67 - 87.

**BOLTON, D.** 2010. Verocytotoxigenic (Shiga Toxin-Producing) *Escherichia coli*: Virulence Factors and Pathogenicity in the Farm to Fork Paradigm. *Foodborne Pathog Dis* 0 (0): 1-10 pp.

**BORIE, C.; MONREAL, Z.; GUERRERO, P.; SANCHEZ, M.; MARTINEZ, J.; ARELLANO, C.; PRADO, V.** 1997. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Arch. Med. Vet.* 29 (2): 205 - 212.

**BOSILEVAC, J.; KOOHMARAIE, M.** 2011. Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* Isolated from Commercial Ground Beef in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 77 (6): 2103 – 2112.

**BRUSA, V.; ALIVERTI, V.; ALIVERTI, F.; ORTEGA, E.; DE LA TORRE, J.; LINARES, L.; SANZ, M.; ETCHEVERRÍA, A.; PADOLA N.; GALLI, L.; PERAL, P.; COPEL, J.; LEOTTA, G.** 2013. Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol.* 2. 6 pp.

**CEBULA, TA.** 1995. 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.* 33 (1): 248 - 250.

- CHEN, J.; GRIFFITHS, M.W.** 1998. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Lett Appl Microbiol.* 27: 369 - 371.
- ERICKSON, M.; DOYLE, M.** 2007. Food as a vehicle for transmission of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J FoodProt.* 70 (10): 2426 - 2449.
- ETCHEVERRÍA, A.; PADOLA, N.; SANZ, M.; POLIFRONI, R.; KRÜGER, A.; PASSUCCI, J.; RODRÍGUEZ, E.; TARABORELLI, A.; BALLERIO, M.; PARMA, A.** 2010. Occurrence of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Sci.* 86: 418 - 421.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO).** 2011. Boletín de enfermedades transfronterizas de los animales. [En línea]. <<http://www.fao.org/docrep/015/i2530s/i2530s00.pdf>> [Consulta: 30 - 09 - 2016].
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO).** 2017. Prevención de la *E. coli* en los alimentos. [En línea]. <[http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/agns/pdf/Preventing\\_Ecoli\\_es.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf)> [Consulta: 30 - 03 - 2017].
- FRATAMICO, P.M.; STROBAUGH, T.P.** 1998. Simultaneous detection of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 21: 92 - 98.
- FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS).** 2001. Risk Assessment of the Public Health Impact of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef [En línea]. <<http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/00-023N/00-023NReport.pdf>> [Consulta: 14 - 09- 2016].
- GÓMEZ, D.; MILIWEBSKY, E.; FERNANDEZ, C.; BASCHKIER, A.; MANFREDI, E.; ZOTTA, M.; NARIO, F.; PIQUÍN, A.; SANZ, M.; ETCHEVERRÍA, A.; PADOLA, N.; PARMA, A.; RIVAS, M.** 2002. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en hamburguesas supercongeladas y quesos de pasta blanda. *Rev Argent Microbiol.* 34: 66 - 71.

**HORMAZABAL, J.** 2011. *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga. Escenario en Chile. [diapositivas]. Santiago, Chile. ISP.

**INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP).** 2012. Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de toxina Shiga. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile [En línea], <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/Bolet%C3%ADn%20E.coli%2026-%2006-%202012.pdf>> [Consulta: 10 – 08 – 2016].

**INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP).** 2017. Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de Toxina Shiga. Chile. 2010 – 2016. Boletín Instituto de Salud Pública de Chile [En línea], <<http://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSTEC-14082017B.pdf>> [Consulta: 10 – 01- 2018].

**JU, W.; SHEN, J.; LI, Y.; TORO, M.; ZHAO, S.; AYERS, S.; NAJJAR, M.** 2012. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail ground beef and pork in the Washington D.C. area. Food Microbiol 32: 371 - 377.

**KARMALI, M.; GANNON, V.; SARGEANT, J;** 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). Vet Microbiol. 140: 360 - 370.

**LI, R.; TAN, X.; XIAO, J.; WANG, H.; LIU, Z.; ZHOU, M.; BI, W.; MIYAMOTO, T.** 2016. Molecular screening and characterization of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* in retail foods. Food Control. 60: 180 - 188.

**LORENZ, S.C.; SON, I.; MAOUNOUNEN - LAASRI, A.; LIN, A.; FISCHER, M.; KASE, J.A.** 2013. Prevalence of hemolysin genes and comparison of ehxA subtype patterns in shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and non-STEC strains from clinical, food, and animal sources. Appl. Environ. Microbiol. 79, 6301- 6311.

**MASANA, M.; D’ASTEK, B.; PALLADINO, P.; GALLI, L.; DEL CASTILLO, L.; CARBONARI, C.; LEOTTA, G.; VILACOBIA, E.; IRINO, K.; RIVAS, M.** 2011. Genotypic characterization of non-O157 shiga toxin–producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. J Food Prot.74 (12): 2008 - 2017.

**MARCHANT, P.** 2013. Detección de *Escherichia coli* patógena en mamíferos y aves acuáticas silvestres en cautiverio. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 29 pp.

- MATHUSA E.; CHEN Y.; ENCACHE E.; HONTS LL.** 2010. Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods. *J Food Prot.* 73 (9) 1721 – 1736.
- MEKATA, H.; IGUCHI, A.; KAWANO, K.; KIRINO, Y.; KOBAYASHI, I.; MISAWA, N.** 2014. Identification of O Serotypes, Genotypes, and Virulotypes of Shiga Toxin – Producing *Escherichia coli* Isolates, Including Non-O157 from Beef Cattle in Japan. *J Food Prot.* 77 (8): 1269 - 1274.
- MICCIO, L.; RUMI, M.; LLORENTE, P.; BENTANCOR, A.** 2011. Contaminación de carne molida con cepas de *Escherichia coli* shiga toxigénico (STEC) provenientes de comercios minoristas de San Martín, Buenos Aires, categorizados según nivel socioeconómico. *In Vet.*13 (1): 37 – 44.
- MORA, A.; LEÓN, S.; BLANCO. M.; BLANCO, J.; LÓPEZ, C.; DAHBI, G.; ECHEITA, A.; GONZÁLEZ, E.; BLANCO, J.** 2007. Phage types, virulence genes and PFGE profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from raw beef, soft cheese and vegetables in Lima (Peru). *Int J Food Microbiol.* 114: 204 – 210.
- MORATO, A.; SIMÕES, M.; IRINO, K.; TARDELLI, T.; CABILIO, B.** 2007. Prevalence and characteristics of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) strains in ground beef in são paulo, Brazil. *Braz J Microbiol.* 38: 553 – 556.
- NAVARRO, R.; MOREIRA, F.; MARTÍNEZ M.** 2017. Investigación de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en carne y derivados cárnicos. *Sanid. mil.* 73 (3): 147 – 152.
- OLEA, A.; DÍAZ, J.; FUENTES, R.; VAQUERO, A.; GARCIA, M.** 2012. Vigilancia de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos en Chile. *Rev Chilena Infectol.* 29 (5): 504 - 510.
- ORELLANA, I.; SALVADO, P.** 2017. Boletín epidemiológico trimestral. [En línea]. <[http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/04/BET\\_ETA\\_ABRIL\\_2017.pdf](http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2017/04/BET_ETA_ABRIL_2017.pdf)> [Consulta: 04 – 07 – 2017].
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2016. *E. coli*. Nota Descriptiva [En línea], <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>> [Consultado: 10-03-2016].

- OTEIZA, J. M.; CHINEN, I.; MILIWEBSKY, E.; RIVAS, M.** 2006. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (Morcillas). *Food Microbiol.* 23: 283 - 288.
- PARMA, A.; SANZ, M.; BLANCO, J.; BLANCO, J.; VIÑAS, M.; BLANCO, M.; PADOLA, N.; ETCHEVERRÍA, A.** 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol.* 16: 757 - 762.
- RISTORI, CH. ROWLANDS, R. MARTINS, C. BARBOSA, M. DOS SANTOS, L. JAKABI, M. FRANCO, M.** 2017. Assessment of Consumer Exposure to Salmonella spp., Campylobacter spp., and Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* in Meat Products at Retail in the City of Sao Paulo, Brazil. *Foodborne pathogens and disease.* 0 (0). 7 pp.
- STROMBERG, R.; LEWIS, L.; MARX, B.; MOXLEY, A.** 2015. Comparison of Enrichment Broths for Supporting Growth of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 71 (2): 214 - 219.
- THOMAS, M.; PEREZ, E.; MAJOWICZ, S.; REID, R.; OLEA, A.; DIAZ, J.; SOLARI, V.; MCEWEN, S.** 2008. Burden of acute gastrointestinal illness in the Metropolitan region, Chile, 2008. *Epidemiol Infect.* 139: 560 - 571.
- TORO, M.; NAJJAR, M. B.; JU, W.; BROWN, E.; ZHAO, S.; MENG, J.** 2013. Molecular Serogrouping of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Using Suspension Array. *Food borne Pathog Dis.* 10 (5): 478 - 480.
- VARELA, G.; CHINEN, I.; GADEA, P.; MILIWEBSKY, E.; MOTA, M.; GONZÁLEZ, S.; GONZÁLEZ, G.; GUGLIADA, M.; CARBONARI, C.; ALGORTA, G.; BERNADÁ, M.; SABELLI, R.; PARDO, L.; RIVAS, M.; SCHELOTTO, F.** 2008. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Rev Argent Microbiol.* 40: 93 – 100.
- VIDAL, R.; OÑATE, A.; SALAZAR, J.C.; PRADO, V.,** 2010. Shiga toxin producing *Escherichia coli* in Chile. *Pathogenic Escherichia coli in Latin América.* Bentham Science Publishers, United Arab Emirates, p. 264.

**VIVANCO, S.** 2011. Detección de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* productora de Shigatoxina aislada de bovinos. Tesis para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile. 58 pp.

**WINN, W.; STEPHEN, A.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRENCKENBERGER, P.; WOODS, G.** 2008. Koneman, Diagnostico Microbiológico. 6° Edición. Editorial Medica Panamerica. Buenos Aires, Argentina.

**XIA, X.; MENG, J.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; BLICKENSTAFF, K.; TRAN, T.; ABBOTT, J.; ZHENG, J.; ZHAO, S.** 2010. Presence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Other Potentially Diarrheogenic *E. coli* Strains in Retail Meats. *Appl Environ Microbiol.* March 15, 76 (6): 1709-1717.