



**Universidad Nacional del Nordeste
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura**

CARRERA DE POSGRADO

“ESPECIALIZACION EN ANALISIS DE ALIMENTOS”

INFORME FINAL

*Puesta a punto de una técnica de PCR para la detección
de Escherichia coli O157:H7 y la presencia de sus toxinas Stx1-Stx2.*

ALUMNA: María C. Desimoni

DIRECTOR: Dr. Gonzalo Ojeda

AÑO: 2019

ÍNDICE DE TEMAS

1. INTRODUCCIÓN	Pag. 3 - 19
1.1 Investigación Epidemiológica	Pag. 4 - 7
1.2 Mecanismos Fisiopatológicos asociados a ETA por <i>E. coli</i>	Pag. 7 - 9
1.3 Fuentes de intoxicación alimentaria	Pag. 10 - 14
1.4 Métodos estandarizados para muestreo	Pag. 14 - 18
1.5 Detección de toxinas de <i>E. coli</i>	Pag. 18 - 19
2. MATERIALES y MÉTODOS	Pag. 20 - 21
3. RESULTADOS y DISCUSIÓN	Pag. 21 - 25
4. CONCLUSIÓN	Pag. 26
5. BIBLIOGRAFÍA	Pag. 27 - 28
ANEXO	Pag. 29 - 30

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAS) resultan del consumo de productos alimenticios que contengan patógenos como bacterias, virus, parásitos o alimentos contaminados por sustancias químicas venenosas o biotoxinas, y aunque la mayoría de los casos son leves y autolimitadas, los casos graves pueden ocurrir en grupos de alto riesgo (lactantes, niños menores de 5 años, ancianos y personas inmunocomprometidas) resultando en alta mortalidad y morbilidad (1).

La llegada de bacterias a los alimentos puede darse a partir de (2):

- el aire
- el suelo
- el agua de lavado
- la piel y/o las mucosas del animal faenado

y puede materializarse durante

- el transporte y/o almacenamiento
- el tratamiento del alimento en industrias
- la comercialización
- la preparación

En función de lo antes dicho, para considerar un alimento apto para su consumo deben tenerse en cuenta diferentes criterios, entre los que se encuentran los criterios microbiológicos (3): que definen la aceptabilidad de un proceso, producto o lote de alimentos basándose en la ausencia o presencia o el número de microorganismos y/o la investigación de sus toxinas por unidad de masa, volumen o área.

En Argentina, el Código Alimentario Argentino establece dos categorías principales en cuanto a los criterios microbiológicos (3):

- criterio obligatorio: se utiliza para referirse a los microorganismos considerados patógenos y/o sus marcadores, considerados de importancia en salud pública y de acuerdo con la clase de alimento.
- criterio complementario (recomendatorio): a diferencia del anterior es el criterio relativo a la evaluación del proceso tecnológico utilizado para la obtención de un producto.

La detección y/o recuento de microorganismos forman parte de los criterios microbiológicos y los métodos de laboratorio utilizados deben ser preestablecidos por los organismos de control (3).

En base a los criterios mencionados, los alimentos deben hallarse libres de *Escherichia coli* O157:H7/NM, ya que su presencia aun en bajos recuentos puede ocasionar enfermedad en personas susceptibles.

Un brote epidémico es una clasificación usada en la epidemiología para denominar la aparición repentina de una enfermedad debida a una infección en un lugar específico y en un momento determinado. El ejemplo más claro de esta situación es cuando se produce una intoxicación alimentaria provocando que aparezcan casos durante dos o tres días, según la OMS (4).

Cuando se detecta un brote de enfermedad transmitida por alimentos, los funcionarios reguladores de salud pública deben trabajar rápidamente para recolectar la mayor cantidad de información posible con el fin de encontrar su causa, de manera que puedan tomar medidas para evitar que más personas se enfermen.

1.1 Investigación epidemiológica

Durante una investigación se recolectan tres tipos de datos: epidemiológicos, de rastreo y de análisis de alimentos y del entorno. Estas actividades consisten en: recogida de información y propuesta de medidas de control iniciales, confirmación de la existencia del brote, en esta etapa se debe recoger toda la información posible entrevistando a todos los afectados.

Durante la etapa inicial de la investigación, se procederá a: contactar al personal asistencial para que dé su opinión, identificar los casos con nombre, apellidos, teléfono de contacto, domicilio, etc. Identificar posibles nuevos casos y a las posibles personas expuestas sanas, hacer encuestas epidemiológicas para identificar la fuente común de un brote.

Aunque esta área de trabajo es propia o específica del epidemiólogo, también la pueden realizar otros profesionales sanitarios dependiendo en cada momento de la situación del brote, y siempre bajo la coordinación del epidemiólogo responsable de la gestión del brote. Esta misma encuesta se utilizará para entrevistar a los controles si se

realizara un estudio caso-control, esto se debe realizar rápidamente, con indicación del número de afectados, número de expuestos o su estimación, manifestaciones clínicas, fecha de primeros síntomas, lugar de ocurrencia, alimentos ingeridos y lugar de preparación de los alimentos etc.

Para establecer inicialmente el posible origen o los posibles alimentos implicados se realizará un análisis de los datos obtenidos en base a (4):

1-Tiempo: Según al momento de presentación de los síntomas podemos dibujar la curva epidémica de presentación de casos sobre un eje de coordenadas, colocando en el eje de valor (Y) el número de afectados y en el de categorías (X) la unidad de tiempo a considerar, variando ésta en función del proceso que se trate, obteniendo información sobre el tipo de exposición (puntual o continuada) y las probables fechas de exposición en base al periodo de incubación.

2-Lugar: saber dónde y cómo ocurrió la distribución espacial de los afectados, identificación inicial del lugar o lugares.

3-Persona: es importante describir la afección en base a las diferentes variables de persona (género, edad, ocupación, etc.), además se deben recabar los datos sobre los alimentos consumidos y no consumidos, donde los consumió cada persona afectada y también las no afectadas, pues ello nos informa sobre el posible alimento implicado y la posible fuente de infección, además de poder clasificar a aquellas como expuestas o no.

4-Toma de muestras de alimentos: deben tomarse muestras de los alimentos sospechosos de ser fuente y/o mecanismo de transmisión lo antes posible, y deberán almacenarse debidamente refrigeradas en los Centros de Salud hasta su posterior envío a los laboratorios de salud pública, para este paso se cumplimentará el informe de la obtención de muestras alimentarias y/o ambientales en caso de brote de enfermedad transmitida por alimentos.

5-Inspección de establecimientos implicados: en el caso de estar implicados industrias o establecimientos públicos o de uso colectivo, el profesional asignado a la investigación epidemiológica (bioquímico, veterinario, licenciado, etc.) , inspeccionará el establecimiento implicado levantando acta de inspección del mismo con expresión de las posibles irregularidades detectadas que pudieran actuar como factores contribuyentes a la aparición del brote e indicación del plazo para su corrección; y procediendo a la recogida de **muestras reglamentarias** (tres muestras por cada alimento, que serán debidamente selladas) y con perito de parte, con expresión de hora y fecha.

Si no fuera posible la toma de las 3 muestras reglamentarias, se recogerán las muestras que se puedan. Todas las actuaciones se realizarán bajo la coordinación de la unidad responsable de la gestión del brote, informando a esta de los resultados que se vayan obteniendo de forma que pueda disponer de toda la información en "tiempo real".

Cuando los alimentos implicados sean productos comerciales, la unidad responsable de la gestión del brote informará de forma inmediata al Servicio de Epidemiología a fin de remitir la información a las unidades responsables de activar el sistema coordinado de intercambio rápido de información en alertas alimentarias nacional y de la trazabilidad del producto, aportando toda la información detallada de la que en ese momento se disponga, que permita identificar el producto utilizando el informe sobre productos industriales implicados en el brote de enfermedad transmitida por alimentos.

6-Toma de muestras orgánicas: se debe procurar la recolección de muestras orgánicas de los afectados que en cada caso proceda, según la sospecha clínica del brote, que sean de interés diagnóstico y remitirlas cuanto antes al laboratorio clínico habitual; específicamente, en casos de toxiinfección alimentaria, se recogerán muestras de heces para coprocultivos.

Para ello se cumplimentará el informe de obtención de muestras clínicas en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Las muestras para coprocultivos de los afectados deben tomarse antes de la administración de antibióticos y que se adjuntará a la petición del análisis de laboratorio, las mismas se deben recolectar en frasco

estéril, única deposición, conservar en heladera y remitir dentro de las 24 h al laboratorio de análisis.

La información recabada puede clasificarse en:

Datos epidemiológicos

- Un punto común de contaminación en la cadena de distribución identificado mediante la revisión de registros recolectados en restaurantes y tiendas donde las personas enfermas comieron o compraron alimentos.
- Hallazgos de las evaluaciones ambientales en establecimientos donde se producen alimentos, granjas y restaurantes, que identifican riesgos para la seguridad de los alimentos.

Datos de las pruebas de alimentos y del entorno

- Los microorganismos que causaron la enfermedad, encontrados en un alimento recolectado en la casa de la persona enferma, una tienda o el entorno donde se producen alimentos.
- La misma huella de ADN que vincula a microbios encontrados en alimentos o entornos de producción con microbios encontrados en las personas enfermas (5)

1.2 Mecanismos fisiopatológicos asociados a ETA por *E. coli* O157:H7/NM

Escherichia coli es parte de la flora del tracto intestinal del hombre y de los animales. Aunque la mayoría de las formas son inocuas algunas cepas pueden causar diarrea. Los aislamientos se diferencian serológicamente por los antígenos somáticos O, flagelar H, y capsular K y sus factores de virulencia (Figura 1) (6).

De acuerdo a los mecanismos fisiopatológicos, características fisiológicas y moleculares, se clasifican en 6 grupos:

- *E. coli* enteropatógena (EPEC)
- *E. coli* enterotoxigenica (ETEC)
- *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)
- *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

- *E. coli* productor de toxina Shiga o enterohemorrágica (STEC)
- *E. coli* de adherencia difusa (DAEC)

Escherichia coli O157 es una variedad enterohemorrágica que causa de intoxicación debido a la producción de verotoxinas (Stx) conocidas como toxinas Shiga por su similitud con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*. Estas toxinas se clasifican en Stx1 y Stx2, según la neutralización del efecto citotóxico en células, Vero o Hela con anticuerpos específicos o por la detección de genes por técnicas de biología molecular. Si bien los miembros de la familia Stx muestran similitudes en su estructura y función cada uno de los subtipos presenta grandes diferencias en su toxicidad (6).

Las toxinas Shiga (Stx) poseen estructura de subunidad A-B y están codificadas por bacteriófagos insertadas en el cromosoma bacteriano, la subunidad A es la parte biológicamente activa, y la B, es la que se une al receptor celular específico globotriaosilceramida (Gb3). La subunidad A es clivada en dos fragmentos A1 y A2, produciendo una serie de cambios que inhiben la síntesis proteica en el enterocito y el riñón es el órgano blanco por poseer Gb3 (globotriaosilceramida) (7).

Como complicación de la infección se puede desencadenar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (8). En nuestro país el agente etiológico más comúnmente asociado al SUH es *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), cuyo serotipo más frecuente es O157:H7, aunque hay más de 100 serotipos que poseen un potencial patogénico similar (8).

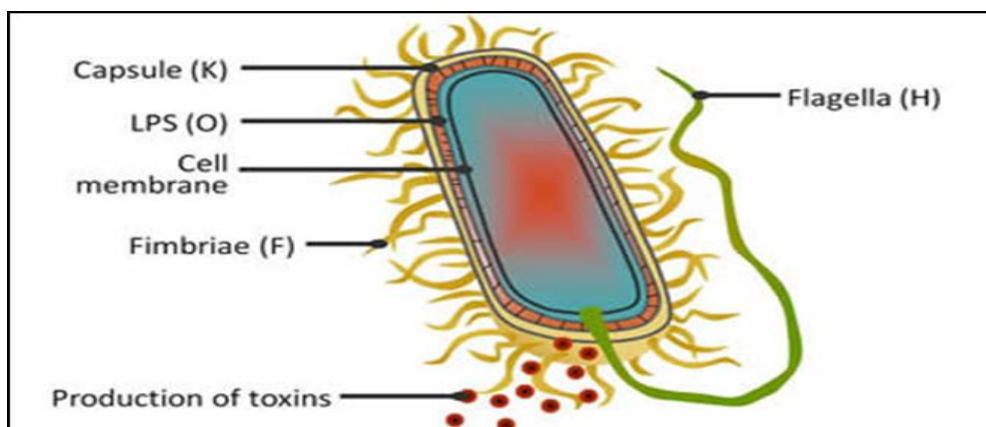


Figura N°1: Esquema general de estructuras antigénicas de *E coli* (Adaptado de <http://www.ecl-lab.com/en/ecoli/index.asp> - Ultimo acceso noviembre 2021).

Este serotipo (O157:H7) fue descrito por primera vez por Konowalchuk y col. en 1977 (9). Los rumiantes en general, y el ganado vacuno en particular, han sido señalados como los principales reservorios de STEC según estudios de prevalencia realizados en distintos países, incluyendo Argentina (9).

Son numerosos los brotes producidos por *E. coli* O157 en diversas partes del mundo, implicando diferentes tipos de alimentos, algunos de los más relevantes se muestran en la tabla del ANEXO N°1 (10).

Las toxinas son moléculas que alteran el metabolismo, la fisiología o estructura de la célula huésped. Pueden ser estructurales Endotoxinas o secretadas Exotoxinas. Generalmente el modo de acción es enzimático. Por ejemplo, la STEC (*Escherichia coli* productor de toxina shiga), coloniza el intestino del huésped con la liberación de las toxinas (STX1 y STX 2) y del lipopolisacarido (Figura 1).

La STX se libera al torrente circulatorio donde se une a las células blanco a través de la subunidad B que se liga al receptor Gb 3 (Figura 2).

La mayoría de las toxinas actúan en conjunto y producen su efecto fisiopatológico a través de la acción propia de la toxina o en conjunto con enzimas extracelulares.

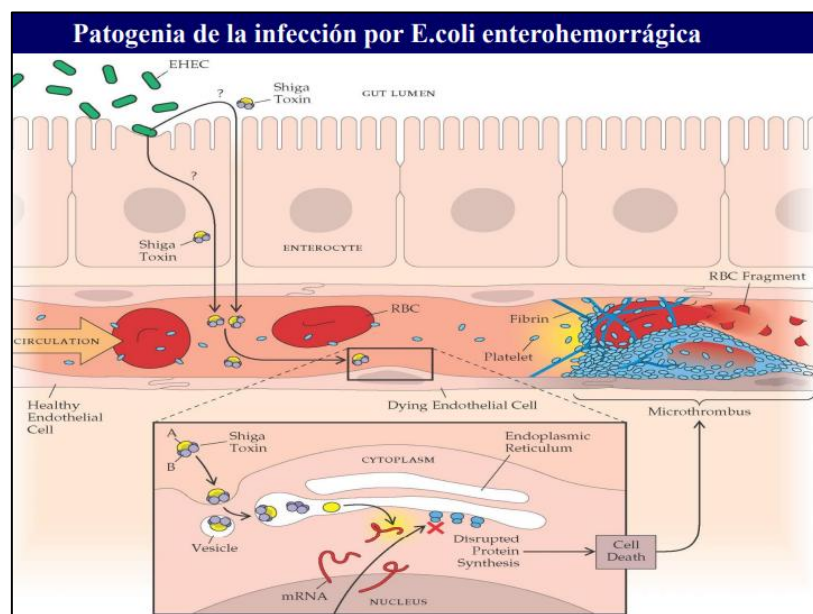


Figura N°2: Patogenia de la infección por *E. coli* enterohemorrágica. Fuente: Vallés FCM, UN Cuyo SUH-JORNADAS-EPIDEMIOLOGIA(2015).

1.3 Fuentes de contaminación alimentaria

Los animales excretan microorganismos en sus heces, es por ello que la contaminación fecal del agua y la diseminación de las bacterias contaminantes durante la faena se han señalado como fuentes importantes de infección (11).

Dependiendo de la naturaleza del alimento (vegetal, animal, granos, etc.) los mecanismos implicados en su contaminación pueden diferir (11).

Plantas y vegetales, las superficies expuestas de las plantas se contaminan por el suelo, el agua, las aguas residuales, el aire, por microorganismos que forman parte de la flora. Siempre que se den las condiciones apropiadas para el crecimiento, por ejemplo, temperaturas elevadas, aumentan en número, sobre todo después de la recolección. Se ha comprobado que algunas frutas albergan en su interior microorganismos viables. En tomates normales sanos se han encontrado *Pseudomonas*, coliformes, *Achromobacter*, *Micrococcus* y *Corynebacterium*, habiéndose encontrado levaduras en el interior de las frutas intactas (12).

Alimentos de origen animal: Los microorganismos de origen animal proceden de su flora superficial, de la flora de sus vías respiratorias y de la flora de su tubo gastrointestinal. La flora microbiana propia de la superficie corporal de los animales productores de carne no suele tener tanta importancia como los microorganismos contaminantes del tubo intestinal y de las vías respiratorias. Sin embargo, la piel, las pezuñas y el pelo, no sólo contienen una gran cantidad de microorganismos procedentes del suelo, del estiércol, etc. La piel de muchos animales productores de carne puede contener micrococcos, estafilococos y estreptococos beta-hemolíticos. Las heces y los alimentos de origen animal contaminados por las mismas pueden contener diversos microorganismos entéricos, incluso del género *Salmonella*.

Algunos de los agentes que producen enfermedades infecciosas en los animales pueden ser transmitidos a las personas por los alimentos.

Contaminación por aguas residuales: cuando en el riego de los cultivos se utilizan aguas residuales domésticas sin tratar, estas pueden estar contaminados por microorganismos patógenos para el hombre, sobre todo por aquéllos que producen trastornos gastrointestinales, como por ejemplo bacterias coliformes, bacterias anaerobias, otras bacterias intestinales y virus. Las aguas residuales tratadas que van a

parar al suelo o al agua también aportan microorganismos, aunque, en comparación con las aguas residuales no tratadas, deben contener una menor cantidad total de microorganismos y un menor número de patógenos.

Contaminación por el suelo: El suelo contiene la mayor variedad de microorganismos procedentes de todas las fuentes de contaminación. En los suelos fértiles, no sólo existen gran número de especies de microorganismos, sino que también existe un elevado número total de los mismos, dispuestos a contaminar la superficie de las plantas que crecen sobre él o en su interior y la superficie de los animales que se desplazan sobre la tierra firme. El polvo del suelo es levantado por las corrientes de aire, y las partículas de tierra son arrastradas por las corrientes de agua para alcanzar el interior o la superficie de los alimentos. El suelo es una importante fuente de bacterias esporógenas termorresistentes. Son especialmente importantes algunos mohos y levaduras y algunas especies de los géneros bacterianos *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Flavo-bacterium*, *Chromobacterium*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Aceto-bacter*.

Contaminación por el aire: La contaminación de los alimentos por el aire puede tener importancia tanto por razones higiénicas como por razones económicas. Los microorganismos patógenos, en especial los que producen infecciones respiratorias, pueden ser transmitidos a los alimentos, por ejemplo, las esporas de mohos del aire pueden representar un inconveniente en el queso, en la carne, en la leche condensada azucarada, en el pan en rebanadas etc.

Contaminación de la carne: Se ha indicado que la masa muscular interna de las carnes contiene pocos microorganismos o no los contiene en absoluto, aunque se han encontrado en los ganglios linfáticos, en médula ósea, e incluso en la propia masa muscular. En los ganglios linfáticos de los animales de carne roja se han aislado estafilococos, estreptococos, y especies bacterianas pertenecientes a los géneros *Clostridium* y *Salmonella*. Las prácticas corrientes de sacrificio eliminarían los ganglios linfáticos de las partes comestibles. No obstante, la contaminación importante se debe a causas externas durante las operaciones de sangría, manipulación y preparación de la canal. Los microorganismos proceden principalmente del exterior del animal (piel, pezuñas y pelo) y del tubo intestinal de éste. Los sistemas de sacrificio (mecánico, químico y eléctrico) autorizados recientemente, influyen poco en la contaminación de

la carne, aunque todos ellos van seguidos del degüello y de la sangría del animal, operaciones que pueden aportar microorganismos contaminantes.

Las operaciones posteriores de manipulación de la carne, la contaminación puede tener su origen en las carretillas, en las cajas y en otros recipientes que se utilizan para el transporte de la carne; en otra carne contaminada; en el aire; y en el personal. Es especialmente perjudicial la contaminación de la carne con bacterias psicótrofas de cualquier procedencia, por ejemplo, de otras carnes que han estado almacenadas bajo refrigeración. El equipo especializado, como son las picadoras, las embutidoras y empaquetadoras, y los ingredientes que se emplean para elaborar determinados productos cárnicos, por ejemplo, tripas y especias, es posible que aporten importantes cantidades de microorganismos perjudiciales.

Como consecuencia de las distintas procedencias de los microorganismos, son muchas las especies microbianas que es probable que contaminen las carnes (Tabla 1). Los mohos de muchos géneros pueden llegar a la superficie de las carnes y crecer allí. Tienen especial importancia las especies de los géneros *Cladosporium*, *Sporotrichum*, *Geotrichum*, *Thamnidium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Alternaria* y *Monilia*. En la carne se suelen encontrar levaduras, principalmente asporógenas. Se han encontrado bacterias pertenecientes a muy distintos géneros, siendo los más importantes *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, etc. (13). Las medidas preventivas para controlar la contaminación de los alimentos por *E. coli* O157 y su transmisión son: mantener la limpieza, separar alimentos crudos y cocinados, cocinar completamente los alimentos, mantener los alimentos a temperaturas seguras y usar agua y materias primas seguras (14).

Tabla N°1: Relación de productos cárnicos con los microorganismos aislados/encontrados en ellas.

Producto	Microorganismos
Carne fresca y refrigerada	<p>Bacterias <i>Acinetobacter, Moraxella, Pseudomonas, Aeromonas, Alcaligenes y Micrococcus</i></p> <p>Mohos <i>Cladosporium, Geotrichum, Sporotrichum, Mucor y Thamnidium</i></p> <p>Levaduras <i>Cándida, Torulopsis, Debaryomyces, y Rhodotorula</i></p>
Carnes tratadas carnes tratadas y curadas	<p>Bacterias <i>Lactobacillus y otras bacterias lácticas, Acinetobacter, Bacillus, Micrococcus, Serratia y Staphylococcus</i></p> <p>Mohos <i>Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, y Thamnidium</i></p> <p>Levaduras <i>Aspergillus Penicillium, Rhizopus, y Thamnidium</i></p>

Fuente: Estrategias para la detección de *Escherichia coli* O157: H7 en alimentos Deisingh & Thompson (2004).

Según los artículos 156 tris, 255 y 302 del Código Alimentario Argentino y sus modificaciones, "... los productos preparados a base de carne picada, tales como chacinados frescos embutidos o no embutidos, y otras preparaciones a base de carne picada (albóndigas, empanadas, paste-les, arrollados o similares) pre cocidas o no, una vez cocidos y listos para consumir, ya sea que se dispensen inmediatamente después de finalizada la cocción, en el establecimiento elaborador o sean enviados a domicilio, deberán responder a las siguientes especificaciones microbiológicas.." : (15)

Tabla N°2: Criterios obligatorio establecido en el CAA y su interpretación. Artículos 156 tris, 255 y 302 del Código Alimentario Argentino y sus modificaciones.

Determinación	Resultado	Método de análisis
<i>Escherichia coli</i> O157:H7/NM	n=5 c=0 Ausencia/65g	USDA-FSIS Guía de Laboratorio de Microbiología. Capítulo 5 - Detección, aislamiento e identificación de <i>E. coli</i> O157:H7/NM en productos cárnicos o equivalente.

(n = tamaño de la muestra) y (c= número de aceptación)

A fin de prevenir consecuencias indeseadas en la cadena de producción de alimentos cárnicos, es necesario aplicar un sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP) (16).

El sistema HACCP es un enfoque científico para tratar el control del proceso. Los riesgos o peligros a considerar incluyen la contaminación biológica, química o física de los productos alimenticios. Se denomina punto crítico de control a un punto, paso o procedimiento en un proceso alimentario en el que se puede aplicar control y, que, como resultado de éste, se pueda prevenir, eliminar, o reducir a niveles aceptables, un riesgo a la inocuidad de los alimentos. Para los controles se establece un límite crítico, que es el valor máximo o mínimo hasta donde un riesgo físico, biológico o químico tiene que ser controlado en un punto crítico de control para prevenir, eliminar, o reducir a un nivel aceptable, el surgimiento del riesgo identificado a la inocuidad de los alimentos (17).

1.4 Métodos estandarizados para el muestreo

La elección del método a utilizar debe privilegiar a aquellos métodos estandarizados y de alta sensibilidad que hayan sido validados por organismos internacionales/nacionales de referencia (18).

El muestreo es una herramienta de la investigación científica, cuya función básica es determinar qué parte de una población debe examinarse, con la finalidad de hacer inferencias sobre dicha población. Cualquier conjunto de objetos o eventos individuales infinitos o finitos forman una población. La población, es una colección de datos que atañen a las características de un grupo de individuos u objetos.

Por eso, en lugar de examinar el grupo entero de la población, se examina una parte del grupo llamada muestra. El número, tamaño y naturaleza de las muestras que se toman para analizar influye enormemente sobre los resultados (18).

Podemos decir entonces que para sacar conclusiones acerca de la aceptación de la calidad del producto se hace necesario extraer muestras y evaluarlas. A este proceso se lo denomina plan de muestreo. El propósito del muestreo es realizar una medición aleatoria de las características de calidad, composición o lo que contemplan propiedades relacionadas con la inocuidad para determinar si el lote de producto se

acepta o se rechaza. Los planes de muestreo están representados en forma de tablas y se basan en el principio estadístico de que todas las unidades o porciones del material o alimento a evaluar tienen la misma probabilidad de ser tomadas de forma tal que la muestra obtenida es lo más representativa posible.

Existen distintos planes de muestreo dependiendo de la característica a evaluar:

- Aquellos que contemplan defectos del producto: características que pueden expresarse mediante dos posibilidades excluyentes, tales como apto/no apto, sí/no, íntegro/no íntegro, deteriorado/no deteriorado.
- Aquellos que contemplan las características de composición: características químicas que pueden expresarse mediante variables continuas. El estudio de la relación que existe entre una muestra de una población y la población de origen se llama TEORIA DEL MUESTREO. Entonces en vez de estudiar toda la población se estudia una porción de la misma llamada muestra.

Tomando por ejemplo el caso de la carne para búsqueda de *E coli* O157 podemos partir de 6,5 g, tamaño del lote (N) 4.800 o menos, el tamaño de la muestra (n) 6 y el número de aceptación ($c = 1$), una vez decidido el número de muestras que hay que tomar tablas de referencia como la que se presenta en Tabla 3. (19)

Tabla 3: Tabla para la selección del tamaño de muestra (n) y número de aceptación (c). Para un plan de muestreo con peso neto igual o inferior a 1 kg.

Tamaño del lote (N)	Tamaño de la muestra (n)	Número de aceptación (c)
4800 o menos	6	1
4801 - 24000	13	2
24001 - 48.000	21	3
48001 - 84000	29	4
84001 - 144000	38	5
144001 - 240000	48	6
Más de 240000	60	7

Fuente: <https://www.areasaludbadajoz.com>

La decisión de la toma de muestra debe encontrarse fundamentada en lo observado durante la inspección, y los motivos que nos pueden llevar a la misma son: evaluación de características visuales (defectos visuales, tales como pérdida de color, error de clasificación, materias extrañas, etc.), evaluación de la composición (contenido de humedad, el % de Materia Grasa) y evaluación de la inocuidad del producto (por ej. en la evaluación del deterioro microbiológico, los peligros microbiológicos, los contaminantes químicos tales como plaguicidas, micotoxinas, etc.).

La representatividad queda establecida en virtud de los métodos estadísticos aplicados para el muestreo.

Es importante tener presente cual será el destino de las muestras, que tipo de análisis se realizarán, el tiempo de demora hasta el proceso, condiciones pre-analíticas relacionadas a la metodología, etc. Solo el aseguramiento de una toma de muestra idónea y pertinente asegurará la disminución de errores y confiabilidad en los resultados obtenidos.

Es importante indicar en el acta de inspección los datos pertinentes que pudieran afectar la prueba o el significado del resultado, a fin de que el laboratorio lo tome en consideración.

Requisitos legales: la recolección de las muestras debe realizarse conforme al artículo 14 del anexo II del Código Alimentario Argentino. “Se tomará original, duplicado y triplicado. Debe existir ‘identidad’ entre cada una de las muestras en cuanto a su origen: mismo producto, contenido del envase, fecha de elaboración/ vencimiento y número de lote. Se deberá dejar constancia en un acta de los detalles del producto muestreado y especificar las condiciones en las que se encontraba el producto al momento de la recolección.”

Antes de decidir el plan de muestreo es importante tener presente algunas recomendaciones y puntos clave para llevarlo adelante con éxito. Uno de ellos es el marco normativo. El CAA establece criterios para el muestreo de algunos productos y es por ello que no se deben pasar por alto y deben respetarse.

En aquellos casos en los que no hay un plan de muestreo explícito en el CAA y si el muestreo va a realizarse en bocas de expendio, en el art. 1416 del Capítulo XXI del CAA se encuentran especificaciones que aplican para la toma de muestra única.

1.4.1 Programa de muestreo

Como primer paso es recomendable que los establecimientos elaboradores de alimentos cuenten con un Programa de muestreo para la verificación de la eficiencia y eficacia de sus buenas prácticas de manufactura (BPM). Este deberá establecer los siguientes puntos:

Plan de muestreo: establece el tamaño de muestra y el criterio de evaluación. La elección depende del material a analizar y de la categoría de la característica de calidad a observar o medir.

Método de muestreo: hace que una muestra sea representativa del lote o, bien, que sea lo más representativa posible.

Elementos de Muestreo: constituyen los instrumentos de extracción. Existiendo elementos diseñados para cada tipo de producto. Por ejemplo, para productos líquidos se cuenta con pipetas, frascos, botellas; para productos sólidos: cucharas, caladores, etc.

Preparación de la muestra: este se da en algunos casos ya que establece el procedimiento de preparación de la muestra global para llegar a obtener la muestra para el laboratorio. Por ejemplo, la técnica de cuarteo que alude a dividir en cuartos.

Conservación de la muestra: este punto es muy importante, debido a que se deben considerar las características y la composición de la muestra. Por ejemplo, en caso de alimentos perecederos, es fundamental que existan heladeras para transportar las muestras en las mismas condiciones que se requieren para su conservación.

Formalización del muestreo: en esta etapa se oficializa el proceso de toma de muestra, mediante un Acta de Toma de Muestra donde se identifican las muestras, la cantidad tomada, las condiciones de conservación, etc. (20).

1.4.2 Vigilancia de prácticas de establecimientos

En el marco de la auditoría y también como actividad de vigilancia de inocuidad de alimentos, la toma de muestra oficial es una herramienta clave para conocer en más detalle qué está pasando con aquellos peligros que “no podemos ver”, ya sean microbiológicos, químicos o físicos, que pudieran causar un daño a la salud del

consumidor. Por lo tanto, la inspección de alimentos utilizando planes de muestreo busca la definición de un criterio para decidir si un lote o lotes de producto cumple o no, con un requisito de calidad y/o higiénico sanitario establecido. Para que la decisión tomada de la evaluación sea significativa y confiable, se necesita obtener una muestra representativa del lote evaluado y además cerciorar que la integridad de la misma sea asegurada hasta el momento de ser analizada (20).

1.5 Detección de toxinas de *E. coli* O157

Debido a que los diferentes tipos patogénicos de *E. coli* no siempre pueden diferenciarse mediante pruebas bioquímicas o características culturales, es indispensable contar con métodos de detección y tipificación moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa para caracterizar los determinantes de patogenicidad de este grupo en especial (17).

En los últimos años ha habido avances significativos en el desarrollo de nuevas tecnologías para la detección y la separación de microorganismos de los alimentos (Tabla 4). El desarrollo de técnicas moleculares (PCR) e inmunológicas (ELISA) brinda ventajas sobre los métodos tradicionales, específicamente en lo que refiere a velocidad, especificidad y sensibilidad (21).

Se han desarrollado sistemas de detección inmunológica lo que reduce significativamente el tiempo de análisis. Estos métodos incluyen pruebas de aglutinación de látex, ELISA, ensayos de inmunotransferencia de colonias, técnicas de filtro de inmunofluorescencia directa y técnicas de inmunocaptura. En estos métodos se utilizan anticuerpos policlonales y monoclonales específicas para los antígenos O y H (21). La separación inmunomagnética, después del enriquecimiento y del cultivo de las células concentradas en agar CT-SMAC, parece ser el método más sensible y rentable para el aislamiento de *E. coli* O157 de alimentos crudos pero su costo es muy elevado y se necesita confirmar la identidad de los desarrollos bacterianos mediante técnicas moleculares (21).

Tabla N°4: Métodos de detección más comunes, ventajas y desventajas.

METODOS	VENTAJAS	DESVENTAJAS
PCR	Detecta STX1/STX2 Sugerido en el CAA Sensible y específico. Tiempo aprox. 24 h	Alta complejidad Costo inicial elevado Detecta ADN de bacterias muertas.
ELISA	Método muy sensible y específico.	Tiempo aprox. 12 h a 2 días
INMUNOCROMATOGRAFIA	Sensible, específico y rápido Directo de la muestra sin cultivo ni enriquecimiento	Interferentes, estandarización para matrices complejas
CULTIVO , ENSAYOS BIOQUIMICOS, CALDOS DE ENRIQUECIMIENTO	Complementa el estudio molecular. Identifica género y especie.	Baja complejidad, no detecta STX1/STX2. Tiempo aprox. 48 a 72 h.
LATEX	Rápido Detectan antígenos y anticuerpos	Poco sensible y específico
INMUNOCAPTURA	Concentra las bacterias Buena sensibilidad	Costo elevado Hay que confirmar con métodos moleculares

Fuente: Estrategias para la detección de *Escherichia coli* O157: H7 en alimentos Deisingh & Thompson (2004).

Considerando la amplia variedad de técnicas disponibles, resulta necesario seleccionar pruebas que se ajusten a los requerimientos legales / epidemiológicos de los estudios solicitados. En este sentido, una estrategia práctica podría implicar la selección de técnicas económicas, rápidas y sensibles para pruebas de *screening* y posteriormente aplicar técnicas específicas (y en general más costosas) que permitan confirmar los casos de estudio.

2. OBJETIVO

Diseñar un protocolo de análisis de productos cárnicos, utilizando métodos biológicos enfocados a la *E. coli* O157:H7.

3. MATERIALES Y METODOS

Se trabajó con cepas de referencia provistas por el Instituto Nacional de Microbiología ANLIS “Dr. Carlos G. Malbran”: *E. coli* EDL933 stx1/stx2/rfbO157 (control positivo) y *E. coli* ATCC 25922 (control negativo).

Las cepas fueron sembradas Agar MacConkey sorbitol (SMAC) y CHROMagar O157 para comprobar su pureza y controlar los medios de cultivo utilizados. Las placas se incubaron en estufa a 35°C (+/-1°C) durante 24 h.

Para extracción de ADN se seleccionaron 3 a 5 colonias utilizando el criterio visual (Figura 3), estas se suspendieron en 150 µl de Buffer Tritón X-100 al 1% en buffer TE 1X. Se las sometió a 100°C durante 15 minutos en baño de agua.

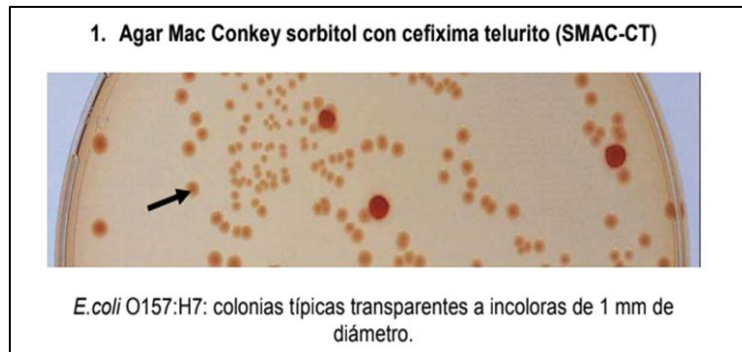


Figura N°3: Criterio visual para la selección de colonias para estudios de biología molecular. Muestras sembradas en SMAC-CT – incubadas 24-48 horas a 37°C. Se seleccionan colonias transparentes (flecha negra). Fuente: Manual de Procedimientos-Detección de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos (2011) - INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán.

La suspensión se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos y se conservó el sobrenadante conteniendo el extracto de ADN a 4°C para ser utilizado como templado en la PCR. Para la PCR se siguió el protocolo establecido por el Laboratorio Nacional de Referencia (16).

Para la PCR múltiple que permite detectar los genes stx1, stx2, y rfbO157, se utilizaron tres pares de oligonucleótidos iniciadores que amplifican un fragmento del gen correspondiente a la subunidad B de stx1, un fragmento del gen correspondiente a la subunidad A de stx2 y un fragmento del gen rfbO157 correspondiente al LPS O157 (Tabla 5).

Tabla N°5: Secuencia vs tamaño del fragmento

Primer	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño del fragmento (pb)
stx1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130
stx1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA	
stx2a	TTAACCACACCCACCGGGCAGT	346
stx2b	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	
O157F	CGGACATCCATGTGATATGG	259
O157R	TTGCCTATGTACAGCTAATCC	

Fuente: Manual de Procedimientos- Detección de *Escherichia coli* productor de Toxina Shiga O157 y no-O157 en alimentos (2011) - INEI-ANLIS Carlos G. Malbrán.

La mezcla de reacción se constituyó de: 1X de buffer, 0,1Mm de mezcla de dNTPs, 1,5 mM de Cl₂Mg, 2 pmol/μl de stx1a, 2 pmol/μl de stx1b, 0,4 pmol/μl de stx2a, 0,4 pmol/μl de stx2b, 0,8 pmol/μl de O157F, 0,8 pmol/μl de O157R, 0,02 U/μl de Taq polimerasa y 2 μl de templado, y agua destilada calidad molecular en cantidad suficiente para un volumen final de 50 μl.

Para la amplificación se realizó una etapa de desnaturalización de 5 min a 94°C, 29 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, annealing de 30 seg a 58°C y extensión a 72°C durante 30 seg con una extensión final de 2 min a 72°C.

La visualización de los amplicones se realizó luego de una electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TAE a 75V, posterior tinción con colorante intercalante GelRed y observación en transiluminador de luz UV.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Luego de ajustar las condiciones de reacción al equipamiento y reactivos con los que se disponía en el lugar de trabajo, se consiguió poner a punto el protocolo recomendado para la detección simultánea de los genes que codifican para el antígeno O157 y ambos tipos de toxina Shiga (Stxa y Stxb), tal como se muestra en la siguiente figura:

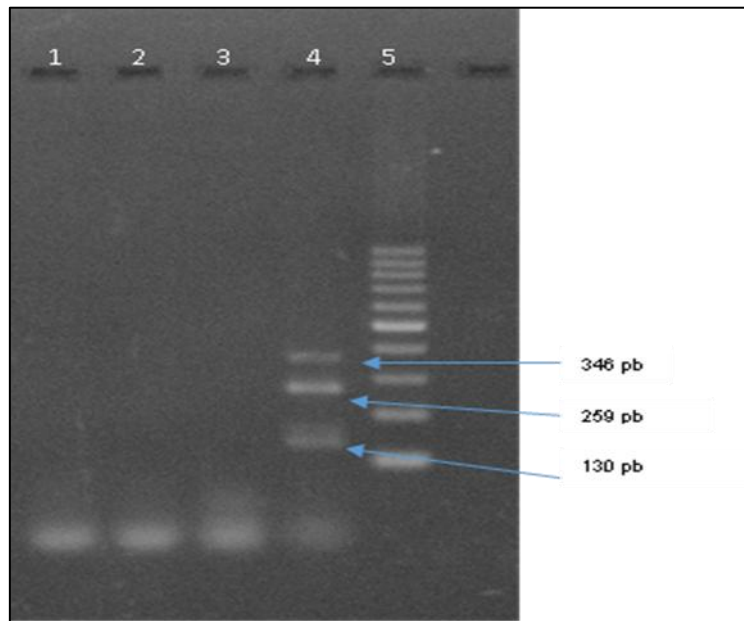


Figura 4: vista con transiluminador del resultado de la corrida electroforética.

En las calles 1 y 2 se sembraron los amplicones provenientes de *E. coli* sin factores de virulencia, en la calle 3 se sembró el blanco de reactivos sin templado de ADN, en la calle 4 se sembró el producto de amplificación de la cepa productora de toxinas y en la calle 5 se colocó el marcador de peso molecular de 100 pb.

Debido a que, como se mencionó en la introducción, no es posible diferenciar los diferentes tipos patogénicos de *E. coli* mediante características fenotípicas, es necesario la aplicación de métodos moleculares para su correcta tipificación.

Aunque en el Código Alimentario Argentino se indica la detección de *E. coli* O157, no todos los aislamientos de este serotipo poseen toxinas Shiga y a la inversa, diferentes serotipos pueden ser productores de verotoxinas.

Por lo mencionado, a pesar de que *E. coli* O157:H7 es el serotipo más frecuentemente encontrado en diversas partes del mundo, en nuestro país solamente el 50% de los

casos de síndrome urémico hemolítico (SUH) corresponden al serotipo O157:H7, aislándose del resto de los pacientes diferentes cepas no-O157:H7 (22).

En la ciudad de Corrientes (Argentina), Cicuta y col. hallaron en una muestra de carne molida un aislamiento de *E. coli* STEC O174:H21 productor de stx2 (17).

En Uruguay, estudiando aislamientos de alimentos, detectaron cepas de *E. coli* O157:H7 pero ninguna poseía los genes que codifican para stx1/2; sin embargo, en heces de niños con SUH detectaron aislamientos de *E. coli* no-O157 productores de stx1/2 (23).

Consideramos que la única manera de minimizar los casos de SUH y de todas aquellas patologías producidas *E. coli* O157 productores de toxina Shiga en la población pasa por la aplicación de las medidas educativas y preventivas en los distintos ámbitos que estén involucrados con la producción y consumo de productos cárnicos.

La presencia de cualquier tipo patogénico de *E. coli* en la carne molida no produce alteraciones en el color, olor o sabor del alimento, que puedan ser detectados por los productores, vendedores y/o consumidores (23).

Por lo antedicho, resulta de gran importancia la implementación de un Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (Hazard Analysis and Critical Control Point System - HA-CCP) desde el sitio de faena hasta el punto de venta (11).

En el sitio de faena es importante conocer el grado de colonización de los animales ya que una vez colonizado un animal puede arrojar diversas concentraciones de estos organismos en las heces y se considera que el ganado que alcanza un estado de excreción fecal de *E. coli* O157: H7 de 10⁴ UFC/gramo o mayor sea denominado como superdiseminador (23). Por ello es sumamente importante la higiene en este punto, evitando, en lo posible, el contacto de la carne con las heces.

Una vez en el punto de venta, resulta indispensable guardar las buenas prácticas en la manipulación de la carne, tanto en el momento de la molienda como durante su mantenimiento en góndolas o exhibidores, ya que a temperatura ambiente se puede producir la proliferación de los patógenos (11).

En la Figura 5, se presenta una propuesta de esquema de trabajo para la detección de toxinas de *E coli* O157 a partir de productos cárnicos.

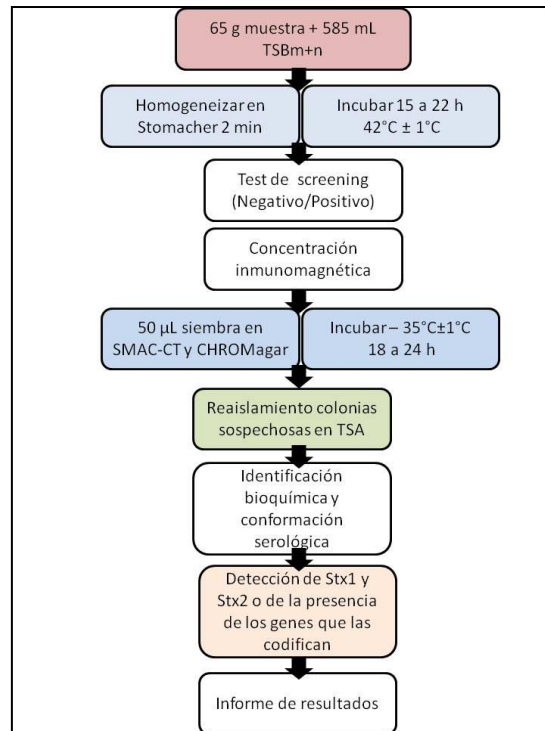


Figura N° 5. Esquema de trabajo propuesto para la detección de E coli. O157:H7 en muestras de productos cárnicos.

A nivel del consumo, tanto en el hogar como en los puntos de comercialización de alimentos procesados, deben aplicarse los puntos sugeridos por la OMS para prevenir y controlar la transmisión de patógenos relacionados con alimentos: mantener la limpieza, separar alimentos crudos y cocinados, cocinar completamente, mantener los alimentos a temperaturas se-guras y usar agua y materias primas seguras (11).

Para la detección de estos patógenos tanto en el alimento crudo como en muestras provenientes de pacientes, la combinación de EIA (enzimoinmunoensayos) y cultivos de placa selectiva con el enriquecimiento de *E. coli* O157 es relativamente simple y económica y puede fusionarse fácilmente con los protocolos de prueba de alimentos actuales y estos protocolos son útiles para la evaluación en la granja cuando se considera que los sistemas de PCR o de separación inmunomagnética no son factibles o no están disponibles (21).

Ante la aparición de casos de una presunta enfermedad de transmisión alimentaria (ETA), se hace indispensable la aplicación de métodos rápidos, sensibles y específicos que aseguren un diagnóstico precoz cuando se estudian muestras humanas a fin de establecer un alerta sanitario.

En este contexto, consideramos muy importante realizar el aislamiento y su posterior caracterización para definir su potencialidad como patógenos, y debido a que la serotipificación no es suficiente para definir a un aislamiento como potencialmente patógeno, se necesita completar la caracterización mediante la identificación de los factores de virulencia asociados con STEC conocidos en la actualidad.

5. CONCLUSIÓN

Se logró poner a punto la técnica de detección de genes que codifican para el antígeno O157 y para las toxinas Stx1 y Stx2 utilizando el equipamiento y los reactivos propios del laboratorio de trabajo, sin obtener resultados falsos positivos ni negativos. Siguiendo la metodología descrita en este trabajo los resultados se consignan como “detectable” o “no detectable”, indicando tipo de muestra y método.

Esto es muy importante debido a que los resultados pueden variar utilizando componentes diferentes a los mencionados en los protocolos publicados por otros autores.

Es indispensable contar con métodos validados para poder ser aplicados en el diagnóstico y garantizar una detección oportuna y de calidad.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Jahan S. (2012). Epidemiology of Foodborne Illness. In: Valdéz B, editor. Scientific, Health and Social Aspects of the Food Industry. Rijeka. Pp. 321–42.
2. Reid C., Koppman M., Santin C., Feldman P., Kleiman E., (2018) Guía de Buenas Prácticas de Manufactura para Servicios de Comida. P.30-37.
3. ANMAT. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos.; (2011). <http://www.anmat.gov.ar> . Diciembre 2021.
4. Protocolo de Vigilância de BROTOS DE ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS. (2004). <https://www.areasaludbadajoz.com> .Octubre 2021.
5. Codex Alimentarius. Directrices generales sobre el muestreo (2004). <https://www.agrorum.net/blog/blog-711/las-normas-de-muestreo-del-codex-alimentarius-675>. Diciembre 2021.
6. De Boer E., Heuvelink A. (2000). Methods for the detection and isolation of Shiga toxinproducing Escherichia coli. J Appl Microbiol Symp; 88:133S–143S.
7. Kaper J., Nataro J.,(2004). Mobley H. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol.; 2(2):123–40.
8. Mercado E. (2007). Síndrome Urémico Hemolítico. Rev Argent Microbiol; 39:191–2.
9. Antman J., Geffner L., Pianciola L., Rivas M. (2014). Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) En Argentina (2010-2013). Extracto del Boletín Integrado de Vigilancia N° 222.
10. Frazier W.C., WISTHOFF D. C. (1993). Microbiología de los alimentos 4ª Edición española. Capítulo 14 - 289 – 320.
11. Islam M., Musekiwa A., Islam K., Ahmed S., Chowdhury S., Ahad A. (2014). Regional variation in the prevalence of E. coli O157 in cattle: a meta-analysis and meta-regression. PLoS One. 9(4):93299.
12. Rhoades J., Duffy G., Koutsoumanis K. (2009). Prevalence and concentration of verocytotoxigenic Escherichia coli, Salmonella enterica and Listeria monocytogenes in the beef production chain: A review. Food Microbiol.;26(4):357–76.
13. Nochebuena Pelcastre X., Quiñónez Ramírez E., Vázquez Salinas C. (2004). Enfermedad de las hamburguesas Escherichia coli O157:H7. Rev Digit Univ ;5(7):2–8.

14. OMS. Manual sobre las cinco claves para la inocuidad de los alimentos. Vol. 5, (2007). Departamento de Inocuidad de los Alimentos, Zoonosis y Enfermedades de Transmisión Alimentaria de la OMS. Ginebra, Suiza.
15. Secretaría de Políticas Regulación e Institutos y Secretaría de Valor Agregado. (2017). <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/172064/20171009>. Diciembre 2021.
16. Rivas M., Caffer M., Corso A., D’Astek B., Farace M., Hoffer A., et al. (2011). Manual de Procedimientos: “Detección de patógenos asociados a enfermedad diarreica aguda, incluyendo Vibrio Cholerae”. 223-253.
17. Varela G., Chinen I., Gadea P., Miliwebsky E, Mota MI., González S. (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(2):93–100.
18. Cicuta M., Deza N., Roibón W., Arzú O., Barceló M (2009). Escherichia coli productor de toxina Shiga en carnes molidas y chacinados embutidos de Corrientes, Argentina. Rev Vet 2009 ;20(1):11–4.
19. USDA. Ground Beef and Food Safety. Washington, DC; 2016. Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/food-safety-education/get-answers/food-safety-fact-sheets/meat-preparation/ground-beef-and-food-safety>. Noviembre 2021.
20. Arthur T., Ahmed R., Chase-Topping M., Kalchayanand N., Schmidt J., Bono J. (2013). Characterization of Escherichia coli O157:H7 strains isolated from supershedding cattle. Appl Environ Microbiol., (14): 294–303.
21. Konowalchuk J, Speirs J, Stavric S. (1977). Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. Infect Immun. 1977;18(3):775–779.
22. Deisingh A.K., Thompson M. (2004). Strategies for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 in foods. (3): 420-422.
23. Baker DA. (1995). Application of Modeling in HACCP Plan Development. Int. J. Food Microbiol. 25: 251-261.

ANEXO

Brotos asociados con *Escherichia coli* O157:H7 por el consumo de alimentos (13).

Año	Lugar	Alimento involucrado	Nro de enfermos	Nro de muertes	Referencia
1982	Oregon	Hamburguesas	26		Riley <i>et. al.</i> , 1983
1984	Nebraska	Carne molida			Rowe <i>et. al.</i> , 1993
1986	Wisconsin	Leche bronca			Martín <i>et. al.</i> , 1986
1987	Utah	Carne molida			Pavia <i>et. al.</i> , 1990
1987	Ontario	Emparedados	128	38	Carter <i>et. al.</i> , 1987
1988	Minnesota	Hamburguesas	32		Belongia <i>et. al.</i> , 1993
1989	Missouri	Agua no clorada	243	4	Armstrong <i>et. al.</i> , 1996
1990	Japón	Agua para beber	366	2	Hamano <i>et. al.</i> , 1993
1991	Canadá	Persona-a-persona	15		Rowe <i>et. al.</i> , 1994
1991	Oregon	Agua de alberca	21		Keene <i>et. al.</i> , 1994
1991	Missouri	Agua para beber	243		Swerdlow <i>et. al.</i> , 1992
1991	Massachussets	Sidra	4		Besser <i>et. al.</i> , 1993
1993	Oregon	Hamburguesas	40-50		Zhao y Doyle, 1994

1993	Seattle	Hamburguesas	477		O'Brien <i>et. al.</i> , 1993
1994	EEUU	Salami	17		Tilden <i>et. al.</i> , 1996
1995	Oregon	Carne de venado	11		Keene <i>et. al.</i> , 1997
1996	Japón	Germinado de rábano	3328		Watanabe <i>et. al.</i> , 1999
1996	Japón	Germinado de rábano	6000	12	NIIDIDCD, 1997
1997	Japón	Germinado de rábano	126		Itoh <i>et. al.</i> , 1998
1997	EEUU	Semillas de alfalfa	85		Taormina <i>et. al.</i> , 2001
1998	EEUU	Semillas y/o germinado de alfalfa y trébol	8		Taormina <i>et. al.</i> , 2001
1999	EEUU (37 brotes)	Diversos alimentos	1897	4	CDC, 2001
2000	EEUU	Diversos alimentos	249		CDC, 2002
2001	EEUU	Diversos alimentos	3294		CDC, 2003