

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

“ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE *Escherichia coli* PRODUCTOR DE TOXINA SHIGA EN AVES DESTINADAS PARA EL CONSUMO HUMANO”

“por”

Br. Natalia ASHFIELD CARBÓN

Br. Virginia RAMÓN HARO

TESIS DE GRADO presentado como uno de los requisitos para obtener el título de Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección - Control y Tecnología de los alimentos de origen animal

MODALIDAD: Estudio de un caso

MONTEVIDEO

URUGUAY

2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Jorge Fernández

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Cristina López

Tercer miembro:

Dra. Susana Casanova

Cuarto miembro:

Dr. Gustavo Varela

Quinto miembro

Dr. Milton Cattáneo

Autores:

Br. Natalia Ashfield

Br. Virginia Ramón

Fecha: 01/07/2016

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los tutores la Dra. Cristina López y Co- tutor Dr. Milton Cattáneo por el apoyo que nos brindaron.

A nuestro Co-tutor Dr. Gustavo Varela por su dedicación, motivación y su apoyo que fue muy importante en la realización del trabajo.

Al Dr. José Piaggio por brindarnos su apoyo en el análisis estadístico.

También a todas las personas del Departamento de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene que nos ayudaron en el procesamiento de las muestras.

A nuestras familias y amigos ya que gracias a ellos pudimos realizar esta carrera.

Por último quisiéramos agradecer a las funcionarias de biblioteca, por brindarnos su tiempo.

A todos ¡¡¡muchas gracias!!!

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	6
RESUMEN:	8
SUMMARY	9
INTRODUCCIÓN	10
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	13
INOCUIDAD ALIMENTARIA EN CARNE DE POLLO.....	13
<i>Escherichia coli</i>	14
Diferentes grupos de <i>Escherichia coli</i> según su capacidad para enfermar en humanos y animales:	16
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	17
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica	18
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva	19
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	19
<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa	20
<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga	20
<i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	21
Características bioquímicas <i>E. coli</i> O157:H7	22
Epidemiología	22
Portadores:	24
Aves como posibles portadoras de STEC	24
Transmisión	26
Patogenia.....	27
Factores de virulencia.....	28
Característica de la enfermedad en el humano	29
Diagnóstico	32
Prevención y control	34
Estrategias de intervención en la industria de la carne.....	35
COLIBACILOSIS AVIAR	37
PRODUCCIÓN EN EL SECTOR AVÍCOLA.....	38
El mercado mundial	38

La producción nacional	39
COMPOSICION DE LA CARNE DE POLLO	40
FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA.....	41
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	41
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	42
RESULTADOS:	49
DISCUSIÓN - CONCLUSIONES.....	51
BIBLIOGRAFIA	53

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS
CUADROS

Cuadro 1:
Peligros Biológicos Asociados a Carnes Rojas y Blancas. Características del
Desarrollo de
Microorganismos.....14

Cuadro 2:
Taxonomía de *Escherichia coli*15

Cuadro 3:
Categorías de *E. coli* diarrogénicos (DEC).....17

Cuadro 4:
Parámetros que regulan el desarrollo de *E. coli*.....22

Cuadro 5:
Cebadores utilizados en la técnica de PCR para detección de STEC.....45

Cuadro 6:
Resultados.....49

Cuadro 7:
Resultados obtenidos por PCR para los genes *Stx1* y *Stx2*.....49

FIGURAS

Figura 1: <i>Escherichia coli</i> en Mac Conkey Lactosa.....	15
Figura 2: Alimentos relacionados con casos de SUH en Argentina 2008-2014.....	26
Figura 3: Mecanismo de patogenia de <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga.....	28
Figura 4: Distribución por edades en casos de SUH atendidos por el Departamento de Epidemiología Alimentaria. Ciudad de Buenos Aires (2007-2011).....	31
Figura 5: Tasa de incidencia /100000 niños de 5 años en diferentes países.....	31
Figura 6: Caldo tríptico de soja modificado con novobiocina (Izquierda), Caldo tríptico de soja modificado sin novobiocina.....	42
Figura 7: Autoclave.....	43
Figura 8: Cría intensiva de pollos.....	44
Figura 9: Toma de muestras.....	45
Figura 10: Tubos eppendorf, luego de extracción de ADN.....	46
Figura 11: Termociclador.....	47
Figura 12: Agarosa.....	48
Figura 13: Fotografía de Gel. Fecha 02/02/2016.....	48
Figura 14: Fotografía de gel que revela la presencia de genes de Stx2.....	50

RESUMEN:

Escherichia coli (*E. coli*) productor de toxina Shiga (STEC) es responsable de casos individuales y brotes de enfermedades transmitidas por alimentos que determina serias consecuencias para la salud pública. Dada la gravedad de las enfermedades que produce en seres humanos, y la escasa información que existe en nuestro país que vincule las aves con este patógeno, es fundamental orientar los estudios de este agente en animales que son destinados al consumo humano, utilizando técnicas sensibles, a fin de evaluar su rol como reservorio potencial de estos agentes.

La carne de ave en general, y la de pollo en particular, puede ser un vehículo importante de microorganismos patógenos para el hombre, entre los que se encuentra *E. coli* patógeno entérico. Del conjunto de patotipos diarrogénicos de *E. coli* zoonóticos, nos enfocamos en estudiar *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC).

La hipótesis de nuestro trabajo fue que las aves son portadoras de STEC y el objetivo fue establecer la presencia de *E. coli* productor de toxina Shiga en aves destinadas al consumo humano.

Se realizó un estudio descriptivo, donde se extrajeron 66 muestras de cloaca de pollo, mediante un muestreo sistemático. La técnica que se utilizó para detectar los genes *stx* tiene un 100% de especificidad y un 90% de sensibilidad.

El muestreo fue realizado en los meses de Enero, Febrero y Marzo del 2016, en una planta de faena de pollos, en el Departamento de Canelones, Uruguay. Las muestras fueron tomadas a partir de pollos de 45 días, destinados para consumo humano, provenientes de sistema de cría intensivo. Éstas se tomaron luego del sacrificio y antes de que la carcasa sufriera cualquier proceso, utilizando un hisopo de algodón estéril que se introdujo 2cm en la cloaca de los pollos, y los hisopos se colocaron en un medio de enriquecimiento Caldo tríptico de Soja modificado (m-TSB) con el agregado de novobiocina al 8%, se incubó por 24 hrs a 37° C.

Se extrajo el ADN por lisis térmica y se procesaron por reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Una muestra fue positiva para genes de virulencia de Stx2. No se logró recuperar al agente en cultivo de Mac Conkey Lactosa.

Nuestros resultados confirman la baja prevalencia de STEC menor al 4% en pollos reportada en otros lugares del mundo.

Palabras claves:

Escherichia coli, pollos, reservorio.

SUMMARY

Escherichia coli (*E. coli*) Shiga toxin-producing (STEC) are responsible for individual cases and foodborne outbreaks that determines serious consequences for public health diseases. Considering the severity of the diseases caused in humans, and the limited information that exists in our country linking broilers with this pathogen, it is essential to direct the studies of this agent in animals intended for human consumption, using sensitive techniques, to evaluate its role as a potential reservoir of these agents. Bird meat in general, and particularly broilers, can be a very important vehicle of pathogens for human, including Enteric *Escherichia coli* (*E. coli*) pathogen. From the *E. coli* zoonotic pathotypes, we focus on studying *E. coli* Shiga toxin-producing (STEC). The hypothesis of our study was that broilers are STEC carriers, and the objective was to establish the presence of *E. coli* Shiga toxin in broilers for human consumption, focusing in broilers of 45 days of age from intensive farming system. We conducted a descriptive study taking 66 samples cloaca broilers samples by systematic sampling. The technique used to detect genes stx has 100 % specificity and 90 % sensitivity. Sampling was conducted during the months of January, February and March 2016 in a broilers slaughter plant, in the Department of Canelones. Samples were then taken after slaughter and before the carcass had gone under any process, using a sterile cotton swab, which was introduced 2cm into the cloaca of broilers, and then placed in an enrichment medium Tryptic Soy Broth Modified with (m - TSB) 8% novobiocin, and incubated for 24 hrs at 37° C. DNA was extracted by thermal lysis and processed by polymerase chain reaction (PCR), which showed one positive sample to Stx2. It was not possible to recover the agent in MacConkey culture Lactose. Therefore our results confirm the low prevalence of STEC, less than 4% in chickens reported elsewhere in the world

Keywords: *Escherichia coli*, broilers, reservoir.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen uno de los principales desafíos para la salud pública y representan un impacto económico para países productores de alimentos como el nuestro. El desarrollo de nuevas estrategias de prevención y control es fundamental y requiere un trabajo colaborativo entre el campo de la medicina humana y veterinaria, los organismos reguladores de la producción y control, la industria alimentaria, la vigilancia epidemiológica, el desarrollo de redes de laboratorios que complementen sus capacidades de análisis, formación de recursos humanos calificados y sobre todo la educación de la comunidad sobre inocuidad alimentaria (Rivas y col., 2008).

Las ETA se definen como: “Conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contengan agentes biológicos (por ejemplo: bacterias, virus o parásitos), o no biológicos (por ejemplo: plaguicidas o metales pesados) en cantidades tales que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica a nivel individual o de grupo de personas” (Rey y Silvestre, 2005). Estas se pueden presentar en tres diferentes maneras: las infecciones causadas por alimentos (ingestión del alimento con el microorganismo vivo), intoxicaciones (suceden cuando las toxinas producidas por las bacterias o mohos están presentes en el alimento ingerido) y el concepto clásico de toxiinfección alimentaria (T.I.A) en el cual se ingiere el agente vivo y este produce toxinas una vez dentro del organismo (Doyle y col., 2001).

Según la Organización Mundial de la Salud, las ETA constituyen uno de los problemas de salud más relevantes, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo. Cada año la OMS recibe informe sobre la ocurrencia de cientos de casos de ETA en todo el mundo, siendo los más frecuentes los ocasionados por alimentos que sufrieron contaminación biológica (Rivas y col., 2008).

La mayoría de los países que cuentan con sistemas para la vigilancia y notificación de casos de ETA han documentado durante las últimas décadas un aumento significativo en la incidencia de enfermedades causadas por microorganismos presentes en los alimentos, incluyendo *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes* (FAO OMS, 2002). Dentro de las más relevantes se encuentra la causada por la cepa patógena perteneciente al grupo STEC, (*E. coli* O157:H7 y otras cepas productoras de toxina Shiga). Este último grupo en los últimos 20 años, ha sido considerado como un patógeno emergente de gran impacto en la salud pública (Narváez y col., 2007).

En Uruguay, se observa una tendencia en aumento en la incidencia de los brotes de ETA desde el año 1993. El factor identificado con mayor frecuencia fue la materia prima contaminada y solamente en los brotes en los que el agente causal fue *S. aureus*, se identificó al hombre como fuente probable de infección (Acuña y col., 2002).

A nivel internacional, *E. coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, asociados a hamburguesas y carnes listas para consumir, respectivamente, han sido dos de los patógenos que mayor atención han recibido por parte de la investigación debido a la alta probabilidad de causar serios problemas en la salud de los consumidores (Rovira, 2006).

Hay más de 200 serotipos de STEC, sin embargo las cepas de los serogrupos O157, O145, O111, O103 y O26 se reconocen como STEC clásicas distribuidas mundialmente y en nuestro país (Varela y col., 2008).

E. coli es un patógeno zoonótico y emergente en todo el mundo el cual representa un trastorno para la salud del consumidor. Es una de las principales causas de muchos brotes de enfermedades y muertes humanas en diferentes partes del mundo causando también enormes pérdidas económicas (Engdaw y Temesgen, 2016).

E. coli es parte de la flora anaerobia facultativa del tracto intestinal del hombre y de algunos animales, y se elimina por las heces al exterior. Se puede encontrar en el medio ambiente, ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento es utilizado como indicador de contaminación fecal reciente. Infectan a casi todos los mamíferos y aves, por tanto tiene una distribución cosmopolita (Briones y col., 2010).

Por ser un habitante regular y normal del intestino se usa desde hace un siglo como "el mejor" indicador de contaminación de los alimentos con materia fecal (Michanie, 2003).

Las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (Stx) (STEC) constituyen un grupo importante dentro del conjunto de patógenos emergentes transmitidos por alimentos. Las cepas de STEC productoras de Stx2, en general determinan enfermedades más severas que las causadas por las que producen Stx1. Las cepas STEC asociadas con SUH (Síndrome Urémico Hemolítico) presentan junto con la capacidad de producir toxina Shiga otros atributos de virulencia (Varela y col., 2008).

En relación con la salud pública, O157:H7 es el serotipo de STEC más importante ligado a las enfermedades transmitidas por alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muertes cada año (FAO).

La infección se adquiere habitualmente por el consumo de carne bovina mal cocida o de otros alimentos contaminados con heces de estos animales. La contaminación de la carne generalmente se produce durante la faena, como resultado de malas prácticas, higiene deficiente de los mataderos y manipulación incorrecta de los animales (Griffin y Tauxe, 1991).

Casi todos los serotipos de *E. coli* aislados de aves resultan patógeno sólo para las aves, y no se reconocen como causa importante de infecciones en otros animales incluyendo los seres humanos. Los pollos sin embargo, son susceptibles a la colonización por *E. coli* O157:H7 (Barrientos, 2011).

En el comercio mundial, la carne de pollo superó ampliamente al consumo de la carne de cerdo y vacuna, ya que la carne de cerdo tiene limitaciones

religiosas y la vacuna se considera un producto de lujo, mientras que la carne de pollo tiene un costo inferior y cuenta con alto contenido de proteínas de excelente calidad, bajo contenido calórico, predominio de grasa saludable y amplia variedad de vitaminas y minerales.

Existen antecedentes regionales y mundiales a propósito del rol de la carne de pollo como vehículo potencial de serogrupos STEC asociados a casos graves de enfermedad humana. No existen datos locales de la presencia de este grupo de patógenos en este reservorio animal; si hay datos parciales en bovinos.

A la fecha Uruguay tiene once plantas de faena de pollos habilitadas por el Ministerio de Ganadería, de las cuales tres están habilitadas para exportar a terceros Países y Federación Rusa (MGAP, 2015).

El consumo interno de carne de pollo durante 2015 aumentó. El consumo per cápita de carne de pollo se situó para este año en 24,4 kilogramos, apenas superior al del año anterior, siendo el máximo valor histórico de la serie disponible (OPYPA, 2015).

Por lo tanto y siguiendo las recomendaciones internacionales, nos propusimos evaluar el rol de estos animales como reservorio de STEC.

Así mismo realizamos una revisión bibliográfica del tema.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

INOCUIDAD ALIMENTARIA EN CARNE DE POLLO

Los problemas de inocuidad alimentaria siguen existiendo a nivel mundial y afectan no solo a los productos cárnicos sino a toda una variedad de alimentos (Temprado, 2005).

El concepto de Inocuidad implica que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparan y/o consumen de acuerdo con el uso previsto (FAO, 2005).

Para garantizar la inocuidad de los alimentos de origen animal, se necesita actuar en todos los niveles de la cadena alimentaria, desde la producción en la granja hasta el consumo humano. En la etapa previa al sacrificio o a la transformación, pueden evitarse o reducirse numerosos riesgos para la inocuidad por medio de políticas de prevención y de buenas prácticas recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015).

El control de los agentes patógenos desde su origen, en los animales en la granja constituye el medio más eficaz para proteger la salud humana (OIE, 2015).

Las actividades normativas de la OIE sobre la inocuidad de los alimentos se concentran en la eliminación de los posibles peligros para el consumidor antes del sacrificio de los animales o de la primera transformación de sus productos (carnes, leche, huevos, etc.) (OIE, 2015).

El tejido muscular de animales sanos es estéril o con niveles de unidades formadoras de colonias extremadamente bajas, si estuvieran presentes. Se encuentra un alto número de bacterias en cuero, plumas, pelos, patas, tracto gastrointestinal (Rodríguez, 2009).

Las canales de pollo presentan un índice de carga microbiana post sacrificio muy superior al de otras especies no avícolas. Esto es así, dado que la piel sin ningún tipo de tratamiento agresivo, y por tanto con su flora microbiana, llega al producto final. Por el contrario en porcino la piel sufre un fuerte calentamiento y en bovinos se eliminan (Temprado, 2005; López, 2011).

Cuadro 1: Peligros biológicos asociados a carnes rojas y blancas.

Características del desarrollo de microorganismos

Microorganismo	Temperatura de Crecimiento °C	pH	Aw minimo
<i>Bacillus cereus</i>	10 a 48	6,5 - 9,3	0,95
<i>Campylobacter jejuni</i>	30 a 47	6,5 - 7,5	
<i>Clostridium botulinum</i>	3,3 a 48	> 4,6	0,94
<i>Clostridium perfringens</i>	15 a 50	5,5 - 8,0	0,95
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	10 a 42	4,5 - 9,0	
<i>Listeria monocytogenes</i>	2,5 a 4,4	5,2 - 9,6	
<i>Salmonella</i>	5 a 46		
<i>Staphylococcus aureus</i>	6,5 a 46	5,2 - 9,0	0,86
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2 a 45	4,6 - 9,6	

Fuente: Rodríguez, 2009

Las poblaciones bacterianas en las canales de pollo, también están determinadas por el tipo de poblaciones de bacterias en el tracto gastrointestinal de las aves en la granja, así como de las bacterias que se agregan cuando se maneja el ave antes de su matanza y después de ella (Castañeda y col., 2013).

Escherichia coli

A fines del siglo XIX debido a que muchos recién nacidos morían a causa de diarrea, el pediatra alemán Theodor Von Escherich (1857-1911) descubrió un microorganismo al cual lo denominó inicialmente *Bacterium coli* “bacteria del intestino”, y luego fue denominado definitivamente en su honor con el nombre de *Escherichia coli* (Blanco, 1995; Coronel, 2011).

E. coli es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, englobado en la familia Enterobacteriaceae (Ewin, 1985; Blanco, 1995; Amorín y col., 2002). El tamaño promedio de los bacilos es de 0.5 µm de ancho por 3 µm de largo, algunas especies son móviles (por flagelos peritricos), no esporuladas, fermenta la glucosa y la lactosa, son catalasa positivos, oxidasa negativos y reduce nitratos a nitritos (Molina, 2015).

Figura 1: *Escherichia coli* en agar Mac Conkey.

Se logran ver colonias aisladas, son colonias medianas, circulares, convexas, bordes redondeados, lactosa positivas lo que les da coloración rosada.



Fuente: (Microbiology in Picture, 2015)

Cuadro 2: Taxonomía de *Escherichia coli*

Columna1	Columna2
Dominio	Bacteria (Eubacteria)
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gamma proteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Genero	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>E. coli</i>

Fuente: Prescott y col., 2004

En 1947, Kauffman propone una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* en base a la determinación de antígenos superficiales O (somáticos), K (capsulares), y H (flagelares). Hasta el presente se identificaron 174 antígenos O, 56 H y 80 K (Rivas y col., 2008; Molina, 2015). Esta forma de clasificación serológica resultó útil en los estudios epidemiológicos y de patogénesis de *E. coli*, facilitando la diferenciación entre cepas virulentas e inocuas (Blanco, 1995; Acuña y col., 2002). La combinación específica de los antígenos O y H define el

serotipo de una bacteria, en tanto que la identificación del antígeno somático hace referencia al serogrupo de la cepa de *E. coli* (Molina, 2015).

Los microorganismos se clasifican gracias a la expresión de su genoma (material genético) a través del estudio de diferentes pruebas fenotípicas. Desde tiempo atrás se usa la clasificación bioquímica o fisiológica y también, la serológica para diferenciar las distintas especies y diferentes serovariedades de una misma especie. El procedimiento serológico se basa en demostrar diferencias antigénicas presentes en estructuras de la superficie bacteriana. En el caso de bacterias Gram negativas estas incluyen el antígeno O “somático” del lipopolisacárido (LPS), los flagelos (antígenos H) y los antígenos capsulares (K). Así, se establecen las serovariedades. Se dispone de ensayos genéticos que clasifican los microorganismos al detectar porciones que no varían del genoma o de otras estrategias que amplían las porciones del genoma que se quieren identificar; este tipo de ensayos están reservados a laboratorios de media y alta complejidad (Michanie, 2003).

Los recién nacidos de todas las especies, durante el pasaje a través del canal del parto y en las primeras cuarenta horas, se coloniza a nivel del tubo digestivo con cepas de *E. coli* y otras bacterias beneficiosas necesarias para el establecimiento de la flora normal. Estos organismos evitan la invasión de patógenos exógenos. Por lo tanto *E. coli* forma parte de la flora normal intestinal y ayuda en la digestión de los alimentos y producción de vitaminas como la K y vitaminas del complejo B (Jane, 2014).

Esta bacteria forma parte de la flora normal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo de humanos y animales (Blanco, 1995; Coronel, 2011), por lo que se elimina por las heces al exterior. Se puede encontrar en el medio ambiente ya que es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y alimentos, de manera que su aislamiento es un indicador de contaminación fecal reciente (Blanco, 1995; Michanie, 2003; Briones y col, 2010).

Las cepas de *E. coli* diarrogénicas en conjunto, son la principal causa de gastroenteritis en niños en países en vías de desarrollo como el nuestro, siendo responsable del 30 al 40% de todos los casos de diarrea en niños (Lluque y col., 2010).

La Organización Mundial de la Salud estima que cada año mueren 1 millón de niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo, a causa de ETA, lo que implica 2.700 decesos por día. Según el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de ETA (SIRVETA), en América Latina durante el año 2000 se reportaron más de 500 brotes de ETA, los cuales ocurrieron en un 40 % en el ámbito doméstico y sólo un 9 % en puestos callejeros y restaurantes (OMS, 2002).

Diferentes grupos de *Escherichia coli* según su capacidad para enfermar en humanos y animales:

En general no producen enfermedad pero existen algunos tipos patogénicos de *E. coli* que pueden producir toxiinfección alimentaria, serios problemas digestivos y también otros cuadros de localización no digestiva, como el aparato urinario, o meningitis en lactantes y niños pequeños en épocas de verano (Rey y Silvestre, 2005).

En base a los síndromes, características de la enfermedad y su efecto en determinados cultivos celulares y en los grupos serológicos, las cepas de *E. coli* diarrogénicas (DEC) han sido clasificadas en seis categorías patogénicas o patotipos: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), de adherencia difusa (DAEC) y las productoras de toxinas Shiga o enterohemorrágicas (STEC) (Rivas, 2008).

Las cepas de estos grupos presentan características específicas que las distinguen, poseen diferentes factores de virulencia, pertenecen a diferentes serotipos, y producen infecciones y síndromes diferentes (Fernández y Padola, 2012).

Cuadro 3: Categorías de *E. coli* diarrogénicos (DEC)

Abreviatura	Descripción
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa
STEC/EHEC	<i>E. coli</i> productora de toxina shiga o enterohemorrágica

Fuente: Lluque y col., 2010

Escherichia coli enteropatógena

Las EPEC fueron los primeros patotipos de *E. coli* en ser descritos y fueron definidas como *E. coli* asociados a diarrea en niños pequeños que produce una histopatología característica conocida como lesión de adherencia y borrado (A/E) (Lluque y col, 2010). Estas no poseen genes que codifiquen para la toxina Shiga (verotoxinas) (Otero, 2014).

Todos los elementos genéticos requeridos para la producción de la lesión A/E están codificados en una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Uno de los genes (*eaeA*) ubicado en LEE, codifica una adhesina de membrana externa denominada intimina, la cual permite la unión íntima entre la bacteria y el enterocito, luego de translocar su propio receptor (tir, translocated intimin receptor) (Lluque y col., 2010).

Las EPEC son a su vez clasificadas por la presencia o no del pili denominado bfp (bundle-forming pilus). Las EPEC típicas son *eae+/bfp+* y las EPEC atípicas son *eae+/bfp-* (Lluque y col., 2010).

EPEC puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes (Rodríguez, 2002).

La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral sobre todo por manos contaminadas. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas. Para el caso de EPEC atípicas se ha reconocido también el reservorio animal principalmente bovino. (Rodríguez, 2002).

El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómitos, fiebre baja y mala absorción (Rodríguez, 2002).

El diagnóstico de EPEC incluye ensayos *in vitro* en cultivos celulares y métodos moleculares. En ensayos *in vitro* las cepas EPEC se caracterizan por formar microcolonias sobre el citoplasma de las células Hep-2 y su estudio incluye factores de patogenicidad como el efecto A/E, presencia de plásmidos y fimbrias (Rodríguez, 2002).

Escherichia coli enterotoxigénica

Frecuentemente produce diarrea acuosa en humanos y animales que puede ser desde leve hasta severa, dando lugar a síntomas similares a los del cólera, produciendo deshidratación severa e incluso pudiendo provocar la muerte (Otero, 2014).

Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens). Sus genes están en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en transposones. Las toxinas LT y ST aumentan el nivel intracelular de cAMP y cGMP respectivamente, provocando la salida de agua e iones a la luz intestinal, con la consiguiente diarrea acuosa (Rodríguez., 2002).

Las enfermedades de los animales debido a ETEC aparecen típicamente como diarrea severa acuosa durante los primeros días de vida (también un par de días después del destete de los cerdos). ETEC se adhieren a las microvellosidades intestinales sin inducir lesiones morfológicas y produce enterotoxinas que actúan de forma local en los enterocitos. Esta acción produce la hipersecreción (de agua y electrolitos) y la absorción reducida. Adhesinas y toxinas son los dos atributos de virulencia prominentes de ETEC y el nivel de conocimiento de estos factores determina las posibilidades de éxito de la prevención y la terapia de la enfermedad (Nagy y col., 1998).

Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida (Rodríguez, 2002).

La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30%. En los niños en edad escolar y en adultos puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero (Rodríguez, 2002).

La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómitos. La diarrea producida por ETEC

puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave (Rodríguez, 2002).

La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva elevada de aproximadamente de 10^8 UFC (unidades formadoras de colonias) (Rodríguez, 2002).

Escherichia coli enteroinvasiva

El grupo EIEC y *Shigella* están relacionados genética y bioquímicamente. El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes. La información genética para este mecanismo está en el loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea (Rodríguez, 2002).

Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, ésta en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC (Rodríguez, 2002).

Las cepas EIEC se asocian más con brotes y menos frecuentemente con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Rodríguez, 2002).

El diagnóstico de EIEC se puede hacer por pruebas in vivo como el test de Sereny, que es la inoculación de un cultivo puro de la bacteria en estudio en el ojo de un cobayo. Si la bacteria tiene capacidad invasiva, después de 24 a 96 h se produce una ulceración de la córnea. Existen otros procedimientos menos cruentos entre los que se incluyen métodos inmunológicos y moleculares (Rodríguez., 2002).

Escherichia coli enteroagregativa

EAEC es considerado por muchos como un patógeno emergente que puede infectar una amplia gama de grupos de edad. La base molecular de la virulencia de EAEC no está bien definida, lo que sugiere que se requiere la caracterización molecular adicional del patotipo (Rasko y col., 2008).

La infección por EAEC se caracteriza por la formación de una biopelícula en el colon, seguido por la secreción de toxinas y factores citolíticos (Rasko y col., 2008).

El grupo EAEC se define como el constituido por cepas de *E. coli* que no producen LT o ST y que se adhieren a las células Hep-2 con un patrón conocido como enteroagregativo, en el que las bacterias se adhieren unas a otras en una configuración de “ladrillos apilados” (Otero, 2014).

Desde su descubrimiento, un creciente número de estudios han implicado diarrea en EAEC en una variedad de entornos. Estos ahora incluyen diarrea endémica de los lactantes en los países industrializados y en vías de desarrollo, diarrea persistente entre los pacientes del virus de

inmunodeficiencia humana / síndrome de inmunodeficiencia adquirida y la diarrea del viajero. Varios brotes de diarrea EAEC también se han descrito. Los estudios prospectivos sugieren que en las poblaciones bien alimentadas en los países industrializados, EAEC puede ser una causa de la diarrea endémica esporádica. Por ejemplo, un gran estudio prospectivo de vigilancia en el Reino Unido implicado EAEC entre los principales agentes patógenos en todas las edades (Harrington y col., 2006).

Escherichia coli de adherencia difusa

Las cepas DAEC de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo O126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. Al realizar ensayos *in vitro* en células Hep-2, las cepas DAEC tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado *in vivo* (Rodríguez, 2002).

El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez, 2002).

Escherichia coli productor de toxina Shiga

Las cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga (Stx) (STEC), también llamada productor de verotoxina (VTEC) constituyen un grupo importante dentro del conjunto de patógenos emergentes transmitidos por alimentos (Brandal y col., 2015).

Los serogrupos de STEC O157:H7 y los no-O157, dentro de ellos *E. coli* O26, O45, O103, O111, O121 y O145, referidos en la literatura como «Big Six STEC», constituyen un problema creciente para la salud pública a nivel mundial (Mussio y col., 2014).

Tienen en común con *Shigella dysenteriae* tipo 1, la producción de sustancias proteicas de acción local y sistémica: toxina Shiga “Shiga like toxin”, o verotoxinas, así llamada por su acción citotóxica sobre cultivos de células Vero en laboratorio. Estas constituyen una familia de exotoxinas (VT1, VT2, y sus variantes) de composición y acción similar a la toxina Shiga (Amorin y col., 2002).

Las cepas de STEC inicialmente se adhieren a la superficie de la mucosa intestinal en áreas locales, y luego se adhiere más profundamente y destruyen las microvellosidades intestinales (Urumova y col., 2014). Las verotoxinas son liberadas en el intestino, luego son absorbidas por la sangre causando lesiones en el endotelio vascular, provocando una coagulación intravascular local y

acumulación de fibrina en el sistema nervioso central (SNC), en el tubo digestivo y en los riñones (Blanco, 1995).

En los seres humanos estas bacterias se asocian con un amplio espectro de manifestaciones clínicas que varía desde diarrea leve y autolimitada hasta procesos más graves, muchas veces con secuelas importantes, como colitis hemorrágicas (CH) o síndrome urémico hemolítico (SUH). Las cepas de STEC productoras de Stx2, en general determinan enfermedades más severas que las causadas por las que producen Stx1. Las cepas STEC asociadas con SUH presentan junto con la capacidad de producir toxina Shiga otros atributos de virulencia (Blanco, 1995; Varela y col., 2008).

Dentro del grupo STEC, *E. coli* O157:H7 es el serotipo aislado más frecuentemente en Argentina y otros países como Estados Unidos, y es al que se le atribuye la ocurrencia de la mayoría de los grandes brotes como los registrados en la Costa Oeste de Estados Unidos en 1993 y en Japón en 1996 (Rivas y col., 2008).

Debido entre otros factores al último brote ocurrido en Europa en el año 2011, muchos países han aumentado significativamente el número de controles oficiales destinados a la detección de la presencia de STEC en alimentos, tanto en aquellos que se importan como en los que se exportan (Mussio y col., 2014).

Escherichia coli O157:H7

En relación con la salud pública, la cepa de *E. coli* (O157:H7) es el serotipo STEC mas importante (*E. coli* productor de toxina Shiga) ligado a las enfermedades transmitidas por alimentos, lo que se traduce en una alta incidencia de infecciones y muerte cada año (FAO).

E. coli O157:H7 pertenece al grupo de las *E. coli* enterohemorrágicas (STEC) ya descrito anteriormente. Durante las últimas tres décadas, este microorganismo se ha consolidado como un importante patógeno entérico, capaz de causar grandes brotes de enfermedad gastrointestinal (Eppinger y col., 2011).

La infección por STEC fue reconocida por primera vez en 1982 en EE.UU., un primer brote de colitis hemorrágica que afectó a 47 personas que comieron en diversos restaurantes de la misma cadena de comidas rápidas (Broghna y Gonzales, 2008). Tres meses después ocurrió el segundo brote en Michigan, EE.UU; identificándose a las hamburguesas mal cocidas de una misma cadena de comidas rápidas como vehículo, aislándose *E. coli* O157:H7 de pacientes y de carne picada congelada.

Desde entonces las cepas STEC sorbitol negativas del serotipo O157:H7 han provocado numerosos brotes de colitis hemorrágica en diversos países del mundo. La media de edad de los pacientes es de 14 años (intervalo: 11 meses a 72 años). Siendo el grupo de mayor riesgo el de los niños menores a 5 años, y algunos pueden evolucionar a SUH (Kanayama y col., 2015).

Características bioquímicas *E. coli* O157:H7

El serotipo O157:H7 tiene características bioquímicas distintivas de *E. coli* générica, ya que no fermenta el sorbitol en 24 hrs (Riley, 1983), presenta incapacidad para producir β glucuronidasa, esto es incapacidad para hidrolizar el 4-metil-umbeliferil-D-glucuronido (Doyle, 1991). Varios factores influyen en la supervivencia y el crecimiento de STEC en los alimentos, entre ellos se encuentra, la temperatura, el pH, la sal y la actividad agua (CODEX, 2004).

Estudios sobre la sensibilidad térmica de *E. coli* O157:H7 en la carne de res molida sugieren que la cocción de ésta, a una temperatura suficientemente alta como para matar las cepas típicas de *Salmonella*, también matará los organismos de STEC. La temperatura óptima para la multiplicación de *E. coli* O157:H7 es aproximadamente 37° C y el organismo crecerá a temperatura inferiores de 8° C a 10° C, o a temperatura de 44° C a 45° C (Doyle y Schoeni, 1987).

E. coli O157:H7 sobrevive el proceso de congelación, presentando una reducción en la concentración (CODEX, 2004).

La temperatura de pasteurización de la leche (72° C durante 16,2 s) es un método efectivo para eliminar células de *E. coli* O157:H7. En los alimentos cárnicos una temperatura interna de 63° C, constituye un punto crítico de control para asegurar la destrucción de *E. coli* O157:H7. Sin embargo, Food and Drugs Administration de EE.UU recomendó incrementar la temperatura de cocción de las hamburguesas a 68,3° C después de un brote que involucró a cinco Estados y afectó a más de 700 personas (Griffin y Tauxe, 1991).

Se ha informado que *E. coli* O157:H7 es más resistente al ácido que otros organismos de *E. coli*. La resistencia al ácido aumenta la supervivencia de *E. coli* O157:H7 en alimentos ligeramente ácidos y podría explicar su habilidad de sobrevivir durante su circulación por el estómago (CODEX, 2004). Algunas STEC pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta un pH de 4,4 y un máximo de 9 y en alimentos con una actividad agua (aw) mínima de 0,95 (OMS, 2011).

Cuadro 4: Parámetros que regulan el desarrollo de *E. coli*

	Mínima	Óptima	Máxima
Temperatura ° C	7 - 8° C	35 - 40° C	44 -46° C
pH	4.4	6 a 7	9.0
Actividad Agua	0,95	0,995	-

Fuente: Michanie, 2003

Epidemiología

E. coli se considera actualmente como un patógeno zoonótico emergente y agente de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo, dado a la cantidad de casos esporádicos y brotes epidémicos de infecciones que causa a nivel mundial (Pradel y col., 2000; Varela y col., 2008).

Se han asociado brotes con diferentes tipos de alimentos (carne de res y verduras de hoja, generalmente consumidos crudos), contacto de persona a

persona, contacto directo o indirecto con animales y agua (Heiman y col., 2015).

Según datos aportados por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Estados Unidos, de un total de 4756 casos de enfermedades humanas provocadas por STEC en el año 2012, 51,7% se debieron a cepas de *E. coli* O157, 13,8% a O26, 11,9% a O103, 7,7% a O111, 3,4% a O12, 2,5% a O45 y 2,3% a O121 (CDC, 2012).

Por otra parte, en Europa y Uruguay las infecciones humanas ocasionadas por STEC no-O157 son más frecuentes que las producidas por O157:H7 (Pradel y col, 2000; Varela y col, 2008). Los casos de infecciones por no-O157 aumentaron vertiginosamente debido al brote ocurrido en Alemania en el año 2011 (EFSA y ECDC, 2013).

En Asia hay pocos reportes de infecciones por STEC O157, salvo en Japón a partir del brote masivo con más de 10.000 afectados en 1996, posiblemente por falta de sistemas de vigilancia. En Australia las infecciones por STEC no-O157, fundamentalmente O111: NM, son más frecuentes que las de O157 (Rivas, 2008).

En América del Sur, desde fines de los años noventa, en Chile y en Argentina se han reportado casos de diarrea y SUH vinculados tanto a *E. coli* O157:H7 como a serogrupos no-O157 (Rivas., 2008). En Uruguay, el primer caso de SUH vinculada a *E. coli* O157:H7 se informó en una niña de 16 meses en el año 2002 (Gadea y col., 2004).

Estos hallazgos demuestran la importancia de las enfermedades asociadas a STEC en la Latinoamérica. En cuanto al SUH, esta enfermedad está ampliamente distribuida en el mundo (Griffin y Tauxe, 1991). En América del Sur el problema se concentra en países del Cono Sur, principalmente Argentina, Chile y Uruguay. Esto podría responder a diferencias en la distribución geográfica como consecuencia directa de la magnitud de los reservorios del agente causal y a la influencia de mecanismos de transmisión específicos presentes en el área (Rivas, 2008).

Al comparar las tasas de incidencia del SUH de diferentes países de América, puede observarse que la de la Argentina es dos veces superior a la de Uruguay, y tres veces mayor que la de Canadá, EE.UU. y Chile (Rivas, 2008).

Debido entre otros factores al brote ocurrido en Europa en el año 2011, muchos países han aumentado significativamente el número de controles oficiales destinados a la detección de la presencia de STEC en alimentos, tanto en aquellos que se importan como en los que se exportan (USDA, 2012; EFSA y ECDC, 2013).

La dosis infectante de STEC es reducida, de pocos cientos de gérmenes, casi como *Shigella*, y es frecuente la transmisión de persona a persona, pero los animales, especialmente los bovinos, son considerados como el reservorio más importante de STEC, y es el origen habitualmente de los brotes en el mundo. Los alimentos o subproductos animales (carne mal cocida o manipulada, agua,

leche, o jugos contaminados con heces de animales) son los vehículos de transmisión más frecuentes al ser humano (Acuña y col., 2010).

Portadores:

El ganado bovino se considera el principal reservorio de este patógeno, con un potencial poder de contaminar el alimento a través de la carcasa con la piel contaminada o por derrames de intestino de portadores clínicamente sanos en faena (Wells y col., 1991; Fukushima y col., 1999; Heuvelink y col., 1999; Pradel y col., 2000; Mussio y col., 2014), en esta especie se han aislado más de 435 serotipos (Coronel, 2011).

El ganado lechero se ha identificado como un reservorio de *E. coli* O157:H7 con aislamientos en varias ocasiones de este organismo en heces de animales jóvenes asociados con casos de SUH en niños tras consumir leche cruda (Doyle y col 1987; Hussein y Sakuma, 2005).

Por lo tanto, los productos alimenticios de la especie bovina son considerados como factor de riesgo importante para la enfermedad en el ser humano. Los animales que participan como vectores muchas veces son asintomáticos. Sobretudo existe una mayor incidencia en los bovinos jóvenes que se los llama "súper excretores" de *E. coli* O157:H7 los que están fuertemente colonizados por un largo periodo de tiempo. La colonización similar podría observarse en ovinos (Urumova y col., 2015).

El crecimiento de *E. coli* O157 en el líquido ruminal de los animales bien alimentados se encuentra limitado por el pH y la concentración de ácidos grasos volátiles, cosa que no sucede en los que se someten a ayunos de 24 a 48 hs aumentando la difusión (como sucede previo a la faena). Si bien la infección individual con *E. coli* es transitoria, la del rebaño se mantiene (Wells y col., 1991). El tiempo promedio en el cual este patógeno se mantiene en el sistema gastrointestinal de los rumiantes es de 30 días, con eliminación intermitente y de corta duración (Fernández, 2006) aunque en algunos animales la bacteria puede estar presente hasta un año o más (Oquendo, 2006).

A pesar de que la mayoría de la bibliografía coincide en recalcar que el principal portador de EHEC/STEC es el bovino, este también se encuentra en ovejas, ciervos, cabras, aves de abasto, perros, gatos, ratas, pájaros y humanos, siendo portadores asintomáticos (Coronel, 2011; Jure, 2015). También se ha encontrado este patógeno en cerdos y pavos (Heuvelink y col., 1999).

Aves como posibles portadoras de STEC

La prevalencia de *E. coli* enterohemorrágica (STEC) O157 en las aves se considera mínimo en comparación con otras especies, especialmente rumiantes. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que las aves se infectan fácil y persistentemente con este organismo (Pilipcinec, 1999; Ragione y col., 2005; Bahiraei y Rahimi, 2015).

Estudios recientes como el realizado en la Región de Riberão Preto en el año 2015, donde recogieron 80 muestras de materia fecal de gallinas de cría extensiva (a campo), las cuales fueron procesadas por PCR, para la detección

de STEC y EPEC, obtuvieron resultados de 10 (12,5%) muestras positivas para genes de virulencia de Stx1 y 7 (8,8%) muestras positivas para genes de virulencia de Stx2 (Borzi y col., 2015). En el mismo año en la provincia de Kermanshah, Iran se han encontrado cepas de STEC en ponedoras comerciales, donde se recogieron 200 muestras de hisopos cloacales, las cuales se mantuvieron en caldo tríptico de soja (m-TSB) con novobiocina y se incubaron a 37° C durante 18 horas. A continuación, los cultivos se sembraron en agar eosina azul de metileno (EMB). Las colonias típicas de *E. coli* con brillo metálico en agar EMB, se sembraron en placas de agar Mac Conkey sorbitol suplementado con cefixima y telurito de potasio. Las colonias con morfología característica de *E. coli* se sometieron a un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR) para determinar la presencia de genes que codifican para stx1 y/o stx2. De 200 hisopos cloacales, 1(0,50%) muestra se confirmó positivo para STEC. A pesar de un bajo nivel endémico de STEC en ponedoras comerciales revelados en este estudio, la propagación de esta bacteria en ciertas circunstancias se debe considerar como un peligro para la salud pública (Bahiraei y Rahimi, 2015).

E. coli O157:H7 asociada con colitis hemorrágica puede colonizar el ciego de los pollos por hasta 90 días después de la inoculación por vía oral al día de edad. Los recuentos bacterianos indicaron que *E. coli* O157:H7 está presente a niveles mayores a 10 unidades formadoras de colonia por gramo de tejido y en menor medida en el colon. Estos resultados sugieren que *E. coli* O157:H7 coloniza el ciego de los pollos y se pasa a través del colon con la materia fecal. La capacidad de este organismo para colonizar el ciego de los pollos, indica que estos pueden servir como anfitriones y posiblemente como depósitos para *E. coli* O157:H7 (Beery y col., 1985).

Por otro lado existen estudios que muestran como resultados la ausencia de STEC en pollos, como el realizado por Beutin en 1993 donde se recolectaron 720 muestras de diferentes especies (terneros, ovejas, cerdos, perros, gatos y pollos) en donde no se detectó la presencia de STEC en este último (Beutin, 1993). Otro estudio realizado por Chapman sobre la presencia de *E. coli* O157 en diferentes especies, en el cual colectaron muestras de materia fecal de terneros, ovejas, cerdos, y pollos. Las cuales fueron analizadas para la búsqueda de *E. coli* O157, dando aislamientos de *E. coli* O157 en 752 (15,7%) de 4800 terneros, 22 (2,2%) de 1000 ovejas y 4 (0,4%) de 1000 cerdos, pero no se aisló este en las 1000 muestras de pollos (Chapman y col., 1997).

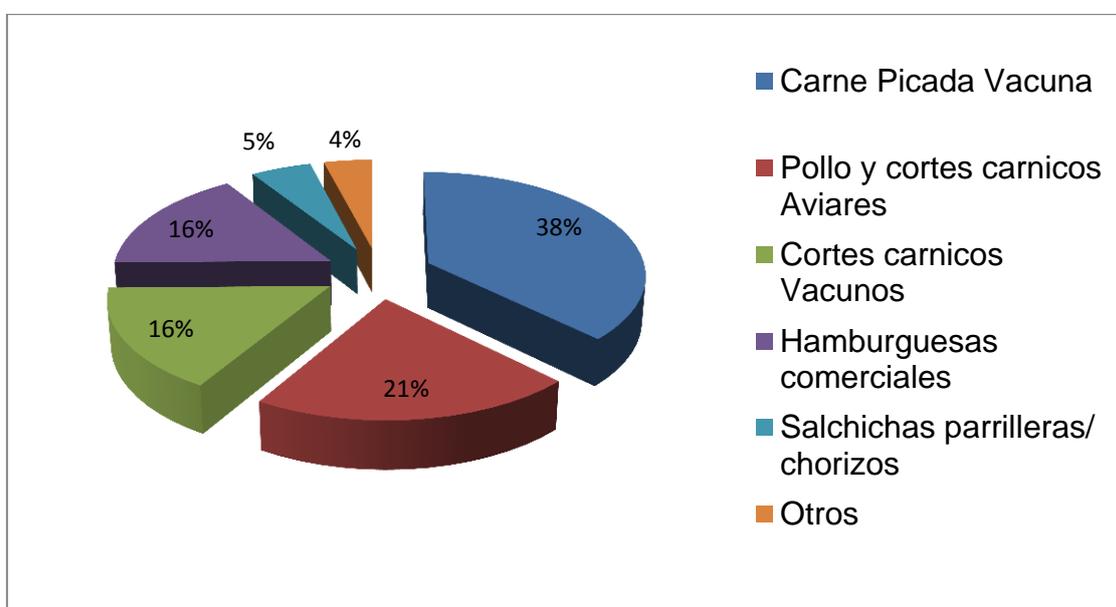
Existen referencias en cuanto a la presencia de cepas de STEC en palomas, lo que las convierte en un reservorio natural y un riesgo sanitario para el hombre (Gibert, 2010). En Japón se recogieron 549 muestras de heces de palomas procedentes de 14 localidades, para aislar STEC y para investigar las características de los aislamientos. Stx 2 fue detectado por PCR en 16 (2,9%) de las 549 muestras dentro de 4 de las 14 localidades (Murakami y col, 2014) y en Brasil también se encontraron genes de virulencia en palomas, gaviotas y periquitos (Reple y col., 2015). Este hallazgo sugiere el rol de las aves en la difusión de este patógeno, comportándose como un posible vector.

Transmisión

La principal vía de transmisión de STEC O157 y no-O157 son los alimentos contaminados como por ejemplo carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos (Heuvelink y col., 1999; Marzocca y col., 2006; Heiman y col, 2015) hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogurt, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados entre otros (Cicuta y col., 2009; Neher y col., 2016).

En la figura N° 1 podemos observar los alimentos relacionados con casos de SUH en Argentina, y en está se puede apreciar como la carne de pollo ocupa el segundo lugar, asumiendo así que este alimento es vehículo importante del patógeno en estudio.

Figura 2: Alimentos relacionados con casos de SUH en Argentina 2008-2014



Fuente: Adaptado Departamento de Epidemiología Alimentaria – Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria (DGHYSA)

Doyle y colaboradores aislaron *E. coli* O157:H7 de carne de res, de cerdo, de carne de aves de corral, y de cordero. Este fue es el primer informe de aislamiento de *E. coli* O157:H7 de los alimentos aparte de carne picada, y los resultados indican que el organismo no es un contaminante raro de carnes frescas de las diferentes especies (Heuvelink y col., 1999).

Aparte del consumo de alimentos contaminados, los seres humanos podrían infectarse a través del agua de consumo o para recreación contaminada, por contacto directo con animales, con su materia fecal y suelos contaminados. También se han descrito casos en humanos luego de nadar en piscinas y lagos (Urumova y col., 2015).

La transmisión directa de hombre a hombre puede ocurrir durante una epidemia. Se han descrito casos relacionados con el consumo de leche no

pasteurizada de leche de cabra, productos chacinados secos, y después del contacto directo con caballos, aves y conejos (Urumova y col., 2015).

Las cepas STEC, poseen una dosis infectiva muy baja (10-100 ufc) (Otero, 2014)

Verduras contaminadas (espinaca, lechuga, rábanos), así como zumos de fruta no pasteurizados también podría suponer un riesgo para la infección a los hombres. Hay datos de la contaminación por hierbas, por ejemplo, se informó con perejil (Urumova y col., 2015)

Se reconoce que la *E. coli* O157:H7 exhiben una cierta tolerancia en los ambientes ácidos, lo que podría explicar su persistencia durante semanas en la mayonesa, salsas ácidas, jugo de manzana, quesos frescos. Estas bacterias son también resistentes al secado (Urumova y col., 2015).

Hay una mayor susceptibilidad muy marcada en niños, ancianos e inmunodeprimidos. En los ancianos, la tasa de letalidad por SUH puede elevarse al 50%. Por lo que se observan en jardines maternos e infantiles, casas de ancianos e instituciones para enfermos mentales (Varela y col., 2008).

Patogenia

El origen de la toxicidad parece ser que surgió de una EPEC a la que un bacteriófago (virus de las bacterias) le agregó las toxinas similares a las producidas por *Shigella*. Los factores de virulencia pueden estar solos o combinados y se conocen como Stx1, Stx2, *eae*, entre otros. Poseer los genes Stx1, Stx2 no es suficiente para conferir patogenicidad. Se requieren otros genes de virulencia para adherirse y dañar la célula de la pared intestinal (Michanie, 2003).

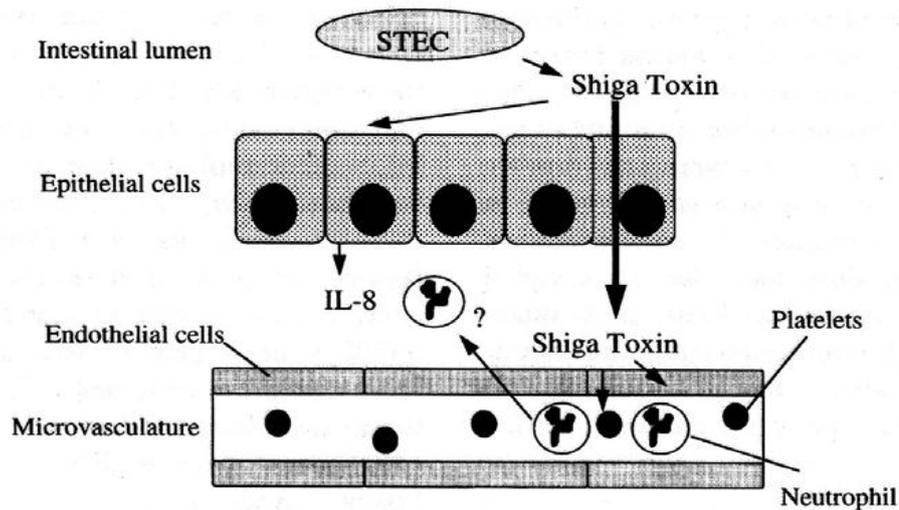
Las cepas de STEC alcanzan el intestino y se adhieren a las células epiteliales sin invadirlos. La adherencia bacteriana mediada por fimbrias, causa un alargamiento de las microvellosidades. Seguido por una translocación del receptor, el cual se integra a la membrana plasmática adoptando una forma de pelo enrollado. El dominio central extracelular del receptor actúa como receptor de la adhesina de la bacteria intimina. Simultáneamente, el receptor mediante sus dominios intracelulares, con diversas proteínas del citoesqueleto, une íntimamente la bacteria al enterocito. Además se produce la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión y acumulación de filamentos de actina en el citoplasma. Esta reducción de la superficie de absorción sería responsable de diarrea sin sangre (Rivas y col., 2008).

La toxina Shiga liberada se une a la célula epitelial del intestino, ésta es luego internalizada en una vesícula en donde inhibe la síntesis proteica y provoca la muerte celular. La toxina puede también ser traslocada desde la membrana apical a la superficie baso lateral, con inducción de Interleuquina-8 (IL-8), que contribuye a la acumulación de leucocitos en la pared intestinal. Produce un daño en las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la lámina propia provocando diarrea sanguinolenta (Rivas y col., 2008).

Luego Stx entra a la circulación sanguínea y es transportada a distintos órganos blanco cuyas células endoteliales poseen receptores. El LPS bacteriano y las citoquinas de huésped aumentan la sensibilidad a las Stxs, incrementando la disponibilidad de dichos receptores. En el riñón se encuentran altos niveles de estos receptores, particularmente en la región cortical donde se observan las principales lesiones en los pacientes con SUH (Rivas y col., 2008).

Las lesiones histopatológicas ocurren por interacción de la Stx con las células endoteliales de los vasos sanguíneos, estas se hinchan y se desprenden a nivel del glomérulo. Simultáneamente se produce un depósito de fibrina y de plaquetas en la microvasculatura renal, se ocluyen los capilares y se reduce el flujo sanguíneo, provocando insuficiencia renal y ruptura de los glóbulos rojos. También se observan lesiones, particularmente en la microvasculatura del intestino, cerebro y páncreas (Rivas y col., 2008).

Figura 3: Modelo de el mecanismo de patogenia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga.



Fuente: Rivas y col, 2008

El serotipo O157:H7 como la mayoría de las cepas STEC altamente patogénicas, coloniza el intestino grueso por medio de una lesión característica de adherencia y borramiento. Esta lesión es inducida por un sistema de secreción tipo III (También presente en EPEC y otros patógenos intestinales) que inyectan proteínas en la célula epitelial, provocando profundos cambios estructurales y funcionales de la célula huésped y en la unión/adherencia íntima de la bacteria al enterocito (Coronel, 2011).

Factores de virulencia

Los dos grupos de Stx son antigénicamente diferentes; el grupo I incluye la variante Stx neutralizadas por anticuerpos de anti toxina Shiga; el grupo II incluye aquellas que no son neutralizadas por dicho antisuero (Gadea y col., 2004).

La molécula de la toxina Stx1, idéntica a la toxina Shiga tipo 1 producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1, presenta tres variantes antigénicas o subtipos (Stx1a, Stx1c y Stx1d), mientras que en el caso de la toxina Stx2 existen siete subtipos (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g). Las cepas que producen la toxina Stx2 (más la presencia del gen *eae*) tienen mayor probabilidad de producir SUH que las que producen la toxina Stx1 o ambas. Concretamente los subtipos Stx2a, Stx2c y Stx2d son los más asociados con patologías graves en enfermedad humana (Otero, 2014).

Otro factor de virulencia es la proteína de membrana externa llamada intimina, codificada por el gen *eae* localizado en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement). Este locus está asociado con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, la iniciación de las señales de transducción y la desorganización de las microvellosidades con la formación de la lesión AE (del inglés, attaching-and-effacing). La presencia de LEE le confiere a las cepas STEC una mayor virulencia, pues los serotipos LEE positivos aparecen más comúnmente asociados a brotes y casos de SUH que los serotipos LEE negativos. Sin embargo, la presencia de LEE no es esencial para la patogénesis, pues se han notificado casos de enfermedad humana severa, incluyendo casos esporádicos de SUH y brotes, asociados a cepas STEC LEE negativas (Rivas y col., 2006).

Los genes que codifican las toxinas Shiga se encuentran localizados en el genoma de bacteriófagos lamboides denominados fagos-Stx. Estos fagos constituyen un grupo heterogéneo de elementos genéticos altamente móviles que pueden insertarse en sitios de unión específicos del cromosoma. Los fagos-Stx de las cepas STEC pueden incluso infectar bacterias comensales del intestino, haciendo que puedan producir Stx y por tanto agravando la enfermedad. Otra característica importante de los fagos-Stx es su estabilidad en el ambiente durante largos periodos de tiempo, pudiendo, como ya se ha dicho, insertarse en bacterias convirtiéndolas en productoras de toxinas Stx (Otero, 2014).

Algunas cepas de STEC producen una enterohemolisina (EHEC-Hly), codificada en el gen *ehxA* del mega plásmido de ésta, la cual estaría involucrada en la patogénesis. Este plásmido también porta los factores de virulencia *espP* (serina proteasa extracelular), *etp* (sistema de secreción tipo II) (Rivas y col., 2006).

Característica de la enfermedad en el humano

Se reconoce que hay un espectro muy amplio de enfermedad humana asociada a organismos productores de Stx. Enfermedades relacionadas con STEC están generalmente involucrado al consumo de alimentos contaminados en la mayoría de los brotes (Paton y Paton, 1998).

Algunos individuos infectados con STEC pueden ser completamente asintomáticos, a pesar de la presencia de un gran número de microorganismos, así como de la toxina libre en las heces (Paton y Paton, 1998).

El período de incubación promedio de la infección por STEC es de 3 días (con un rango de 1-8 días) y el cuadro clínico incluye un período de 1 a 2 días de vómitos, fiebre baja o ausente, dolores abdominales severos en la mayoría de

los casos, diarrea sin sangre y evidencia de edema de la mucosa colónica como síntomas iniciales, seguidos por diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica durante 4 a 6 días (Rivera y Ochoa, 2013).

La presencia de sangre en las heces suele observarse al segundo día del inicio de la diarrea (entre 0 y 5 días) y tiene una duración muy variable. En diversos estudios los vómitos no suelen presentarse en más del 50% de los casos. Entre el 6 y el 42 % de los pacientes, según los autores, presentan fiebre (Prats y col., 1996). La ausencia de fiebre en una paciente con diarrea con sangre puede ser un hallazgo clínico importante para sospechar en esta infección y diferenciarla de los cuadros típicos de disentería por *Shigella*, *Salmonella* o *Campylobacter* (Rivera y Ochoa, 2013).

Aunque la mayoría de los casos la diarrea por STEC es autolimitada, aproximadamente del 5 a 10% de los niños infectados evolucionan a SUH, para el cual no existe tratamiento específico por el momento (Varela y col., 2008). También pudiendo afectar el Sistema nervioso central, páncreas, pulmones y corazón (Otero y col., 2010)

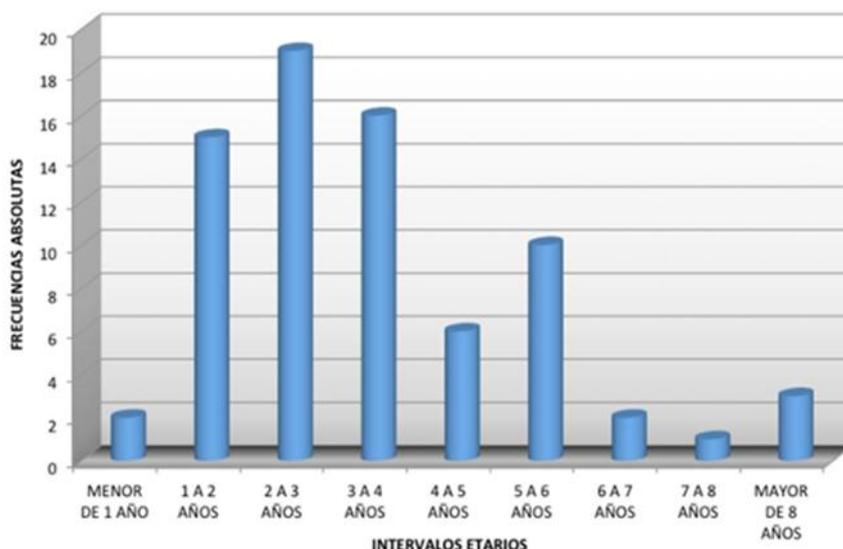
El síndrome urémico hemolítico (SUH) es un trastorno caracterizado por la presencia de la tríada clásica: anemia hemolítica microangiopática trombocitopenia y lesión renal aguda. SUH sin insuficiencia renal aguda se puede confundir con otras enfermedades hematológicas. Hay 2 formas de SUH: típicos (con diarrea en el período prodrómico) y atípicos (sin diarrea en ese período) (Varela y Schelotto, 2015).

El Síndrome Urémico Hemolítico ocurre por la lesión del endotelio vascular que de manera secundaria genera una cascada de fenómenos tales como la adhesión, agregación plaquetaria y el depósito de fibrina mediante distintos mediadores, cuyo resultado final sería la formación de trombos en la microcirculación: la microangiopatía trombótica (Pérez del Campo y col., 2000).

Estudios poblacionales sugieren que aproximadamente el 90% de los casos de SUH están precedidos por diarrea (Coronel, 2011).

En Uruguay, los casos de SUH generalmente ocurren en los meses de verano (primavera, verano y principios de otoño) en niños eutróficos, de hogares con un nivel socioeconómico aceptable, a menudo viven en pequeños pueblos, pero no en las zonas rurales (Varela y Schelotto, 2015). Ocurriendo entre 10 y 15 casos nuevos por año, y la tasa de incidencia es de 4 a 5/100.000 niños menores de 5 años, aproximadamente. En Argentina la OPS considera que el SUH es endémico, con 400 casos nuevos por año (Varela y col., 2008).

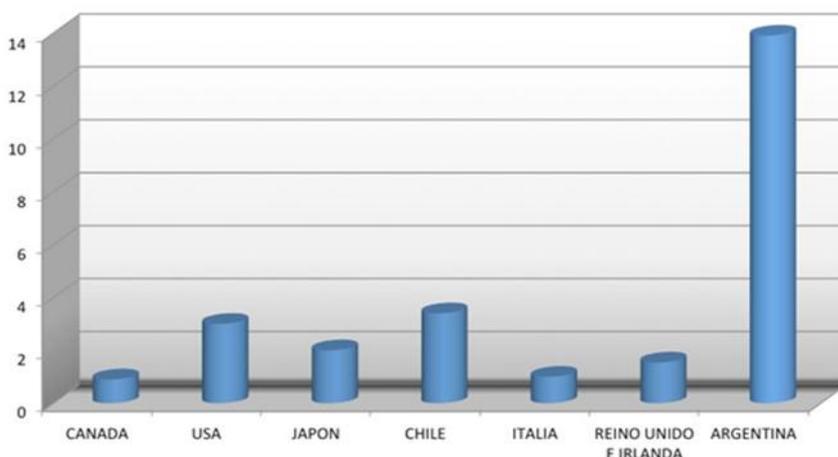
Figura 4: Distribución por edades en casos de SUH atendidos por el Departamento de Epidemiología Alimentaria. Ciudad de Buenos Aires (2007-2011).



Fuente Departamento de Epidemiología Alimentaria- DGHYSA

En la figura 4, podemos observar, que las edades de los menores enfermos en Argentina variaron de menos de un año hasta 13 años, con predominio de la franja etaria de 1 a 4 años (De Sousa, 2014).

Figura 5: Tasa de incidencia /100000 niños de 5 años en diferentes Países.



Fuente Departamento de Epidemiología Alimentaria- DGHYSA

En la figura 5, se puede observar que la tasa de notificación en Argentina, es de 12 casos por cada 100000 niños menores de 5 años, lo que evidencia que esta es 11 veces más que en otros países que padecen esta enfermedad (De Sousa, 2014).

El diagnóstico microbiológico de las infecciones provocadas por STEC es bastante complicado. La liberación de las bacterias en las heces cesa a los pocos días del inicio de la diarrea, el porcentaje de colonias verotoxigénicas puede ser inferior al 1% de las aisladas y los genes que codifican para las verotoxinas pueden perderse al realizar los subcultivos (Blanco, 1995).

Los criterios de laboratorio para el diagnóstico de SUH son:

- 1) Anemia de comienzo agudo, con hemoglobina menor de 10 mg/dl o hematocrito menor de 30% o caída de al menos 5 puntos, con cambios microangiopáticos en el frotis de sangre periférica (esquistocitos, células en casco o fragmentados) (Rivas y col., 2008).
- 2) Injuria renal aguda evidenciada por hematuria, proteinuria, uremia mayor de 50 mg/dl en ausencia de deshidratación o creatinina mayor de dos desviaciones estándar respecto a edad y sexo, o aumentado del 50% de los valores al inicio de la enfermedad (Rivas y col., 2008).
- 3) Recuento de plaquetas menor a $150.000/\text{mm}^3$ (Rivas y col., 2008).

El diagnóstico precoz de la enfermedad y el mejor manejo de la insuficiencia renal aguda y de la anemia disminuyó la letalidad durante el período agudo siendo en la actualidad del 3 al 5%. Sin embargo un 3 al 5% de niños con SUH desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo en pocos años procedimientos dialíticos o trasplante renal. Otro 20% continúa con micro hematuria y grados variables de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal en lapsos variables que pueden llegar a décadas (Rivas y col., 2008).

Diagnóstico

En la mayoría de los casos, las muestras tomadas de animales para aislamiento de STEC son las heces recogidas con fines de inspección o como parte de un estudio epidemiológico después de un brote de enfermedad en humanos. Las muestras se pueden tomar del recto o de heces recién evacuadas en la granja o de contenidos intestinales después del sacrificio. Las muestras deben mantenerse frías y cultivarse tan pronto como sea posible luego de ser recogidas (Manual OIE, 2004).

Considerando que dicho patógeno se encuentra en bajas concentraciones en cualquiera de las matrices evaluadas, heces, cuero, suelo. Carcasa y carnes, hace más desafiante la tarea de su detección y aislamiento (Rovira, 2006; Coronel, 2011).

El diagnóstico debe incluir la demostración de factores de virulencia en los aislamientos. Estos incluyen las Shiga toxinas Stx1 y Stx2 y sus genes; la proteína de adhesión a la membrana exterior asociada con lesiones de unión y eliminación, intimina, codificada por el gen *eae* (Manual OIE, 2004).

Varios medios de enriquecimiento han sido descritos, de los cuales el caldo tríptico de soja modificado con el agregado de novobiocina, parece ser el más adecuado. Estos medios son caldos selectivos que dan una especificidad diferencial favoreciendo el aislamiento de STEC O157, a diferencia de otras bacterias gram negativas en la muestra (Boer y Heuvelink, 2000).

Para el aislamiento de STEC O157, es necesario el pre-enriquecimiento en un caldo no selectivo. El medio más utilizado para este aislamiento de las cepas de STEC O157 típicas no fermentadoras de sorbitol es el Agar Mac Conkey con cefixima y telurito (CT-MAC). Se utiliza la Separación inmunomagnética (IMS) después del enriquecimiento selectivo, este método aumenta la sensibilidad mediante la concentración de *E. coli* O157 en relación con el fondo de la microflora, que pueden crecer demasiado o imitan las células STEC O157 en agares selectivos (Boer y Heuvelink, 2000).

También se han desarrollado otros métodos que disminuyen el tiempo de análisis como son Ensayos de Inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA), Ensayos de inmuno transferencia de colonias, técnicas de filtro de inmuno fluorescencia directa, y varias técnicas de inmuno captura (Boer y Heuvelink, AE, 2000).

Los Inmuno ensayos de enzima para detectar las toxinas Shiga 1 y 2, y ensayo molecular para genes Stx son otros de los métodos utilizados. La técnica de PCR es un método rápido y preciso en lo que a esto respecta (Shams y col., 2013).

El diagnóstico de STEC presenta algunas dificultades que pueden ser minimizadas mediante la combinación de procedimientos bacteriológicos y PCR. Esta última técnica es considerada una alternativa altamente satisfactoria para la detección de STEC. Para obtener un resultado confiable a partir de una técnica de diagnóstico basada en PCR se sugiere utilizar un control positivo, un control negativo y un control "blanco" de reactivos. Además, la inclusión de un control interno de amplificación (IAC) puede evidenciar una falla en cada tubo de reacción, ya sea por la presencia de inhibidores o por un problema particular inherente a la técnica (Leotta y col., 2005).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es el método más rápido, sensible y fiable para la detección de *E. coli* en muestras procedentes de alimentos, ambientales o clínicas. Además, puede utilizarse junto con métodos de cultivo convencionales o métodos de tipado molecular. El uso de la PCR permite la detección de cepas STEC a través de la búsqueda de los genes que codifican para las toxinas Shiga (stx) en muestras microbiológicamente complejas (como heces o alimentos), incluso en caso de que el microorganismo no sea viable (Otero, 2014).

La sensibilidad de la PCR en muestras de heces y alimentos se ha visto aumentada en gran medida mediante la realización de un enriquecimiento previo de estas muestras (Paton y Paton, 1998).

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa permite la amplificación selectiva de secuencias específicas de ADN que se encuentran en cantidades muy pequeñas. Como su nombre indica se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de sintetizar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente (Rojas y González, 2006).

El método de PCR utiliza dos secuencias cortas de oligonucleótidos llamados cebadores que son complementarios a los extremos de la región de ADN que se pretende amplificar. Dado que en cada reacción ambas cadenas de ADN

pueden servir de molde para la síntesis de su cadena complementaria, el número de eventos de replicación está dado por la expresión 2^n , donde n es el número de ciclos de amplificación. Puede notarse que después de 20 ciclos se tendrán más de un millón de copias del ADN original. Uno de los factores que llevan al éxito en la implementación de la PCR para la identificación de microorganismos patógenos, es la elección correcta de la secuencia blanco. Esta secuencia debe permitir la identificación del microorganismo de interés independientemente de la presencia de otras fuentes de ADN (de microorganismos concomitantes o de la muestra misma). Las diferencias en la secuencia de genes ortólogos pueden servir como herramienta útil en la tipificación de diferentes cepas y serotipos de una misma especie o de especies cercanas filogenéticamente (Rojas y González, 2006).

Las secuencias más empleadas para el diseño de cebadores han sido las relacionadas con los genes que codifican para toxinas y proteínas antigénicas específicas para la detección y diagnóstico de *E. coli*, las secuencias blanco por excelencia han sido los genes *stx1* y *stx2* que codifican para las dos variantes de la toxina Shiga, *Stx1* y *Stx2* respectivamente (Rojas y González, 2006).

Hasta ahora todos estos métodos tienen sus propios defectos como ser lentos, muy costosos y tienen limitaciones en el manejo de muchas muestras simultáneamente. En la actualidad, aunque los métodos moleculares como la PCR y la hibridación, a pesar de ser más rápidos, menos costosos y más sensibles, no son adecuados ya que se basan en la electroforesis de agarosa con bromuro de etidio que es carcinógeno, una importante amenaza para la salud del personal del laboratorio, y no permite el análisis de muchas muestras a la vez en el caso de brotes epidémicos. Sin embargo el PCR en tiempo real a pesar de 100% de especificidad y alta sensibilidad no ha ganado mucha atención debido a los altos costos (Leotta y col., 2005).

Prevención y control

Los patógenos están asociados con todo tipo de alimentos. El control de estos tiene que estar incluidos en todas las etapas del proceso, y de la preparación. Sanitización adecuada, las temperaturas adecuadas, cocción, son los procedimientos de control que pueden garantizar la seguridad de los alimentos (Kotula y Pandya, 1995).

La prevención y control requieren un enfoque interdisciplinario entre la producción animal y vegetal, así como enfoques basados en riesgos a lo largo de toda la cadena de abastecimiento de alimentos. Éstos incluyen la aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Fabricación (BPF), Buenas Prácticas de Higiene (BPH) y Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC), desde la granja hasta llegar al consumidor (FAO, 2011).

Para las variedades STEC/ EHEC, es necesario analizar la senda desde la granja al consumidor. Dichos pasos incluyen reducir al mínimo la colonización en los rebaños de ganado y evitar la contaminación con estiércol. En etapas posteriores, se incluye la higiene y manipulación en los mataderos y establecimientos de ordeño durante el envasado de los productos (FAO, 2011).

La protección de la salud humana se basa en conocer y evitar la exposición de los niños y el hombre a las heces de los animales. Las estrategias de control de los microorganismos patógenos consisten en:

- a) Evitar el acceso de los microorganismos a los alimentos
- b) Inhibir el desarrollo
- c) Inactivar los microorganismos.

Entre las medidas que evitan el acceso de los microorganismos a la carne en un frigorífico podemos mencionar: Limpieza profunda de los animales que ingresan, minimizando la materia fecal sobre los animales, uso de equipos limpios y buenas prácticas higiénicas que prevengan la contaminación de las carcasas, evitar la contaminación intestinal durante la evisceración, tomar acciones correctivas si se produce contaminación, en el desosado mantener los equipos limpios y usar prácticas que minimicen la contaminación entre los cortes, usar otras estrategias, por ej., ácidos orgánicos, para descontaminar las carcasas. Esta práctica no está permitida para todos los destinos de exportación y además, los resultados del uso de lavados o intervenciones con ácidos orgánicos frente a *E.coli* O157:H7 muestran datos contradictorios (Michanie, 2003).

En lo que respecta a minimizar el desarrollo de los microorganismos es posible: Asegurar el enfriamiento rápido de las carcasas (Michanie, 2003).

Estrategias de intervención en la industria de la carne

E. coli O157:H7 desencadenó innovaciones tecnológicas, algunas en uso, muchas en desarrollo y por desarrollarse para resolver el conflicto de su presencia sobre las medias reses y luego, como consecuencia, en las carnes picadas. La intervención se ha definido como procedimientos, procesos o tecnología que reducen o eliminan el/los peligros potenciales de un microorganismos productor de enfermedad (Michanie, 2003).

Entre las estrategias de intervención para reducir esta bacteria se han ensayado el spray sobre la carcasa pre evisceración, la aspiración con vacío y vaporizador, el pasteurizador con vapor o con agua cliente, y los ácidos orgánicos, entre otros. Muchos de ellos son de uso corriente en las plantas de algunos países. Otra reciente estrategia por la que han optado algunas empresas en EE.UU., es irradiar los alimentos frecuentemente involucrados como método para controlar los microorganismos patógenos y evitar riesgos al consumidor. No es aventurado afirmar que el proceso innovativo iniciado en el camino de la seguridad sanitaria dará sus frutos y la presión que ejerce el consumidor redundará en la protección y beneficio de la salud (Michanie, 2003).

Los microorganismos patógenos y los saprófitos responsables de la descomposición son introducidos en los mataderos por las aves, diseminándose por las instalaciones, equipamientos y utensilios, entrando de este modo en la cadena alimentaria. La contaminación cruzada durante las operaciones en mataderos es responsable de la diseminación de los microorganismos, cuyo contenido en las carnes y productos cárnicos puede ser

suficientemente elevado para provocar enfermedades en los consumidores. La contaminación de las carcasas y la extensión con que ocurre esta, depende de dos factores, por un lado la higiene del matadero y de sus procesos, por otro el estado higiénico sanitario de las aves destinadas a la masacre (Horta, 2008).

Transporte

La contaminación fecal externa ocurre durante el transporte y reposo en el matadero, una vez que las aves defecan y estas contaminan las jaulas y a ellas mismas. Para reducir esta contaminación, es conveniente que las aves permanezcan en ayuno durante algunas horas antes del transporte, de esta manera se reduce el contenido intestinal, disminuyendo la deposición de materia fecal, evitando la contaminación cruzada (Horta, 2008).

En el caso de los bovinos el ayuno de los animales previo al ingreso al frigorífico, aumenta la excreción de *E. coli*, probablemente a causa de la disminución de ácidos grasos volátiles en el rumen e intestino. Se ha observado que los terneros sometidos a ayuno, o durante el destete, son más susceptibles a la colonización por *E. coli* O157:H7. El control de estos factores de riesgo debería reducir las posibilidades de multiplicación y diseminación de STEC dentro y fuera del establecimiento (Horta, 2008).

El estrés del transporte es natural, este reduce la inmunidad, aumentando la colonización de bacterias intestinales (Keener y col., 2008).

Las operaciones de transporte deben de realizarse en las mejores condiciones con el fin de reducir al mínimo los efectos negativos, los vehículos deben de ser sometidos a una limpieza y desinfectados antes y después de la carga y el transporte, así también las jaulas en donde las cargan (Tan, 2008).

Escaldado

El proceso de escaldado es usado para abrir el folículo de la pluma y así removerla. La contaminación cruzada durante el escaldado es reconocida. Existe una hipótesis de que el folículo podría permanecer abierto hasta el proceso de chiller, donde el folículo se cerraría y los microorganismos podrían quedar retenidos (Tan, 2008).

Desplume

En esta área es donde puede ocurrir la contaminación cruzada, ya que las proyecciones en forma de dedos de goma para quitar la pluma pueden pasar los microorganismos de un ave a otra, hay estudios donde se encontró que después del desplume los recuentos de microorganismos como por ejemplo *Campylobacter* aumentaron significativamente luego del desplume (Tan, 2008).

Lavado de la carcasa

Las canales se lavan comúnmente con los sistemas de arandelas, usando agua clorada para eliminar la contaminación, tal como sangre, fragmentos de tejidos, y la contaminación fecal, como parte del procesamiento el lavado de la canal se ha permitido para las aves desde 1978 como una alternativa al cuchillo de recorte, porque los estudios han mostrado que es igualmente eficaz en la eliminación de la contaminación fecal (Keener y col., 2004).

El desarrollo de nuevos sistemas de lavado hace que sea muy difícil para una planta de procesamiento saber qué tipo o sistema sería mejor para ellos. Los estudios limitados han llevado a cabo en evaluar el rendimiento y la eficacia de las arandelas de aves de corral y desinfección de los tratamientos dentro de la planta de procesamiento (Keener y col., 2004).

Hay varios tipos de lavadoras de la canal que se utilizan actualmente en plantas de procesamiento de aves. Estos incluyen lavadoras de cepillos, el gabinete arandelas y arandelas de aves dentro / fuera. Estos sistemas de lavados utilizan a veces cloro como agente antimicrobiano (Keener y col., 2004).

Los sistemas de lavado que actualmente se utilizan para la superficie interior y exterior han demostrado una eficacia limitada para la eliminación de algunos microorganismos. Lo primero es que el lavado con agua fría, independientemente de la presión y volumen de flujo, no reduce la tensión superficial del agua, un importante factor en la eliminación bacteriana/fecal. Una alternativa es la introducción de surfactantes durante el proceso de lavado para reducir la tensión superficial del agua y ayuda a la eliminación de las bacterias de la materia fecal (Keener y col., 2004).

Enfriado de carcasas “chiller”

Se requiere que las canales de las aves se enfríen rápidamente para evitar así el crecimiento bacteriano. Muchos procesos de enfriamiento utilizan agua ya que ésta enfría rápidamente. En el tanque de refrigeración, la cloración con hasta 50 mg / L a pH 6,0 se requiere para controlar la contaminación cruzada de canales de aves debido a la mayor carga orgánica. Para reducir la contaminación cruzada USDA ha requerido la adición de 20 a 50 ppm de cloro para enfriadores de agua para evitar la contaminación cruzada. USDA también ha permitido, además de cloro, el uso de ozono y el dióxido de cloro en enfriadores para así evitar la contaminación cruzada. Además, los investigadores y la industria están explorando aire y enfriamiento con nitrógeno criogénico (Keener y col., 2004).

COLIBACILOSIS AVIAR

Colibacilosis aviar es una enfermedad infecciosa de las aves causada por *E. coli*, que se considera como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, asociada con fuertes pérdidas económicas a la industria de aves de corral, ya sea como patógeno primario o como un patógeno secundario (Kabir, 2010; Carranza y col., 2012).

Colibacilosis aviar o enfermedad sistémica de las aves es causada por un grupo de patógenos designado *E. coli* aviar altamente patógeno (APEC). A pesar de ser conocido por más de un siglo, la colibacilosis aviar sigue siendo una de las principales enfermedades endémicas que afectan a la industria avícola en todo el mundo (Dziva y Stevens, 2008).

Dependiendo del estado de virulencia de la cepa, la presencia y el tipo de factores de predisposición, la infección se manifiesta como una septicemia inicial que es seguido por muerte súbita o la inflamación en múltiples órganos (Dziva y Stevens, 2008).

Esto causa una variedad de manifestaciones de la enfermedad, incluyendo la infección del saco vitelino, onfalitis, infección de las vías respiratorias, síndrome de la cabeza hinchada, la septicemia, poliserositis, coligranuloma, enteritis, celulitis y salpingitis. Colibacilosis de aves de corral se caracteriza en su forma aguda por la septicemia que resulta en la muerte y en su forma subaguda por peri-carditis, aerosaculitis y peri-hepatitis (Kabir, 2010).

Sorprendentemente, la localización intestinal de APEC ofrece una excelente oportunidad para la diseminación en el medio ambiente y la transmisión a través de las heces. APEC se ha informado a persistir en el ambiente seco, y el polvo en los gallineros puede albergar hasta 10^6 unidades formadoras de colonias de *E. coli* por gramo. La inhalación de este polvo contaminado se cree que conduce a infecciones sistémicas. La infección de los huevos puede ocurrir en la puesta o durante la formación en el oviducto, a menudo conduce a embrión y mortalidad de los pollitos antes de tiempo (Dziva y Stevens, 2008).

En la faena, las cepas resistentes en el intestino, pueden contaminar fácilmente las canales de aves y el suelo trayendo como consecuencia la contaminación de la carne con cepas multirresistente de *E. coli*. Del mismo modo los huevos se contaminan durante la colocación. Por lo tanto, las cepas resistentes de *E. coli* de aves de corral puede infectar a los humanos tanto directamente como a través de los alimentos (Kabir, 2010).

La seguridad de alimentos es una preocupación creciente de salud pública en todo el mundo. Informes epidemiológicos sugieren que la carne de ave sigue siendo la principal causa de intoxicación alimentaria humana. La carne de ave es más popular en el mercado de consumo debido a las ventajas, tal como fácil digestibilidad y la aceptación por parte de la mayoría de las personas. Sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos y de deterioro de la carne de aves de corral y sus derivados sigue siendo una preocupación importante para los proveedores, los consumidores y los funcionarios de salud pública en todo el mundo. *E. coli* y *Salmonella* han sido consistentemente asociados con las enfermedades transmitidas por los alimentos en la mayoría de los países del mundo (Kabir, 2010).

PRODUCCIÓN EN EL SECTOR AVÍCOLA

El mercado mundial

La capacidad de la aves para adaptarse a la mayoría de las áreas del mundo, su bajo valor económico por animal, la rápida velocidad de crecimiento, y su rápida reproducción, hacen que las aves sean un punto de arranque ideal para una dedicación a la producción animal al mismo tiempo que constituyen una rica fuente de alimento para el hombre (Mountney y Parkhurst, 2001).

La producción mundial total de carnes en 2015 se estima en 257 millones de toneladas según el USDA. La carne aviar constituye el 35% de dicho volumen, alrededor de 89,3 millones de toneladas. Siendo la segunda en importancia en volumen de producción luego de la de cerdo (OPYPA, 2015).

La producción mundial de la carne de pollo siguió creciendo a una tasa de casi 2%, con Brasil superando a China y ocupando el segundo lugar después de EEUU. Sin embargo las exportaciones, que son lideradas por Brasil,

retrocedieron en 2015 debido al brote de Influenza Aviar registrado en EEUU que tuvo consecuencias en el comercio internacional (OPYPA, 2015).

Esta oportunidad no pudo ser aprovechada por Uruguay, en donde la cadena avícola registro un nivel de producción algo menor al del año anterior, cayendo en forma importante los niveles de exportación los que fueron compensados parcialmente por un leve aumento del nivel de consumo interno per cápita (OPYPA, 2015).

Las políticas públicas hacia el sector continuaron priorizando el logro de condiciones de bioseguridad en las granjas e inocuidad del producto final de forma de habilitar el origen país en el mercado internacional, por entender que el crecimiento hacia la exportación es el objetivo principal (OPYPA, 2015).

Claramente cuatro productores lideran el ranking: EEUU, Brasil, China y la Unión Europea durante el 2015 (OPYPA, 2015).

Las enfermedades, y en especial la influenza aviar de fuerte prevalencia en Asia, son un factor depresivo de la producción, importante por su influencia sobre los costos y el acceso a mercados. Particularmente en China, fueron determinantes en el estancamiento de su producción. Sin embargo, este factor presenta efectos en la dirección contraria. La suspensión o cierre de los mercados de aves vivas, tan importantes en esas áreas, ceden terreno a la modernización de la comercialización avícola en base a congelados y refrigerados, y más recientemente a los preparados de carne de pollo como nueva tendencia (OPYPA, 2015).

Con respecto a los países del Cono Sur, además del liderazgo mundial de Brasil, se destaca la caída de Argentina de un 20% en sus exportaciones, aunque mantiene el nivel de producción estable. El tercer exportador es Chile, con 95 mil toneladas para el año 2015 de las casi 600 mil que produce, cifra mayor que toda la producción de Uruguay (OPYPA, 2015).

El consumo de carne de pollo a nivel mundial se estima en 15 kilos por habitante, con grandes variaciones según regiones y países. En países productores como Brasil y USA se estiman consumos de 47 y 26 kilos por habitante respectivamente, mientras que en regiones en desarrollo como Asia, el consumo de carne aviar es más reducido estimándose en 14 kilos por habitante para China y 2,6 kilos por habitante para India, de progresivo crecimiento por el incremento acelerado de su población y la mejora de amplios sectores medios (OPYPA, 2015).

La producción nacional

La producción de carne de pollo durante 2015 culminaría con una caída del 11% con respecto al año 2014, debido a la caída del principal mercado de exportación a partir del 15 de setiembre de 2014 (OPYPA, 2015).

La diferencia significativa en exportaciones entre 2015 y 2014 determinó dos efectos principales: la caída de la producción total en aproximadamente un 10% y el re direccionamiento al mercado interno de una porción menor de esa caída al elevarse levemente el consumo per cápita (OPYPA, 2015).

El consumo Interno de carne de pollo en nuestro país durante el 2015 aumentó como destino de la producción con el 93 % de remisión. El consumo per cápita de carne de pollo se situó para este año en 24,4 kilogramos apenas superior al del año anterior siendo el máximo valor histórico de la serie disponible (OPYPA, 2015).

COMPOSICION DE LA CARNE DE POLLO

La carne es la parte muscular comestible de bovinos, ovinos, caprinos, suinos, equinos, aves y conejos, declarada apta para la alimentación humana por la inspección veterinaria oficial, antes y después de la faena, constituida por todos los tejidos que rodean el esqueleto, incluyendo su cobertura grasa, tendones, vasos nerviosos, aponeurosis, ligamentos, cartílagos y todos aquellos tejidos no separados durante la operación de la faena (RBN, 2012).

La carne puede formar parte de una dieta equilibrada, aportando valiosos nutrientes beneficiosos para la salud. La carne y los productos cárnicos contienen importantes niveles de proteínas, vitaminas, minerales y micronutrientes, esenciales para el crecimiento y el desarrollo (FAO, 2014).

Las carnes de diversas especies han constituido desde la antigüedad un alimento básico en la dieta del hombre, no solo por sus propiedades sino también por ser muy fácil de preparar y se puede diversificar mucho en su forma de cocinado (Codony y col., 2011).

Las recomendaciones y guías dietéticas, emitidas por diversos Institutos, Sociedades y Administraciones de diversos países incluyen la carne de pollo dentro de aquellas que pueden ser consumidas con mayor frecuencia (USDA, 2010).

La carne de ave es una buena fuente de proteínas, teniendo más proteínas que las carnes rojas. Scott (1956) indicó que la carne de ave cocinada, excluida las vísceras comestibles, contenía del 25 al 35 % de proteína dependiendo de la parte de la canal y del método de preparación. La carne vacuna tiene de 21 a 27%, la de cerdo de 23 a 24% y la de cordero de 21 a 24% (Mountney y Parkhurst, 2001).

La carne de ave contiene proteínas de alta calidad. Es fácilmente digestible y contiene todos los aminoácidos esenciales, que actualmente se sabe deben estar presentes en las dietas humanas (Mountney y Parkhurst, 2001).

El contenido graso de las canales de ave varía con la edad, sexo y especie de ave. La parte de la canal de la que se toma la grasa también influye considerablemente en el contenido graso. A diferencia de las carnes rojas, la mayoría de la grasa de la carne de ave se encuentra debajo de la piel en vez de estar distribuida por los tejidos. La carne de la pechuga de los pollos cocinados contiene solo el 1,3%, los cortes de ternera 11%, y los de vaca 13,30% (Mountney y Parkhurst, 2001).

Bird (1943) indicó que la carne de ave es una buena fuente de niacina y una fuente moderadamente buena de riboflavina, tiamina y ácido ascórbico. Harshaw (1942) señaló que la carne de ave contiene sodio, potasio, magnesio, calcio, hierro, fósforo, azufre, yodo y cloro (Mountney y Parkhurst, 2001).

FUNDAMENTACIÓN DEL TEMA

Si bien la prevalencia de STEC en aves destinadas al consumo humano se considera mínima en comparación con otras especies, es importante establecer qué rol tiene el pollo como reservorio de *E. coli* productor de toxina Shiga, dado a que en nuestro país el consumo de carne de pollo ha aumentado en los últimos años, y que en Argentina ocupa el segundo lugar como alimento relacionado en casos de SUH. Las canales de pollo presentan un índice de carga microbiana post sacrificio muy superior al de otras especies no avícolas. Esto es así, dado que la piel, llega al producto final. Existen escasos reportes de prevalencia de STEC en pollos, y esta es un área inexplorada a nivel local.

HIPÓTESIS

Los pollos destinados al abasto son portadores de cepas STEC que producen enfermedad severa en seres humanos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Detectar la presencia de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en aves destinadas para el consumo humano (Pollos).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar el genotipo de virulencia de las cepas recuperadas.
- 2) Determinar los serotipos de las cepas recuperadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

El muestreo fue realizado en los meses de Enero, Febrero y Marzo del 2016, en una planta de faena del Departamento de Canelones, Uruguay. El análisis de las muestras fue realizado en el Instituto de Higiene de Facultad de Medicina, Sector Bacteriología.

Previo a la toma de muestra se realizó el medio de enriquecimiento, donde colocamos las muestras luego de extraídas.

El medio utilizado fue: Caldo tríptico de soja modificado (m-TSB) con el agregado de novobiocina al 8%

Figura 6: Caldo tríptico de soja Modificado (izquierda), tríptico de Soja con novobiocina (derecha)



Se calculó cuanto tendría que llevar de cada uno de los medios, ya que nuestro objetivo era que tuviera novobiocina al 8%, utilizando un volumen total de 150 ml, por lo que los cálculos realizados fueron:

$$43,02 \text{ g m-TSB con novobiocina} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 1000 \text{ ml}$$
$$\quad \quad \quad \times \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 150 \text{ ml (volumen de cada tubo)}$$

$$x = 6,453 \text{ g}$$

$$6,453 \text{ g} \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 20\% \text{ (concentración del m-TSB con novobiocina)}$$

$$\times \quad \underline{\hspace{2cm}} \quad 8\%$$

$X = 2,6 \text{ g m-TSB con novobiocina}$

6,453 g – 2,6 g =

3,9 g de m-TSB sin novobiocina

Luego de hacer los cálculos, se pesó la cantidad de medio necesaria para 15 tubos de 10 ml cada uno, 3,9 g de m-TSB sin novobiocina, y 2,6 de m-TSB con Novobiocina. Colocamos el medio dentro de un frasco de vidrio, se agregó 150 ml de agua destilada, mezclándolo hasta disolverse. Fraccionamos en 15 tubos con 10 ml cada uno, y lo llevamos a autoclave por 15 minutos a 121°C.

Figura 7: Autoclave.



Las muestras fueron tomadas a partir de pollos criados para consumo humano, provenientes de sistemas de cría intensiva.

Figura 8: Cría intensiva de pollos.



Fuente: Association of Poultry Processors and Poultry Trade in the EU countries

La toma de muestra se realizó en la línea de faena luego de la muerte del animal, se tomaron 66 muestras (n= 66), con un hisopo de algodón estéril, introduciéndolo 2 cms en la cloaca y rotándolo varias veces.

Figura 9: Toma de muestras



Las muestras se colocaron en caldo digerido trípico de soja-modificado con el agregado novobiocina 8 μ g/ml (m-TSB novobiocina).

Las muestras se incubaron en aerobiosis a 37° C por 18-24 horas; pasado el tiempo de incubación se retiraron 100 μ l de cada cultivo colocándolo en tubos eppendorf, luego se centrifugó a 13000 rpm máximo 10 minutos, y se extrajo el sobrenadante, dejando solamente el pellet, que se resuspendió en 500 μ l de agua miliq. La extracción del ADN se realizó según protocolo utilizado por el laboratorio de Bacteriología y Virología del Instituto de Higiene de la Facultad de Medicina de la Universidad de la República, se calentaron a 100°C durante 10 minutos, se enfriaron a 4-5°C durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 13.000 rpm durante 10 minutos. Retiramos 90 μ l del sobrenadante que se conservó a -20° C hasta su procesamiento.

Figura 10: Tubos eppendorf luego de extracción del ADN.



La detección de genes que codifican para Stx se realizó por reacción en cadena de polimerasa (PCR), la técnica de PCR tiene un 100% de especificidad y un 90% de sensibilidad, para detectar los genes de Stx, utilizando los cebadores especificados en el cuadro 5.

Cuadro 5: Cebadores utilizados en la técnica de PCR para detección de genes:

Gen	Cebadores	Secuencia Nucleotídica (5'-3')	Temperatura de Annealing	Tamaño del amplicón
16s	<i>E. coli</i> R	ACCGCTGGCAACAAAGGATA	54° C	401 pb
	<i>E. coli</i> F	CCCCCTGGACGAAGACTGAC		
Stx1	STX1 R	AGCGATGCAGCTATTAATAA	54° C	130 pb
	STX1 F	GAAGAGTCCGTGGGATTAGG		
Stx2	STX2 R	GCTCTGGATGCATCTCTGGT	54° C	349 pb
	STX2 F	TTAACCAACAACCCACCGGGCAGT		

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 µl de una mezcla de reacción con las siguientes concentraciones finales: dNTPs a 0,4 mM, Cl₂Mg a 3,5 mM, 1U de Taq polimerasa, y 2,5µl de ADN molde. En cuanto a los cebadores se utilizaron: 2µl VT1 a 0,6 µM y 0,2 µM de VT2, 0,15 µM de *E. coli*, este último utilizado para control de interno de la reacción. El programa de PCR utilizado fue el siguiente: un paso de desnaturalización inicial a 95°C por 5 minutos; seguido de: 95°C por 1 minuto, 54°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, estos 3 por 35 ciclos; y luego una extensión final a 72°C por 10 min. La

reacción se realizó en un termociclador Gene Amp PCR System 2700 Applied Biosystem.

Figura 11: Termociclador



Las muestras fueron corridas en geles de agarosa al 2% por la técnica de electroforesis sumergida, luego teñidos en una solución de bromuro de etidio (0,5 µg/ml), observados y fotografiados bajo luz ultravioleta. Los caldos se conservarán a 4°C hasta su procesamiento posterior en caso de dar resultados positivos por PCR.

Figura 12: Agarosa

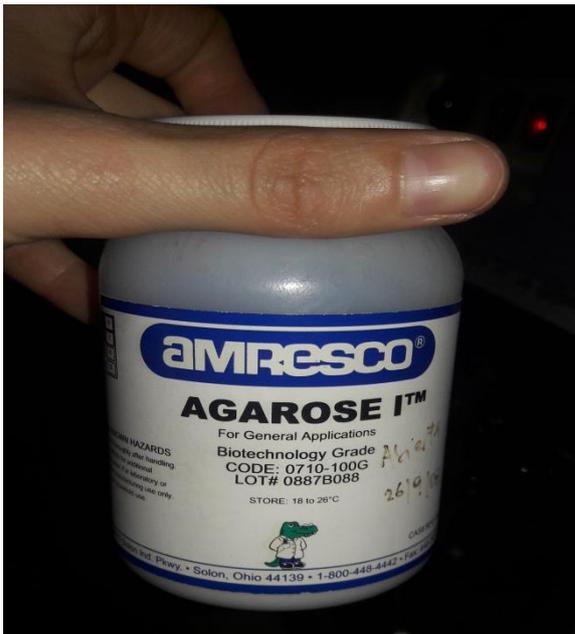
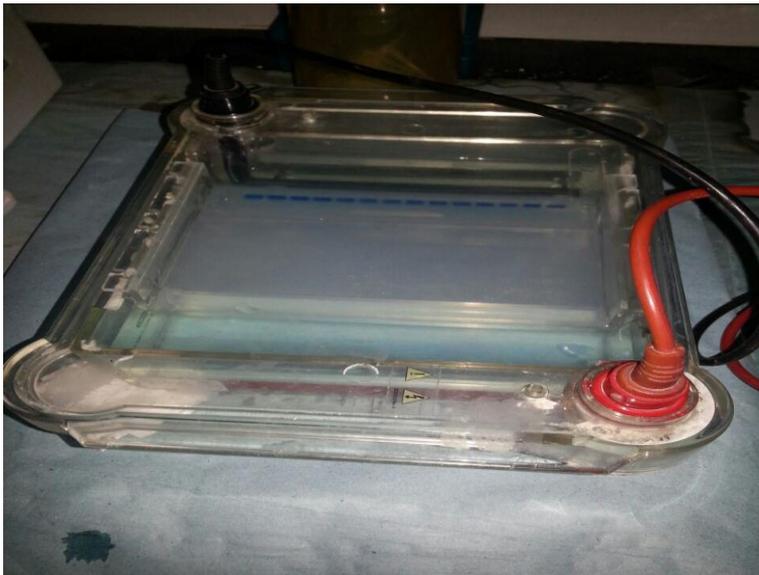


Figura 13: Electroforesis sumergida



Para la recuperación de *E. coli*, de la muestra positiva se tomó una alícuota del caldo la que fue sembrada en placas de agar Mac Conkey e incubadas por 24 hrs a 37° C. Por cada placa se analizaron por PCR hasta 40 colonias sospechosas de *E. coli* (lactosa positivas, centro rosado intenso).

RESULTADOS:

Uno de 66 animales (1,5 %) mostró resultados positivos por PCR para el gen *stx 2* (ver cuadro 7).

A pesar de estudiar más de 40 colonias individuales en el reisolamiento en placas de MCL no se pudieron recuperar las cepas STEC.

A continuación, se presenta en el cuadro 6 las fechas de muestreo, número de muestras y sus resultados para las pruebas de PCR y MCL.

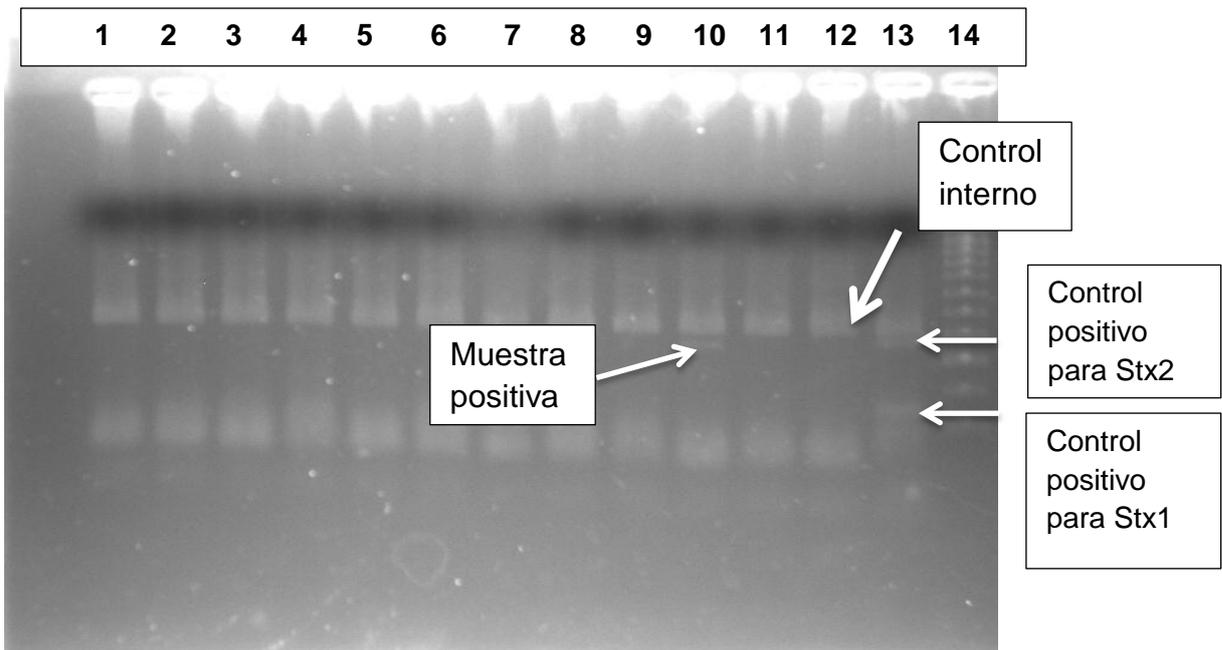
Cuadro 6: Resultados

Fecha	Numero de muestras	Positivas a genes de virulencia de <i>Stx2</i>	Aislamiento <i>E. coli</i>	MCL para	Recuperación de cepas de STEC
11/01/2016	10	0			
18/01/2016	10	0			
25/01/2016	10	0			
01/02/2016	12	1	Positivo		Negativo
15/02/2016	12	0			
24/02/2016	12	0			

Cuadro7: Resultados obtenidos por PCR para *Stx 1* y *2*

	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
Muestras positivas	0	1
Muestras negativas	66	65
Total	66	66

Figura 14: Fotografía de gel que revela presencia de genes de Stx2.



DISCUSIÓN - CONCLUSIONES

El ganado se considera el principal reservorio de *E. coli* productor de toxina Shiga por lo que hay una gran cantidad de estudios sobre este reservorio (Wells y col., 1991; Blanco y col., 1996; Wang y col., 1996; Blanco y col., 1997; Pradel y col., 2000; Fernández y Padola, 2012) con una capacidad de contaminar el alimento por la piel contaminada, o con el contenido intestinal de las carcasas de portadores clínicamente sanos en la faena.

Si bien no se logró recuperar el agente, en una de las 66 muestras analizadas (1,5%) se encontró por la técnica de PCR, señal positiva para el gen de *Stx 2*. Por lo tanto concluimos que en las muestras estudiadas las aves (pollos) no son portadoras de cepas de STEC que producen enfermedad severa en el ser humano, si son portadoras de genes de *Stx 2* presentes en cepas STEC, que producen enfermedad severa en el ser humano. Al no haber recuperado dichas cepas, no se pudo determinar serotipo.

Nuestros resultados parecen confirmar la baja prevalencia de STEC en pollos reportada en otros lugares del mundo (Irwin y col., 1989; Beutin y col., 1993; Chapman y col., 1997; Heuvelink y col., 1999; Bahiraei y Rahimi, 2015).

Sin embargo, se ha demostrado la capacidad de *E. coli* O157:H7 de colonizar la mucosa intestinal de pollos, particularmente en ciego, y diseminarse al ambiente (Beery y col., 1985; Best y col., 2005; La Ragione y col., 2005, Stavric y col., 1992; Pilpcinec y col., 1999), lo cual significa que los pollos pueden actuar como hospedadores o reservorios de *E. coli* O157:H7, e indica una posible amenaza a la salud pública.

Se reveló la presencia de cepas de STEC en aves de corral que codifican para genes de *Stx 1* y *2* en muestras de heces de pollo en el noroeste de Irán, lo que sugiere que puede jugar como una importante fuente de contaminación para las personas que trabajan en las granjas de engorde o están en contacto con las canales de pollo en las plantas de procesamiento (Tabatabaei y col., 2012).

En la región de Ribeirao Preto en Brasil se obtuvieron muestras de materia fecal de gallinas las cuales fueron positivas para genes de *Stx1* y *Stx2*. (Borzi y col., 2015). Este estudio solamente utilizó la técnica de PCR.

Existen estudios que revelan la presencia de cepas de STEC aisladas de carne vacuna, cerdo, pollo y productos ovinos (Doyle y Schoeni, 1987; Heuvelink y col., 1999). También estudios sugieren la presencia de cepas de STEC en carne picada de res, cerdo, pollo, ciervo, jabalíes. (Magwedere y col., 2013)

Datos obtenidos por Heuvelink demuestran que los pavos son portadores de *E. coli* O157, mientras éste no fue aislado en las muestras de materia fecal en pollos (Heuvelink y col., 1999). En otras especies de aves también fue aislado, como en el caso de las palomas en Japón (Murakami y col., 2014) y en palomas, gaviotas y periquitos en Brasil (Reple y col., 2015).

Estudios muestran que los ovinos saludables pueden albergar STEC O157 (Beutin y col., 1993; Blanco y col., 1997; Heuvelink y col., 1999).

También estudios demuestran que las cabras, cerdos, gatos y perros pueden ser portadores de STEC (Beutin y col., 1993).

Existen datos sobre inoculación de *E. coli* en pollos, los que indican que los pollos si se exponen a un gran número de *E. coli* O157:H7, pueden servir como reservorio de éstas bacterias. Los estudios que se realizaron indican que un gran número (> 10⁵ UFC / g) de *E. coli* O157:H7 pueden excretarse en las heces de los pollos por más de 5 meses después de exposición oral a 10⁸ células de este organismo (Beery y col., 1984) lo cual significaría que los pollos pueden actuar como hospedadores o reservorios de *E. coli* O157:H7, e indica una posible amenaza a la salud pública.

Con estos resultados podemos inferir que los pollos criados para consumo humano, en nuestras condiciones de producción, son probablemente una fuente poco relevante de *E. coli* productor de toxina Shiga.

Debe considerarse además, que en los sistemas de crianza intensiva es frecuente la utilización de antibióticos en tratamientos masivos, a través del agua o el alimento, esto podría explicar el resultado de la señal positiva para Stx2, y que éste no se haya re aislado, no podemos afirmar que es *E. coli*. Hay circunstancias que pueden explicar el resultado negativo al reaislamiento, ya que este gen lo tiene habitualmente STEC, lo tiene Citrobacter y lo podría tener cualquier otra bacteria que sea permisiva a que el fago se introduzca en el genoma y ésta lo replica como material genético propio. Otro motivo puede ser que la bacteria esté muerta, dado a que el tiempo que transcurrió entre que detectamos el gen y que se volvió al caldo el mismo se mantuvo a 4° C, para su reaislamiento.

Es por eso necesario continuar con este tipo de investigaciones, con un mayor número de muestras, en más establecimientos de faena y en etapas sucesivas de la cadena de comercialización.

Sería interesante hacer la secuenciación de los fragmentos de PCR para confirmar la presencia de Stx2, ya que el tamaño corresponde a la esperada pero tendríamos que determinar la secuencia.

BIBLIOGRAFIA

1. Acuña M., Alfonso, A., Algorta, G., Anchieri, D., Betancor, L., Chabalgoity, A., Chiparelli, H., Da Silva, A., Deambrosis, N., Ferrari, A., Gadea, P., Gularte, E., Legani, M., Lindner, C., Macedo, M., Martínez, A., Mateos, S., Mattera, A., Medina, D., Montano, A., Odizzio, M., Pérez, M., Repiso, V., Rodríguez, G., Salvatella, R., Savio, M., Schelotto, F., Torres, E., Varela, G., Vicentino, W. (2002). Enfermedades transmitidas por alimentos en Uruguay. Disponible en: <http://docplayer.es/12735381-Escherichia-coli-a-la-bacteria.html> Fecha de consulta: 20/01/2016.
2. Amorín, M., Schelotto, F., Chiparelli, H. (1999). Agentes de diarrea, gastroenteritis. Temas de Bacteriología y Virología para CEFA. Librería Médica Editorial, 303 - 322.
3. Anuario OPYPA. (2015). Oficina de Programación y Política Agropecuaria. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,opypa,opypa-anuario-2015,O,es,0>, Fecha de consulta: 20/04/2016.
4. Bahiraei, P., Rahimi, M. (2015). Rate of infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in commercial layer chickens in Kermanshah province, Iran. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences*, 5:304-308.
5. Barrientos Rangel, B. (2011). Bacteriología en el complejo respiratorio de las aves. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Disponible en: <https://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/bacteriologia-complejo-respiratorio-aves-t3355/165-p0.htm>, Fecha de consulta: 20/01/2016.
6. Beery, J., Doyle M., Schoeni, J. (1985). Colonization of chicken cecae by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:310-315.
7. Best, A., La Ragione, R., Sayers, A., Woodward, M. (2005). Role for flagella but not intimin in the persistent infection of the gastrointestinal tissues of specific pathogen free chicks by Shiga toxin negative *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and immunity*, 73:1836-1846.
8. Beutin, L., Geier, D., Steinrück, H., Zimmermann, S., Scheutz, F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2483-2488.

9. Blanco, J. (1995). *Escherichia coli* toxigenicos en muestras clínicas y alimentos. Mecanismo de patogénesis de *E. coli* enteropatogenos para conejos y septicémicos aviares. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Veterinaria.
10. Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Gonzalez, E. A., Mora, A., Prado, C., Alonso, M. P. (1996). Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other verotoxin-producing *E. coli* in healthy cattle. *Epidemiology and infection*, 117:251-257.
11. Blanco, M., Blanco, J. E., Blanco, J., Mora, A., Prado, C., Alonso, M., Juárez, A. (1997). Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary microbiology*, 54:309-319.
12. Boer, E., Heuvelink, A. E. (2000). Methods for the detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, 88:133S-143.
13. Borzi, M., Oliveira, E., Cardozo, M., Avila, F. A. (2015). Revista A.R.S Veterinaria. Brasil. Disponible en: <http://arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/913> Fecha de consulta: 21/12/2015
14. Brandal, L., Wester, A., Lange, H., Løbersli, I., Lindstedt, B. A., Vold, L., Kapperud, G. (2015). Shiga toxin-producing *escherichia coli* infections in Norway, 1992–2012: characterization of isolates and identification of risk factors for haemolytic uremic syndrome. *BMC infectious diseases*, 15:1.
15. Briones, C., Parro, V., Moreno, M., Garrido, P., Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. (2010) “Método y kit para la detección e identificación de estirpes de *Escherichiacoli* diarreagénicos”. <http://patentados.com/patente/metodo-kit-deteccion-e-identificacion-estirpes-escherichia/> Fecha de consulta: 17/12/2015.
16. Brogna, A., González, G. (2008). Síndrome urémico hemolítico. *Bromatología* (Buenos Aires), 36:49-54.
17. Carranza, C., León, R., Falcón, N., Neumann, A., Kromm, C. (2012). Characterization and distribution of potentially avian pathogenic *Escherichia coli* isolates from broilers in Peru. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* (RIVEP), 23:209-219.
18. Castañeda, D., Braña, C., Cortés, R., Martínez W. (2013). Calidad Microbiologica de la carne de pollo. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/Documents/MANUALES%20INIF>

[AP/19.%20Calidad%20microbiol%C3%B3gica%20de%20la%20carne%20de%20pollo.pdf](#) Fecha de consulta: 24/02/2016.

19. Chapman, P., Siddons, C., Malo, A., Harkin, M. A. (1997). A 1 year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection*, 119:245-250.
20. 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*, 20:11-14
21. CODEX, (2004). Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/codex/meetings/CCFH/CCFH36/fh0410bs.pdf>. Fecha de consulta: 20/11/2015
22. Codony, R., Guardiola, F., Bou, R. (2011). Disponible en: <https://100per100salut.files.wordpress.com/2012/11/informe-nutricional-federacio-avicola-def1.pdf> Fecha de consulta: 20/04/2016
23. Coronel, E. (2011). Tesis de grado, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica. "Escherichia coli O157:H7 productora de toxina Shiga y otras STEC de relevancia en la industria cárnica en Uruguay".
24. De Sousa, Y. (2014). Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos102/sindrome-uremico-hemolitico-argentina/sindrome-uremico-hemolitico-argentina.shtml> Fecha de consulta: 20/04/2016.
25. Dirección General de Higiene y Seguridad Alimentaria– DGHYSA. Disponible en: http://www.buenosaires.gob.ar/sites/gcaba/files/texto_web_estadisticas_suh_2008-2014.pdf Fecha de consulta: 20/12/2015
26. Doyle, M., y Schoeni, J. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2394-2396.
27. Doyle, M., Beuchat, L., Montville, T. (2001) *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. España, Acribia. 799.
28. Dziva, F., Stevens, M. (2008). Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37:355-366.
29. Engdaw, T., Temesgen, W. (2016). O157:H7 Serotype of *Escherichia coli* as an Important Emerging Zoonosis. Disponible en: [http://idosi.org/ijmr/ijmr7\(1\)16/2.pdf](http://idosi.org/ijmr/ijmr7(1)16/2.pdf) Fecha de consulta: 17/04/2016.

30. EFSA y ECDC, (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2011. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3129.htm> Fecha de consulta 20/12/2016.
31. Eppinger, M., Mammel, M., Leclerc, J., Ravel, J., Cebula, T. (2011). Genomic anatomy of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108:142-147.
32. Fernández Fuentes, F. (2006). Evaluación de la inocuidad alimentaria en el primer eslabón de la cadena de producción de carne en el Uruguay. Tesis de Maestría en Salud Animal, Montevideo Uruguay, Facultad de Veterinaria, Universidad de la Republica.
33. Fernández, D., Padola, N. (2012). *Escherichia coli* verocitotóxico: varias cuestiones, y los tambos también. Revista argentina de microbiología, 44:312-323.
34. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Prevención de E. Coli en alimentos. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf Fecha de consulta: 21/03/2015
35. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2014). Disponible en: <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html> Fecha de consulta: 20/04/2016
36. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Prevención de E. coli en los alimentos. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf Fecha de consulta: 10/02/2016
37. Fukushima, H., Hoshina, K., Gomyoda, M. (1999). Long Term Survival of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* O26, O111, and O157 in Bovine Feces. Applied and environmental microbiology, 65:177-181.
38. Gadea, M. D. P., Varela, G., Bernadá, M., Sirok, A., Mota, M. I., Sabelli, R., Rivas, M. (2004). Primer aislamiento en Uruguay de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga del serotipo O157:H7 en una niña con síndrome urémico hemolítico. Revista Médica del Uruguay, 20:79-81.
39. Gibert Perelló, M. (2010). Detección y caracterización de aislados de "*escherichia coli*" de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras. Disponible en: <http://eprints.sim.ucm.es/10514/1/T31540.pdf> Fecha de consulta: 21/04/2016

40. Griffin, P., y Tauxe, R. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiologic reviews*, 13:60-98.
41. Harrington, S., Dudley, E., Nataro, J. (2005). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2005.00005.x/epdf> Fecha de consulta: 15/01/2016.
42. Heiman, K., Mody, R., Johnson, S., Griffin, P., Gould, L. (2015). *Escherichia coli* O157 Outbreaks in the United States, 2003–2012. *Emerging infectious diseases*, 21:1293-1301.
43. Heuvelink, A. E., Zwartkruis-Nahuis, J. T. M., Van Den Biggelaar, F. L. A. M., Van Leeuwen, W. J., De Boer, E. (1999). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 67-75.
44. Horta, J. (2008). Requisitos para a implementação do HACCP em matadouros de aves. Disponible en: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/840/3/Requisitos%20para%20a%20implementa%C3%A7ao%20do%20HACCP%20em%20matadouros%20de%20aves.pdf> Fecha de consulta: 10/02/2016
45. Hussein, H. S., Sakuma, T. (2005). Invited review: prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy cattle and their products. *Journal of Dairy Science*, 88:450-465.
46. Irwin, R., McEwen, S., Clarke, R., Meek, A. (1989). The prevalence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* and antimicrobial resistance patterns of nonverocytotoxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in Ontario broiler chickens. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 53:411-418.
47. Jane, A. (2014). *Escherichia coli* and Genetics. Disponible en: <https://immunologytoday.wordpress.com/2015/11/06/investigation/> fecha de consulta: 04/04/2016.
48. Jure, M., Marina S. Condorí, M. S., Terrazzino, G., Catalána, M., Alejandro López Campo, A., Zolezzi, G., Chinen I., Rivas, M., Castillo M., (2015). *Revista Argentina de Microbiología* 2015; 47(2):125-131 disponible en: <file:///D:/Documents/Downloads/03072015.5.pdf> Fecha de consulta: 23/03/2016.

49. Kabir, S. (2010). Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. *International journal of environmental research and public health*, 7:89-114.
50. Kanayama, A., Yahata, Y., Arima, Y., Takahashi, T., Saitoh, T., Kanou, K., Oishi, K. (2015). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* outbreaks related to childcare facilities in Japan, 2010–2013. *BMC infectious diseases*, 15:1.
51. Keener, T., Stuart, R., Brown, T. (2004). Maleated coupling agents for natural fibre composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 35:357-362.
52. Kotula, K., Pandya, Y. (1995). Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. *Journal of Food Protection*®, 58:1326-1329.
53. La Ragione, R., Best, A., Sprigings, K., Liebana, E., Woodward, G., Sayers, A., Woodward, M. J. (2005). Variable and strain dependent colonisation of chickens by *Escherichia coli* O157. *Veterinary microbiology*, 107:103-113.
54. Leotta, G., Chinen, I., Epszteyn, S., Miliwebsky, E., Melamed, I. C., Motter, M., Rivas, M. (2005). Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Revista argentina de microbiología*, 37:1-10.
55. Lluque, A., Mercado, E., Riveros, M., Alvarado, L., Carlos, E., Colichón, A., Salazar, E., Ochoa, T. (2010). Comparación entre el Diagnóstico Serológico y el Diagnóstico por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). *Revista de Gastroenterología del Perú*. 30:121-125.
56. López, D. (2011). Tesis de Grado, “Búsqueda de Microorganismos indicadores de vida útil, higiene, alterantes y patógenos en carne de pollo comercializada en Montevideo”. Facultad de Veterinaria, Universidad de República.
57. Magwedere, K., Dang, H., Mills, E., Cutter, C., Roberts, E., DebRoy, C. (2013). Incidence of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25:254-258.
58. Manual OIE (2004). Disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/d6508.pdf>
Fecha de consulta: 04/04/2016.

59. Marzocca, M., Marucci, P., Sica, M., Álvarez, E. (2006). Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Revista argentina de microbiología*, 38:38-40.
60. MGAP Análisis sectorial y cadenas productivas. Anuario Oficina de Programación y Política Agropecuaria (2015). Disponible en <http://www.mgap.gub.uy/portal/page.aspx?2,opypa,opypa-anuario-2015,O,es,0>, Fecha de consulta: 25/02/2016.
61. Michanie, S. (2003) La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne: *Escherichia coli* O157:H7. *Rev. Ganado y Carne*, 4(17):40-42 e *Información Veterinaria*, CMVPC, Córdoba, 138:36-38.
62. Molina, J. (2015). *Escherichia coli* Diarrogénicas. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html> Fecha de consulta: 20/01/2016.
63. Mountney, G., Parkhurst, C. (2001). *Tecnología de productos avícolas*. Tercera Ed. Zaragoza, Ed. Acribia, 446p.
64. Murakami, K., Etoh, Y., Ichihara, S., Maeda, E., Takenaka, S., Horikawa, K., (2014). Isolation and characteristics of Shiga toxin 2f-producing *Escherichia coli* among pigeons in Kyushu, Japan. Vol. 9.
65. Mussio, P., Martínez Bernié, I., Soumastre, M., Maquieira, A. (2014). Validación de la detección de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) en hamburguesas crudas mediante el uso de PCR a tiempo real (BAX® System Q7, DuPont) utilizando «WET POOLS». *Innotec*. 75-83.
66. Nagy, B., Fekete, P. (1998). Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00902569/document> Fecha de consulta: 12/12/15.
67. Narváez, C., Carruyo, G., Moreno, M., Rodas, A., Hoet, A., Wittum, T. (2007) Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica*. 17:239-245. Disponible en <http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/28616/2/art4.pdf> Fecha de consulta: 27/02/2016.
68. National Enteric Disease Surveillance: Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) Annual Report, (2012). Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/PDFs/national-stec-surv-summ-2012-508c.pdf> Fecha de consulta: 20/04/2016.

69. Neher, S., Hazarika, A. K., Barkalita, L. M., Borah, P., Bora, D. P., Sharma, R. K. (2016). Isolation and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* of animal and bird origin by multiplex polymerase chain reaction. *Veterinary World*, 9:123-127.
70. OIE. Inocuidad de los Alimentos. Disponible en http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Media_Center/docs/pdf/Fact_sheets/FOOD_ES.pdf Fecha de consulta: 23/02/2016.
71. OMS (2002). Enfermedades transmitidas por los alimentos. Disponible en: <http://www.panalimentos.org/comunidad/educacion1.asp?cd=152&id=67> Fecha de consulta: 19/12/2015.
72. OMS, (2011). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/> Fecha de consulta: 20/11/2015.
73. Oquendo, M. (2006). Incidencia de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico (Doctoral dissertation, tesis para el grado de maestro en ciencias y tecnología de alimentos).
74. Otero, J., Mendosa, A., Barberis, A., Lunghi, M., Roldán, L. (2010). Investigación de *Escherichia Coli* O157:H7 en Planta de Faena de Pollos. *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 9:17-23.
75. Otero, V. (2014). "Incidencia, Comportamiento y Control de Tipos Patógenos de *Escherichia coli* (STEC y EPEC) en Leche y Queso de Oveja". Disponible en: https://buleria.unileon.es/xmlui/bitstream/handle/10612/3670/tesis_b37a5d.PDF?sequence=1 Fecha de consulta: 21/04/2016.
76. Paton, J., Paton, A. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clinical microbiology reviews*, 11: 450-479.
77. Pérez del Campo, Y., Espinosa, D., Florín, J., Levy, O., Álvarez, C., Infante, E. (2000). Síndrome hemolítico urémico: Aspectos epidemiológicos y patogénicos. *Revista Cubana de Pediatría*, 72:203-213.
78. Pilipčinec, E., Naas, H., Cabadaj, R., Mikula, I. (1999). Isolation of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 from poultry. *Folia microbiologica*, 44:455-456.

79. Pradel, N., Livrelli, V., De Champs, C., Palcoux, J. B., Reynaud, A., Scheutz, F., Forestier, C. (2000). Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 38:1023-1031.
80. Prats, G., Frías, C., Margall, N., Llovet, T., Gaztelurrutia, L., Elcuaz, R., Mirellis, B. (1996). Colitis hemorrágica por *Escherichia coli* verotoxigénica. Presentación de 9 casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 14:7-15.
81. Rasko, D., Rosovitz, M., Myers, G., Mongodin, E., Fricke, W., Gajer, P., Henderson, I. (2008). The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *Journal of bacteriology*. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/190/20/6881.full> Fecha de consulta: 12/12/15.
82. Reglamento Bromatológico Nacional, (2012). 5ta ed. Montevideo, Ed. IMPO. Dirección Nacional de Impresiones y Publicaciones Oficiales. 648p.
83. Reple, J., Oliveira, M., Oliveira, M., Cunha, M., Gioia, R., Sanches, L., Knöbl, T., (2015). Análise filogenética de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) e produtoras de toxina shiga (STEC) isoladas de fezes de psitacídeos: avaliação do potencial zoonótico. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, 13:81-83.
84. Rey, A., Silvestre, A. (2005). Comer sin riesgos II: las enfermedades transmitidas por alimentos. Buenos Aires, Hemisferio Sur. 347.
85. Riley, L., Remis, R., Helgerson, S., McGee, H., Wells, J., Davis, B., Blake, P. A. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308:681-685.
86. Rivas, M., Leotta, G., Chinen, I. (2008) Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. "Dr. Carlos G. Malbrán" Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Survey para América del Sur. Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=IhIIApW7G8c%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES> Fecha de consulta: 15/11/2015
87. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Deza, N., Leotta, G. (2006). Epidemiología del síndrome uremico hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina*, 66:27-32.

88. Rivas, M., Miliwebsky, E., Chinen, I., Roldan, C. D., Balbi, L., Garcia, B., Griffin, P. M. (2006). Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathogens & Disease*, 3:88-96.
89. Rivera, F., Ochoa, T. (2013). *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC) en el Perú. *Diagnóstico (Perú)*, 52:23-26.
90. Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Revista Salud Pública de México*. 44:464-475.
91. Rodriguez, R., (2009). Disponible en: <http://www.ipcva.com.ar/files/envasado/Ricardo%20Rodriguez.pdf> Fecha de consulta: 23/02/2016.
92. Rojas, A., González, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31:69-76.
93. Rovira, P. (2006) Inocuidad de las carnes: Un tema relevante en la agenda del INIA. *Revista INIA N° 9*:14.
94. Shams, S., Haghi Ashtiani, M., Nasrollahi, L., Shahsiah, R. (2013). Frequency of Shiga toxin-producing genes of *Escherichia coli* isolated from diarrheic stools of Iranian children by PCR. *Iran J Pediatr*; 23.
95. Stavric, S., Buchanan, B., Gleeson, T. (1992). Competitive exclusion of *Escherichia coli* O157:H7 from chicks with anaerobic cultures of faecal microflora. *Letters in applied microbiology*, 14:191-193.
96. Tabatabaei, M., Mekarizadeh, A., Foad Marashi, N. (2012). Detection and molecular characterization of sorbitol negative shiga toxigenic *Escherichia coli* in chicken from northwest of Iran. In *Veterinary Research Forum*, 2:183-188.
97. Tan, R. (2008). Intervention Strategies to Reduce Foodborne Pathogens in Poultry During Grow-out and Processing. ProQuest. Disponible en: https://books.google.com.uy/books?hl=es&lr=&id=dCsb3wSOzXEC&oi=fnd&pg=PR2&dq=Intervention+Strategies+to+Reduce+Foodborne+Pathogens+in+Poultry+During+Grow-out+and+Processing.+ProQuest&ots=RrWsvqx69_&sig=PQ8o5mn4wZDprtpnHww6D8i4b0U#v=onepage&q=Intervention%20Strategies%20to%20Reduce%20Foodborne%20Pathogens%20in%20Poultry%20During%20Grow-out%20and%20Processing.%20ProQuest&f=false Fecha de consulta: 20/12/2016.

98. Temprado, R. (2005). Calidad de la carne de pollo. Selecciones avícolas, 47:347-355.
99. Urumova, V., Lyutzkanov, M., Petrov, V. (2015). Investigations on Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* (Ehec) Among Dairy Farms in the North Part of the Republic of Bulgaria. Macedonian Veterinary Review, 38:21-29.
100. USDA, (2012). Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf>.
Fecha de consulta: 20/04/2016
101. Varela, G., Schelotto, F. (2015). Síndrome urémico hemolítico en Uruguay. Aspectos microbiológicos y clínicos, aportes para su conocimiento regional. Revista Facultad de Ciencias de la Salud UDES, 2:25-30.
102. Varela, G.; Chinen, I.; Gadea, P.; Miliwebsky, E.; Mota, M.I.; González, S.; González, G.; Gugliada, M.J.; Carbonari, C.C.; Algorta, G.; Bernardá, 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". Revista Argentina de Microbiología. 40:93-100.
103. Wang, G., Zhao, T., Doyle, M. P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. Applied and Environmental Microbiology, 62:2567-2570.
104. Wells J., Shipman L., Greene K., Sembradores E., Verde J. (1991). Aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 y otra similar a Shiga-productora de toxina *E. coli* de ganado lechero. J. Clin. Microbiol. 29: 985-989.