



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE SHIGA TOXINA (STEC)
EN MUESTRAS DE CARNE DE RES Y PORCINA COMERCIALIZADAS EN EL
MERCADO MUNICIPAL DE LA CIUDAD DE CUMANÁ
(Modalidad: Investigación)

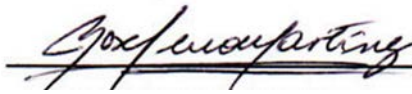
TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA

LOURDES TERESA CARDOZO RODRÍGUEZ

CUMANÁ, 2009


DETECCIÓN DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE SHIGA TOXINA (STEC)
EN MUESTRAS DE CARNE DE RES Y PORCINA COMERCIALIZADAS EN EL
MERCADO MUNICIPAL DE LA CIUDAD DE CUMANÁ

APROBADO POR:



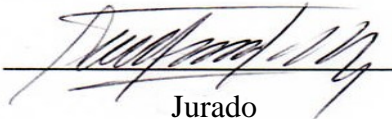
Profa. Rosa E. Martínez N.

Asesora

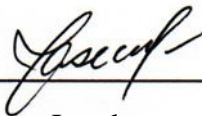


Profa. Luz B. Villalobos

Coasesora



Jurado



Jurado

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA.....	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	9
Obtención de muestras	9
Tratamiento de las muestras para el recuento de coliformes	9
Recuento de bacterias coliformes en placas.....	9
Preenriquecimiento y cultivo de las muestras para el aislamiento de <i>E. coli</i> ..	10
Aislamiento e identificación fenotípica de cepas de <i>E. coli</i> (FDA, 1992).....	11
Serología de las cepas identificadas como <i>E. coli</i>	11
Extracción de ADN genómico	12
Ensayo de PCR	13
Electroforesis en gel de agarosa	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Recuento de bacterias coliformes en placas.....	15
Aislamiento e identificación fenotípica y serológica de cepas de <i>E. coli</i>	18
Ensayo de PCR para la detección de cepas de <i>E. coli</i> productoras de shiga toxinas (STEC)	22
CONCLUSIONES.....	28
RECOMENDACIONES.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
HOJA DE METADATOS	42

AGRADECIMIENTO

A la profesora Rosa E. Martínez, por su asesoramiento y ayuda incondicional en la realización de este trabajo.

A la profesora Luz B. Villalobos, por cada consejo dado y por permitirme la utilización del laboratorio, en el Postgrado de Biología Aplicada, y los equipos necesarios en la realización de esta investigación.

Al Dr. Peter Feng, de la Food and Drug Administration (FDA), Washinton, D.C., por sus sugerencias en la metodología de PCR aplicada en este estudio.

A los profesores Oscar Chinchilla y Yelitza Mago, quienes mas allá de lo académico me brindaron su valiosa amistad.

A Arlis Acagua, por tu amistad a lo largo de la carrera y por tu apoyo en los momentos más difíciles.

A la Universidad de Oriente y Profesores del Departamento de Biología, por los conocimientos impartidos.

DEDICATORIA

A mi fuerza: Jehová, Dios

A mis padres: Miriam y Ranulfo Cardozo

A mi todo: Carlos Alfredo Mago

LISTA DE TABLAS

TABLA 1 Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la amplificación de los genes *stx₁* y *stx₂***¡Error! Marcador no definido.**

LISTA DE FIGURAS

Figura N1. Índice de coliformes en muestras de carne de res y porcina comercializadas en el mercado municipal de la ciudad de Cumaná.....	15
Figura N2. Características bioquímicas de las cepas de <i>E. coli</i> aisladas a partir de muestras de carne de res y porcina.....	19
Figura N3. Cepas de <i>E. coli</i> en agar MacConkey-Sorbitol.....	20
Figura N4. Identificación serológica de cepas no-O157 de <i>E. coli</i>	21
Figura N5. Productos de PCR específicos de cepas STEC, con los primers stx1, stx2 y SRM129.....	23

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo principal, detectar la presencia de cepas de *Escherichia coli* productora de shiga toxina (STEC) en muestras de carne de res y porcina comercializadas en el Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná; para ello, se analizaron 35 muestras frescas de carne de res y 35 de carne porcina. A ambos productos, se les determinaron los niveles de coliformes mediante recuentos en placa (COVENIN resolución 1086-84), seguido del aislamiento de cepas de *E. coli* e identificación fenotípica por pruebas bioquímicas convencionales según la FDA (1992). Las cepas identificadas como *E. coli* fueron probadas serológicamente con el kit Dryspot *E. coli* SEROSCREEN (Oxoid) para serogrupos no-O157. Luego se llevó a cabo la extracción del ADN bacteriano de acuerdo con Rivas *et al.* (2007). La detección de cepas STEC se realizó por la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el recuento de coliformes se obtuvo un valor promedio de $1,18 \times 10^6$ ufc/g para la carne de res y $7,24 \times 10^5$ ufc/g para la porcina; siendo estos niveles en ambos productos superiores a lo establecido por la ICMSF ($5,0 \times 10^3$ ufc/g) para las carnes crudas. Se aislaron e identificaron un total de 50 cepas de *E. coli* (30 en la carne de res y 20 en la porcina), de las cuales 3 (sorbitol positivas), aisladas de la carne porcina, resultaron ser no-O157. El ensayo de PCR permitió detectar 3 cepas STEC sorbitol positivas (2 de la carne de res y 1 de la porcina); además mostró que las 3 cepas no-O57 de origen porcino carecían de genes *stx*. Estos resultados revelan condiciones higiénico-sanitarias poco satisfactorias en los puestos de ventas de estos productos cárnicos, y la circulación de cepas STEC en ambos productos. En vista de la relevancia clínica de este patógeno, su detección hace necesaria la implementación de normas y exigencias para la manipulación de estos alimentos por parte de los expendedores, con la finalidad de evitar brotes epidémicos de enfermedades asociadas a STEC.

Palabras clave: *Escherichia coli*, shiga toxina, STEC.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos además de tener un valor nutricional para quienes lo consumen, constituyen a menudo un medio de cultivo ideal para la multiplicación microbiana, por lo que pueden actuar como vehículos de transmisión de enfermedades conocidas como ETA (enfermedades transmitidas por alimentos) (Prescott *et al.*, 2004).

Las ETA constituyen el problema de salud pública más extendido en el mundo, lo cual hace necesario el establecimiento de una adecuada vigilancia epidemiológica para aplicar medidas para su control y prevención (Caballero *et al.*, 1998). Estas enfermedades se producen al ingerir alimentos que contengan microorganismos, como bacterias o sustancias tóxicas producidas durante el desarrollo bacteriano, llegando a causar en este último caso lo que se conoce como intoxicaciones alimentarias (Caiced, 2000).

Entre los organismos comúnmente hallados en los alimentos, están los denominados coliformes, que son bacilos Gram negativos, aerobios y anaerobios facultativos, producen ácido a partir de glucosa y otros carbohidratos y son generalmente aerogénicos (Astorga *et al.*, 1998).

Los coliformes totales, conocidos así en conjunto, pueden ser bacterias que se encuentran en el intestino del hombre pero también pueden estar presentes en otros ambientes, y siendo las enterobacterias representantes de este grupo, su investigación tiene gran significado sanitario, porque supone la posible presencia de patógenos (Frazier, 1976; García y Pérez, 1981; Iriarte, 1993). Dentro de este amplio grupo, la especie *Escherichia coli*, ha sido reconocida no sólo como indicadora de contaminación fecal, sino también como uno de los microorganismos más

significativos para evaluar la calidad bacteriológica de los alimentos (Mossel y Struijk, 1995). *E. coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia Enterobacteriaceae, tribu Escherichia. Esta especie bacteriana coloniza el intestino del hombre pocas horas después de su nacimiento y, aunque forma parte de la flora normal, existen cepas que pueden ser patógenas, capaces de producir diferentes cuadros clínicos, entre ellos la diarrea, lo cual la hace de gran importancia para el hombre (Prescott *et al.*, 2004).

De acuerdo a su mecanismo de patogenicidad y los cuadros clínicos que produce, Rodríguez (2002) hizo referencia a una clasificación, donde se distribuyen las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en seis grupos distintos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC), todos por sus siglas en inglés.

Las cepas EHEC constituyen un grupo ampliamente reconocido como el responsable de serias patologías en humanos, tales como la colitis hemorrágica (CH) y el síndrome urémico hemolítico (HUS). El serotipo O157:H7 ha sido el más frecuentemente implicado en brotes de enfermedades de origen alimentario alrededor del mundo, producto de la ingesta de alimentos o aguas contaminadas (Mims *et al.*, 1999). El cuadro clínico está relacionado con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, lo que se conoce como colitis hemorrágica que es producto de la ingestión principalmente de carne cruda o mal cocida, igual para la ocurrencia del HUS (Rodríguez, 2002).

El primer aislamiento de EHEC fue el perteneciente al serotipo O157:H7, y se asoció con el HUS causado por la producción de una citotoxina con actividad principalmente en células hepáticas. Esta toxina es similar a la neurotoxina Shiga producida por *Shigella dysenteriae* tipo I, por lo que también se llamo “shiga toxina”

(Stx), y a las *E. coli* que la generan se conocen como productoras de shiga toxina (STEC) (Walker, 2000). Las STEC se caracterizan por producir una o ambos tipos de shiga toxina, shiga toxina 1 (Stx1) y shiga toxina (Stx2), que constituyen su principal factor de virulencia, y la producción de éstas está asociada con un incremento del riesgo del HUS. Esta toxina está codificada por el gen *stx*, que se encuentra insertado en el cromosoma bacteriano, junto con otros factores de patogenicidad (Huguet *et al.*, 2002; Paton y Paton, 2002; Cicuta *et al.*, 2006).

Las cepas de EHEC han estado presentes durante varias décadas. Su virulencia y existencia como patógeno humano fue reconocida en 1979, en Estados Unidos, debido al consumo de hamburguesas en restaurantes de una reconocida cadena de comidas rápidas, por lo tanto, está asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), principalmente los de origen bovino, aunque la transmisión puede ser directamente desde humanos o animales infectados (Ohara *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2005).

En la actualidad la O157:H7 no es el único serotipo de *E. coli* capaz de generar shiga toxinas y los cuadros clínicos correspondientes. Alrededor de 250 nuevos serotipos STEC no-O157 han sido identificados por estar asociados con enfermedades en humanos y cuya frecuencia es mayor que las cepas O157:H7 (Eklund *et al.*, 2001). En países como Argentina y muchas ciudades Europeas, la infección con *E. coli* no-O157 es común y están implicados en la mayoría de los casos de HUS (Fratamico *et al.*, 2004).

La característica común de todas estas cepas STEC no-O157 es la producción de Stx1 y/o Stx2, o variantes de Stx1 (Stx1c y Stx1d) o Stx2 (Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f y Stx2g) (Schmidt, 2001), pero a diferencia del serotipo O157:H7, la mayoría de estas cepas suelen ser menos virulentas, ya que no necesariamente producen HUS (Leotta *et al.*, 2005). Como lo planteó Pistone *et al.* (2004), estas cepas no-O157

están, en la generalidad de los casos, asociadas a cuadros de diarrea y enterocolitis, así como a la acumulación de fluidos y daños histológicos en asas intestinales ligadas (síndrome diarreico). Las shiga toxinas generadas por las cepas STEC, son potentes citotoxinas que destruyen las células de la línea continua Vero (células del riñón del mono verde africano) o HeLa (células de carcinoma cérvico-uterino) cultivadas *in Vitro* (Rodríguez, 2002; Wang *et al.*, 2002), y se caracterizan por constar de dos subunidades, una A (componente activo) de aproximadamente 32 000 Mr, que a la vez consta de dos fragmentos, un péptido A1 que posee actividad enzimática, mientras que el A2 permite la unión de la subunidad A a la B (componentes enlazantes de receptores) de aproximadamente 7 700 Mr (Pistone *et al.*, 2004). Esta última subunidad es la que se fija a un receptor específico, el glucolípidio Gb3 (globotriaosilceramida), presente en ciertas células de eucariontes, donde estas toxinas inhiben la síntesis de proteínas al inactivar la subunidad ribosomal 60s, y que además es el receptor de la gran mayoría de las Stx, en el caso de la Stx2e (variante de la Stx2) el receptor es el Gb4 (Blanco *et al.*, 1995; Walker, 2000). La Stx1 es idéntica a la toxina producida por *S. dysenteriae* tipo I, exceptuando algunos casos donde se diferencian en un residuo. Por otra parte, la Stx2 difiere desde el punto de vista estructural de la shiga toxina de *Shigella*, en que es un grupo heterogéneo porque presenta mayor número de variantes, mientras que los anticuerpos que neutralizan la actividad de la Stx1, no neutralizan a la Stx2 (Wang *et al.*, 2002).

La patología de las shiga toxinas se manifiesta al ser liberada en el intestino, pasan a la sangre y deterioran el epitelio vascular, con la presentación clínica de diarrea sanguinolenta, dolor abdominal y ausencia de fiebre (Hunt y Hardy, 1991). Estas potentes citotoxinas logran ganar el acceso hasta el torrente sanguíneo y de esta manera logran unirse a receptores glicolípidos de las células del glomérulo del endotelio, internalizándose y causando la muerte celular. Este fenómeno incluye la activación de plaquetas y leucocitos, desencadenándose la formación de coágulos ó

trombos, los cuales obstruyen los capilares renales, dando origen al HUS (Siegler *et al.*, 1995).

La emergencia de nuevas cepas productoras de shiga toxinas, ha conducido a que la familia de las STEC se haya vuelto muy diversa y, por ello, uno de los principales tipos de clasificación se fundamenta en la identificación de los antígenos O, H y K (Rodríguez, 2002). Se ha establecido un esquema de serotipificación basado en la presencia o no de antígenos somáticos (O), flagelares (H) y capsulares (K). El antígeno O es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico particular, permitiendo así agruparlas en un amplio rango de serotipos (Rodríguez, 2002).

Numerosos estudios han demostrado que la mayoría de los serotipos de STEC no-157 y O157:H7 se encuentran principalmente en bovinos, cabras, cerdos y pollos, siendo su principal reservorio el intestino del ganado bovino, aunque también se han aislado de frutas y vegetales (Leotta *et al.*, 2005; Marzocca *et al.*, 2006).

En adición a la presencia de shiga toxinas, también ha sido reportada la presencia de otro factor de virulencia accesorio responsable de la histopatología de adhesión y borrado de las microvellosidades intestinales, el cual está codificado por el gen *eae* y se ubica en una isla de patogenicidad conocida como “Locus of Enterocyte Effacement” (LEE). Este es un sistema de secreción proteica tipo III que desempeña un papel esencial en el traslado y excreción de las moléculas proteicas que participan en la adhesión e internalización de la bacteria; denominándose como LEE positivas a aquellas cepas que contienen el gen *eae* y como LEE negativas a las que no lo poseen (Paton *et al.*, 1997; Paton y Paton, 1998; Huguet *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002 y Shima *et al.*, 2004). Aunado a la presencia de este factor de adherencia intestinal, las cepas STEC pueden presentar el gen *hlyA*, contenido en un plásmido de virulencia de

60 MDa, que codifica la síntesis de la proteína enterohemolisina (Ehly), la cual desempeña un papel importante en la lisis de los eritrocitos, liberando así los grupos hemo de la hemoglobina que podrán ser utilizados por la bacteria para mejorar su crecimiento. Esta enterohemolisina se puede encontrar tanto en las LEE positivas como en las LEE negativas (Huguet *et al.*, 2002 ; Paton y Paton, 2002; Wang *et al.*, 2002).

La detección de cepas de *E. coli* productoras de shiga toxina y factores de virulencia accesorios, es de gran valor clínico y epidemiológico al momento de evaluar muestras de heces o alimentos contaminados; sin embargo, el diagnóstico de estas cepas presenta algunas dificultades por el método convencional. A diferencia del serotipo O157:H7, las cuales, en general, son sorbitol y β -glucuronidasa negativas; las cepas STEC no-O157 no tienen marcadores bioquímicos que faciliten su identificación (Gómez *et al.*, 2005). Estas dificultades han sido minimizadas mediante la combinación de procedimientos bacteriológicos, y la implementación del método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siendo esta última técnica considerada una alternativa altamente satisfactoria para la detección de las STEC (Heller *et al.*, 2003).

El método de la PCR simplemente se basa en la identificación de una secuencia específica en el genoma del organismo de interés, siendo más sensible si tal secuencia se repite varias veces en su ADN. En esta técnica se usa una polimerasa resistente a la temperatura, la *Taq* polimerasa de *Thermus aquaticus*; también se requieren un par de cebadores, que son secuencias cortas de ADN sintetizados químicamente (oligonucleótidos) y que contienen las bases complementarias de aquellas en las hebras opuestas que flanquean la región blanco, siendo éstos los que determinarán los extremos del segmento de ADN que se duplicará (Becerril y Romero, 2004). Las copias se obtienen en varios ciclos de reacción en presencia de la *Taq* polimerasa. En cada ciclo tiene lugar una fase de desnaturalización, donde las hebras

complementarias del ADN se separan, luego se da la fase de alineamiento, aquí los cebadores se unen a las cadenas de una sola hebra y la enzima polimerizante extiende el cebador a lo largo del fragmento (fase de alargamiento), formando moléculas de ADN de doble hebra. Ciclos repetidos de síntesis y desnaturalización originan un incremento del número de copias del ADN, obteniéndose amplificaciones de hasta un millón de veces. El producto de la PCR es visualizado por medio de una electroforesis, como el gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, para determinar de tal forma cuales fueron los genes amplificados y lograr la identificación genotípica de la cepa bacteriana en estudio. Esta técnica ofrece como ventaja, el poder realizarla con cantidades pequeñas de ADN y además, este proceso puede repetirse indefinidamente, para obtener cada vez dos moléculas de ADN de cadena doble idénticas a la secuencia original (Stanfield, 1992; Griffith *et al.*, 1993; Becerril y Romero, 2004).

En vista de las ventajas que brinda la PCR, la identificación de cepas STEC no-O157 y O157:H7 ha sido efectiva a través de la implementación de este método, arrojando resultados confiables en la detección de los genes *stx₁* y *stx₂*, al igual que los factores de virulencia accesorios (*eae*, *ehlyA*) presentes en cepas de *E. coli* aisladas de diversas fuentes (Radu *et al.*, 2001; Hahm *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2005).

Escherichia coli productora de shiga toxina (STEC), como patógeno de transmisión por alimentos capaz de causar enfermedades severas y potencialmente fatales para el hombre, es en la actualidad un tema de amplia discusión a nivel mundial, debido a su potencial patogénico y a los brotes descritos en Asia, Suráfrica, Australia, Europa y en países Suramericanos como Brasil y Argentina. En Venezuela, y en especial en la ciudad de Cumaná, estado Sucre, la frecuencia de cepas STEC en productos cárnicos no ha sido evaluada, lo que representa un tema de interés notable, dado que éstos son alimentos de primera necesidad en la alimentación del sucrense.

Por ello, se consideró importante para la salud pública, evaluar la presencia de *Escherichia coli* productora de shiga toxina (STEC) en muestras de carne de res y porcina comercializadas en diferentes puntos de ventas del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná, con la finalidad de determinar la calidad microbiológica de tales productos y al mismo tiempo sugerir medidas que permitan disminuir el riesgo de infecciones por este patógeno.

METODOLOGÍA

Obtención de muestras

Se colectaron un total de 70 muestras frescas y molidas (35 de carne de res y 35 de carne porcina) de 250 g cada una, cinco por semana durante tres meses, de diferentes puntos de ventas del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná. Estas fueron colocadas en bolsas plásticas previamente etiquetadas e identificadas. Durante su traslado y hasta su llegada al Laboratorio de Bacteriología del Postgrado en Biología Aplicada, de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, fueron conservadas en una cava con hielo.

Tratamiento de las muestras para el recuento de coliformes

De las muestras, tanto de carne de res como porcina, se tomaron 25 gramos de cada una y se homogeneizaron por separado en una jarra de licuadora con 225 ml de agua peptonada estéril al 0,1% por un período aproximado de 2 minutos. El homogeneizado resultante, correspondió a la dilución 10^{-1} , a partir de la cual se tomaron 10 ml y se agregaron a un segundo frasco conteniendo 90 ml de agua peptonada al 0,1%, constituyendo ésta la dilución 10^{-2} . Este procedimiento se repitió dos veces consecutivas hasta obtener diluciones seriadas hasta 10^{-4} de cada muestra.

Recuento de bacterias coliformes en placas

La determinación cuantitativa de bacterias coliformes fue llevada a cabo por el método para el recuento de bacterias coliformes en placas de Petri, establecidas por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), según la resolución

1086-1984. Para tal fin, se tomó con una pipeta estéril 1 ml de cada una de las diluciones obtenidas previamente y se agregó en una placa de Petri estéril. Posteriormente, se agregó a cada placa 15 ml de Agar Rojo Bilis Violeta (Difco, Laboratorios Detroit – Michigan), previamente fundido y mantenido a una temperatura de 45 °C. Se mezcló el inóculo y el agar aplicando movimientos circulares, para garantizar el homogeneizado de las muestras y se dejó solidificar sobre una superficie plana por 10 minutos. Una vez solidificado el agar, se cubrió con 4 ml del mismo medio, con la intención de formar una doble capa. Solidificada la segunda capa de agar, las placas fueron invertidas e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Posterior al tiempo de incubación, se seleccionaron aquellas placas que presentaron un máximo de 300 colonias y se contaron los coliformes; es decir, aquellas colonias que mostraron una forma circular y de color rojo oscuro, con diámetros menores de 0,5 mm. El número de colonias características obtenidas para cada dilución se multiplicó por el factor de dilución correspondiente. Los resultados fueron promediados y el valor final se expresó en unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (UFC/g).

El muestreo apropiado de los alimentos es importante en todos los estudios de análisis microbiológico, a fin de evitar resultados falsos-positivos; por ello, en cada etapa de esta investigación se manipuló con sumo cuidado cada muestra, con utensilios e instrumentos estériles y se establecieron diferentes áreas de trabajo para evitar las contaminaciones cruzadas.

Preenriquecimiento y cultivo de las muestras para el aislamiento de *E. coli*

Con base en la metodología de Zhou *et al.* (2002), las muestras fueron selectivamente enriquecidas en Caldo Infusión Cerebro Corazón suplementado con el antibiótico cefixima (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA). Para efecto del ensayo, se tomaron 25 g de cada muestra por separado y estos fueron sembrados en

fiolas que contenían 100 ml de Caldo Infusión Cerebro Corazón con 30 µg del antibiótico y se incubaron a 37 °C por un período de 24 horas. Una vez finalizado el preenriquecimiento, de cada uno de los caldos se tomo una asada y fueron sembrados por agotamiento directo en superficies, en placas conteniendo Agar MacConkey Sorbitol (Becton Dickinson) suplementado con el mismo antibiótico utilizado en el preenriquecimiento. Las placas se incubaron a 37 °C por 24 horas. La reacción positiva se manifestó por el crecimiento de colonias de color rosa, lo que indica que la especie bacteriana utiliza el azúcar, mientras que las cepas no fermentadoras de sorbitol se desarrollaron como colonias translúcidas (March y Ratnam, 1986).

Aislamiento e identificación fenotípica de cepas de *E. coli* (FDA, 1992)

Transcurrida las 24 horas, se tomaron colonias fermentadoras y no fermentadoras de sorbitol que lograron desarrollarse en el medio, dado que las cepas STEC no-O157 no muestran los mismos marcadores bioquímicos (sorbitol negativas) que muestran las cepas STEC pertenecientes al serotipo O157:H7. Una vez aisladas las colonias sospechosas, se procedió a la identificación bioquímica de *E. coli* aplicando tests convencionales como pruebas IMVIC (índol, motilidad, rojo de metilo/Voges Proskauer, citrato) y fermentación de azúcares en el medio Agar Hierro Triple Azúcar (Merck Laboratorios). La identificación lograda por las pruebas bioquímicas, fue confirmada por el sistema automatizado ATB expresión con galerías de pruebas bioquímicas miniaturizadas, galerías API ID 32 (BioMerieux-Zhuoz Pharma). Cada una de las cepas identificadas fue conservada a 4°C, en agar conservación, hasta el momento de la identificación por serología.

Serología de las cepas identificadas como *E. coli*

La caracterización serológica de las cepas identificadas como *E. coli*, se llevó a cabo mediante la utilización del kit Dryspot *E. coli* SEROSCREEN de OXOID. Este

es un kit que utiliza partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos y desecadas sobre la superficie de una tarjeta. Las partículas de látex tienen la capacidad de aglutinar en presencia de antígenos específicos de la pared celular de *E. coli* y formar grumos visibles. Esta prueba se utilizó como un procedimiento sencillo de criba para los serogrupos no-O157.

Para la prueba, se utilizaron cepas jóvenes sembradas en agar MacConkey con un período no mayor de 18 horas. Una vez obtenidas las colonias típicas se procedió a seguir las indicaciones descritas por el kit. Estas indicaciones fueron las siguientes: primero se hidrataron las áreas de prueba y de control de la tarjeta con 50µl de solución salina. Posteriormente se tomó una colonia sospechosa de *E. coli* de 1-2 mm de diámetro y se emulsionó con buffer fosfato salino (PBS) hasta obtener una suspensión ligeramente turbia. Luego con una espátula suministrada por el kit, se extendió la suspensión por el área de reacción hacia las manchas de látex desecado, hasta su completa disolución y hasta cubrir toda el área de reacción de prueba y de control. Seguidamente, se sometieron las tarjetas a un movimiento circular durante aproximadamente 60 segundos y se esperó hasta observar la aparición o no de aglutinación en condiciones normales de iluminación. Las cepas positivas y negativas fueron conservadas a 4°C en agar conservación.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN de las cepas de *E. coli* se realizó según metodología propuesta por Rivas et al. (2007). Previamente, las colonias de *E. coli* fueron reconstituidas en Agar Nutritivo por un período de 18 horas. Finalizada la incubación, se tomaron aproximadamente 5 colonias y se suspendieron en un tubo eppendorf que contenía 150µl de buffer Tritón X-10 al 1% en buffer TAE 1X. Esta mezcla se homogeneizó con un vórtex durante un minuto. Posteriormente, las muestras se hirvieron en baño de agua a 100°C por 15 minutos. Luego, se centrifugaron a 10 000

rpm por 10 minutos. Cabe mencionar que esta extracción se le realizó también a las cepas de *E. coli* certificadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM 417 y CVCM 765) las cuales sirvieron como controles positivos y negativos, respectivamente, de la presencia del gen que codifica la producción de shiga toxina.

Ensayo de PCR

El ensayo de PCR para la detección de los genes (*stx₁* y *stx₂*) fueron desarrollados en un termociclador GeneAmp PCR (modelo 2400, Perkin Elmer, USA). Los oligonucleótidos para *stx₁* y *stx₂* fueron los recomendados por Monday *et al.* (2007). La secuencia de cada uno de los oligonucleótidos se especifican a continuación:

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para la amplificación de los genes *stx₁* y *stx₂*.

Oligonucleótido	Tamaño (bp)	Primer	Secuencia (5'-3')
<i>stx1/stx2</i>	313	<i>stx1</i>	CTG GAT TTA ATG TCG CATAGT GG
		<i>stx2</i>	CTG GCG TTA ATG GAG TTCAGT G
		SRM129	TGATGATGACAATTCAGTATAACTGCCAC

El PCR se realizó en un volumen total de 50 μ l que contenían buffer Taq polymerase 1X (QIAGEN, Valencia, CA), 3 mM MgCl₂, 400 μ M de desoxinucleotidos trifosfatos, 200 nM de cada primer, 5 μ L de ADN, y 2.5 U de Taq polymerase (HotStarTaq QIAGEN) (Monday *et al.*, 2006).

Las condiciones del programa de amplificación fueron las siguientes: 95 °C por 15 minutos para la desnaturalización inicial, 10 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 65 °C por 20 segundos y 72 °C por 30, seguido de 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos 60 °C por 20 segundos, 72°C por 30 segundos y un paso de extensión final de 72 °C por 7 minutos. Cada ensayo de PCR se realizo utilizando cepas controles positivas y negativas, certificadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM), a fin de validar el proceso.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados por PCR fueron corridos en una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA). Para preparar el gel, primero 1,5 g de agarosa se pesaron y disolvieron en una fiola con 100 μ l buffer TAE (tris cloro acetato-EDTA) 1X. Seguidamente se calentó por 30 segundos o en su efecto hasta que se disolvió completamente la agarosa. Se dejó enfriar hasta que alcanzó aproximadamente los 45 °C y se añadió 5 μ l de solución de bromuro de etidio. Seguidamente, se preparó la cámara electroforética. Se vertió el gel y se dejó solidificar. Una vez solidificado, se procedió a cargar de los pozos con cada una de las muestras amplificadas por PCR y se corrieron a 80 voltios por 1 hora y 30 minutos, utilizando una fuente de poder (BioRad, modelo 1/500). Culminada la corrida electroforética, las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador Bio-Rad (modelo Universal II).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuento de bacterias coliformes en placas

El recuento de coliformes en los productos cárnicos (res y porcina) procedentes del Mercado Municipal de Cumaná, se muestra en la Figura 1. Los resultados reflejaron un promedio de $1,18 \times 10^6$ unidades formadoras de colonias de coliformes por gramo de alimento analizado (ufc/g) para la carne de res y $7,24 \times 10^5$ ufc/g para la carne porcina. Ambos valores promedios, sobrepasaron los límites establecidos por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en los Alimentos (ICMSF, 1975), la cual establece un máximo de $5,0 \times 10^3$ ufc/g para las carnes crudas.

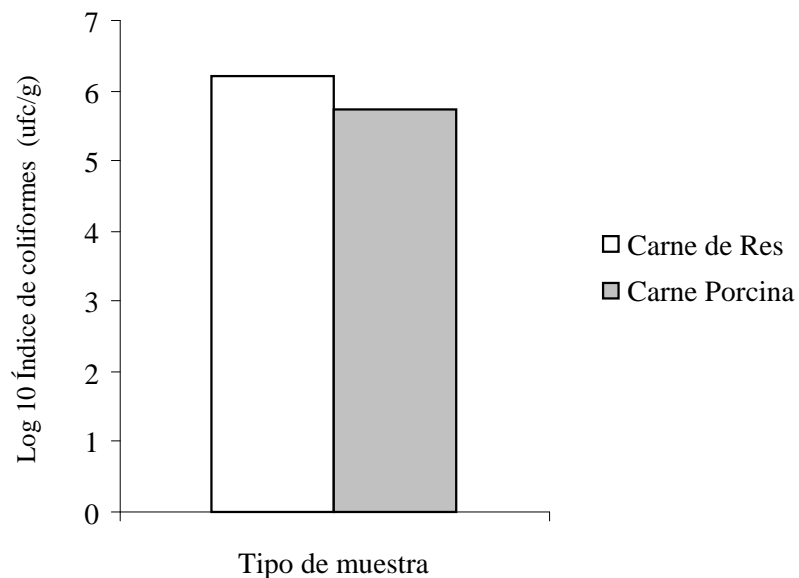


Figura 1. Índice de coliformes en muestras de carne de res y porcina comercializadas en el mercado municipal de la ciudad de Cumaná.

La determinación de bacterias coliformes, es el procedimiento utilizado con mayor frecuencia para evaluar la calidad microbiológica de productos cárnicos, y representa uno de los indicadores más útil para evidenciar estados sanitarios poco satisfactorios y la posible contaminación de origen fecal en los alimentos para consumo humano (Warseck *et al.*, 1973; Iriarte, 1993).

En función de la especificación que tienen los coliformes en alimentos y con base en los niveles de contaminación por organismos coliformes observados en las carnes de res y porcina, su consumo supone un riesgo, ya que es un indicativo de que estos productos están siendo ofertados al consumidor bajo condiciones higiénicas deficientes, en particular la carne de res molida, la cual mostró ser la más susceptible a contaminación y proliferación microbiana en comparación con la carne de cerdo. Este tipo de situación hace pensar que factores tales como el poco cuidado al momento de cortar las carnes, la limpieza de los utensilios de corte y de la maquina de moler, la interrupción de la cadena de frío durante la venta diaria, la baja calidad del agua usada para el lavado de las piezas así como la higiene del manipulador del alimento, pueden estar seriamente afectando la calidad de la carne molida que se vende en el Mercado Municipal de Cumaná.

Al respecto, Bravo y Villalobos (2002) en un estudio realizado en carne de chorizo y carne molida procedentes del Mercado Municipal de Cumaná, refieren que los altos índices de coliformes observados en cada uno de los productos, son un claro indicio de que están siendo excesivamente manipulados desde el momento en que salen del matadero hasta su comercialización en el mercado municipal de Cumaná. Al mismo tiempo, los autores refieren que la contaminación cruzada también se observó durante la evaluación de los expendios, al colocar la carne molida en la misma bandeja de los cortes sin procesar, lo cual contribuye a que la calidad sanitaria del producto sea cuestionable.

En otro estudio realizado por Arenas y Huerta (2005), se pudo determinar que en el grado de contaminación de canales de carnes en un matadero municipal del estado Zulia, algo tan esencial como el lavado de las canales, incrementaba el número de bacterias y en particular las de origen entérico, debido a que el agua que utilizaban estaba contaminada. También observaron que el 27% de las muestras tomadas en la canal y en cada paso de la faena de despiece, estaban contaminadas con bacterias coliformes.

Forrest (2006) afirma que si bien la presencia de coliformes no es un indicativo exclusivo de una contaminación por microorganismos de origen entérico, también es cierto que un incremento de esta población tanto en los cortes de carne fresca como la carne molida, supone que estos productos pueden contener patógenos provenientes de la contaminación fecal de la canal durante la matanza o debido a las prácticas higiénicas y de manejo inapropiadas de la carne durante el procesamiento y venta final del producto.

Entre las bacterias de origen fecal que pueden ser detectados con facilidad en productos alimenticios con un bajo nivel de calidad sanitaria, se encuentra *Escherichia coli*. Esta es una de las bacterias que en condiciones normales, constituye una parte esencial de la flora bacteriana humana, a la que se atribuyen efectos beneficiosos para la salud. Existen, sin embargo, cepas de *E. coli* capaces de provocar alteraciones graves en forma de enteritis. Las cepas responsables de este tipo de patología se han venido describiendo desde unos años atrás, y con posterioridad han tomado importancia hasta el punto de que su detección se ha convertido en un examen de rutina, con el fin de limitar un riesgo considerado evitable (Margall *et al.*, 1997; Gómez, 2002; Soto, 2007).

El control de este microorganismo se plantea de forma especial para los alimentos crudos como la carne y sus derivados, ya que la simple presencia de este microorganismo, o un recuento superior a 100 ufc/g o ml de muestra, indicará una contaminación fecal con el consiguiente riesgo de que existan cepas patógenas (Chinen *et al.*, 2001)

En vista de la importancia que tiene *Escherichia coli*, como posible indicador de una contaminación de origen fecal y de cepas patógenas, se procedió a determinar la presencia de este microorganismo en cada una de las muestras de carne de res molida y carne porcina colectada en el Mercado Municipal de Cumaná.

Como grupo indicador de cepas patógenas, se utilizó al grupo de *Escherichia coli* caracterizado por producir shiga toxinas (STEC). Los resultados obtenidos, se muestran a continuación.

Aislamiento e identificación fenotípica y serológica de cepas de *E. coli*

De las 70 muestras de carne evaluadas (35 de res y 35 de cerdo) se logró aislar un total de 50 cepas características de la especie *E. coli* (30 de la carne de res y 20 de la carne porcina), todas identificadas convencionalmente, y con características bioquímicas típicas de este género, tal como se muestra en la Figura 2.

La presencia de cepas de *E. coli* en los productos cárnicos evaluados, es un indicativo de una contaminación de origen fecal, ya que, como parte de la flora del tubo digestivo, esta bacteria es eliminada por las heces al exterior, y es capaz de sobrevivir durante cierto tiempo en los alimentos (Margall *et al.*, 1997; Gómez, 2002), es por ello que se plantea la necesidad de mejorar las condiciones de higiene en lo que respecta al manejo o tratado de estos productos, y en vista de que algunas cepas de *Escherichia coli* están involucradas en enfermedades transmitidas por

alimentos (ETAS) (Bryan, 1978), formó parte de esta investigación el aislamiento de esta bacteria de importancia clínica.

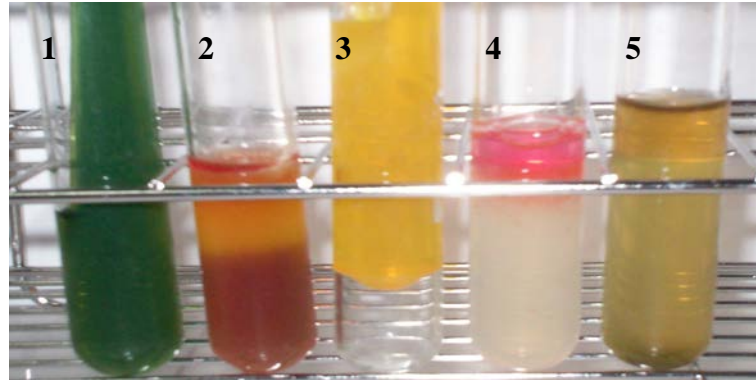


Figura 2. Características bioquímicas de las cepas de *E. coli* aisladas a partir de muestras de carne de res y porcina. 1: citrato negativo; 2: MIO +/+; 3: TSI A/A, gas +, H₂S -; 4: RM +; 5: VP-.

Además, en Venezuela el consumo de carne y de productos cárnicos elaborados es elevado (Fernández *et al.*, 2006) lo cual hace necesario evaluar en ellos la presencia de *E. coli*, más aún porque algunas cepas de *E. coli* son altamente patógenas ya que han desarrollado la capacidad de causar en los humanos enfermedades de los sistemas gastrointestinal, urinario y nervioso (Nataro *et al.*, 1998). Algunos de estos serotipos han sido descritos por la Organización Mundial de la Salud como "una nueva y significativa amenaza a la salud pública", tal es el caso de *E. coli* enterohemorrágica (Echandi y Antillón, 2000), la cual ha sido aislada anteriormente a partir de muestras de carne molida y chorizo expendidos en la ciudad de Cumaná (Villaruel, 1999).

De las 50 cepas de *E. coli* aisladas en la presente investigación, 47 fueron sorbitol positivas (30 de la carne de res y 17 de la porcina) y solo 3 fueron sorbitol negativas aisladas de la carne porcina (Figura 3).

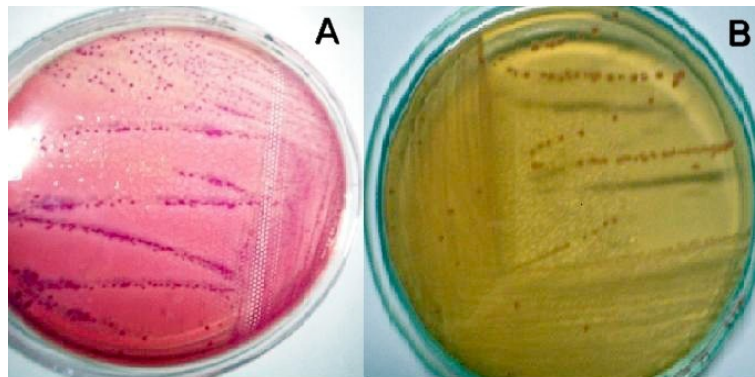


Figura 3. Cepas de *E. coli* en agar MacConkey-Sorbitol. A: *E. coli* sorbitol positiva. B: *E. coli* sorbitol negativa.

Esta capacidad de fermentar sorbitol, como marcador fenotípico, era la característica con base en la cual se hacía la preselección de cepas como posibles STEC cultivadas en agar McConkey-sorbitol (March y Ratnam, 1986; Villarroel, 1999), lo que en la actualidad representa una dificultad en la detección e identificación de este patógeno, en vista de que las cepas STEC no-O157 no poseen una característica bioquímica distintiva que facilite su aislamiento, tal como ocurre con la típica O157:H7, la cual no es capaz de fermentar sorbitol (March y Ratnam, 1986; Villarroel, 1999; Gómez *et al.*, 2005); por ello, en esta investigación, para la selección de cepas de *E. coli* como sospechosas de STEC, se consideraron tanto las sorbitol positivas como las sorbitol negativas.

Identificadas cada una de las cepas como *E. coli*, se procedió a realizar un screening con el kit Dryspot *E. coli* SEROSCREEN de Oxoid, para la identificación serológica de cepas de *E. coli* no-O157 como posibles STEC. Los resultados mostraron que de las 50 cepas aisladas, 47 fueron negativas al kit y solo 3 cepas sorbitol positivas, procedentes de la carne porcina, aglutinaron con el suero, dejando en evidencia la contaminación del producto cárnico, por cepas no-O157 de *E. coli*. En la Figura 4 puede observarse la prueba de aglutinación, en las láminas de látex.

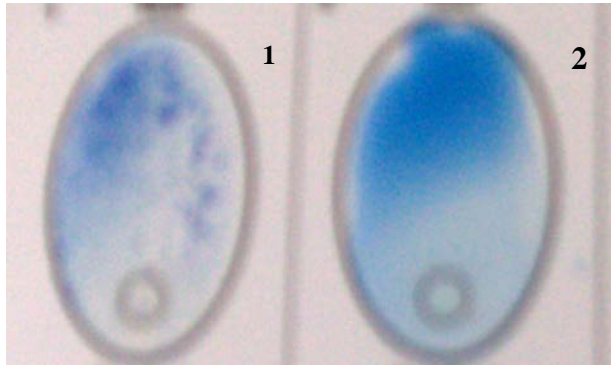


Figura 4. Identificación serológica de cepas no-O157 de *E. coli*. 1: Aglutinación positiva. 2: Aglutinación negativa.

Brooks *et al.* (2001), en un análisis microbiológico realizado a muestras de carne procedentes de distintos supermercados de Dunedin, Nueva Zelanda, logró aislar una cepa de *E. coli* no-O157 de la carne porcina, entre otros aislamientos de distintos productos cárnicos.

De igual modo, en Europa Continental, Alemania, Brasil, Australia, Estados Unidos y Japón, entre otros países, estos serotipos también han sido comúnmente aislados y asociados a diversas enfermedades, desde diarrea no sanguinolenta, la CH y el HUS (Bettelheim, 2000; Eklund *et al.*, 2001; Beutin *et al.*, 2004; Franzolin *et al.*, 2005).

La presencia en la carne porcina de serogrupos no-O157 como posibles STEC, implica un alto riesgo para quienes consuman este producto cárnico, ya que algunos serogrupos de *E. coli* no-O157 (O26, O91, O103, O111, O128 y O145) se encuentran entre los que con mayor frecuencia producen la shiga toxina (Arthur *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Monday *et al.*, 2007); y, en vista de la variedad de factores de virulencia que poseen las no-O157 (Eklund *et al.*, 2001; Beutin *et al.*, 2004), su monitoreo serológico es un indicativo del potencial de amenaza a la salud humana que representa el consumo de la carne porcina cruda o mal cocida contaminada con

este microorganismo de relevancia clínica, asimismo, la caracterización de estas cepas, como posibles STEC, mediante la detección de los genes que codifican su principal factor de virulencia, es de gran importancia a la hora de identificarlas y al determinar su patogenicidad y epidemiología.

Ensayo de PCR para la detección de cepas de *E. coli* productoras de shiga toxinas (STEC)

La especificidad del método PCR en la identificación molecular de los genes que codifican para la producción de shiga toxinas (*stx1* y *stx2*), fue confirmada utilizando una cepa de referencia certificada (*E. coli stx1+* y *stx2+*), por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). Para efectos del ensayo de PCR y medir la sensibilidad de la técnica, se evaluaron las cepas de *E. coli* que resultaron negativas (47) y las que resultaron positivas (3) para el kit para el kit Dryspot *E. coli* SEROSCREEN.

El ensayo de PCR reveló que la combinación de los primers (*stx1*, *stx2* y SRM129), es aplicable en el diseño de esta técnica molecular para la detección de cepas STEC en productos cárnicos. La corrida electroforética de los productos amplificados, mostró tres bandas de aproximadamente 313 bp, indicando la presencia de 3 cepas STEC (2 procedentes de la carne de res y 1 de la carne porcina) con secuencias específicas para la codificación de shiga toxinas (Figura 5), además, permitió confirmar como no productoras de shiga toxinas las 3 cepas identificadas por serología y, en vista de que el kit sólo identifica polisacáridos de superficie de los 6 serogrupos más comunes de cepas no-O157 que generalmente producen shiga toxinas (O26, O91, O103, O111, O128 y O145), se estima que las otras 3 cepas identificadas por PCR pueden no pertenecer a estos serogrupos.



Figura 5. Productos de PCR específicos de cepas STEC, con los primers *stx1*, *stx2* y SRM129. Pozos: 1, Marcador de peso molecular; 2, Control negativo; 3, Control positivo; 5, 9, 12, muestras positivas.

La controversia de cómo unas cepas lograron ser identificadas como positivas por serología para el serogrupo no-O157, y negativas por PCR para secuencias específicas de genes *stx*, puede tener fundamento en el hecho de que muchas cepas de *E. coli* han demostrado la ausencia de estos genes y por lo tanto su incapacidad de producir shiga toxinas, a pesar de tener en su superficie el antígeno específico para serogrupos no-O157 (Karch *et al.*, 1992).

Al respecto, Mellmann *et al.* (2005) reportaron la existencia de cepas de *E. coli* no-O157 que no poseen el gen *stx* en materia fecal de pacientes con Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). Además estos autores observaron que en el monitoreo continuo de materia fecal de pacientes con HUS, la conversión de cepas *stx+* a *stx-* fue significativamente más frecuente entre las cepas de *E. coli* O26 que entre la O157 de otros serogrupos combinados, lo cual sugiere que el gen *stx* puede ser menos estable en las no-O157 que en otras cepas de *E. coli* enterohemorrágica. Señalan

además, que la ausencia del gen en el patógeno depende del momento de recolección de la muestra, ya que se pudo notar la pérdida del gen en algún estado de la infección.

Por su parte, Schmidt *et al.* (1999) en un estudio que realizaron en cepas de *E. coli* en el año 1997, lograron identificar cepas STEC positivas para *stx*. Un año más tarde, cuando quisieron probar actividad tóxica en las células hepáticas, se dieron cuenta que 5 de estas cepas no mostraron actividad. Al aplicar un nuevo ensayo de PCR con primers específicos para los genes *stx*₁ y *stx*₂ a las 5 cepas, pudieron observar que no presentaban genes *stx*, demostrando la pérdida de este en el tiempo. De igual modo, Friedrich *et al.* (2007) demostraron la presencia de cepas O157 *stx* negativas en pacientes con HUS y diarrea. Estos hallazgos les permitieron a los autores sugerir que las cepas que carecen de genes *stx* probablemente provienen de organismos que contenían tales genes pero que subsecuentemente los perdieron.

En relación al mecanismo por el cual algunas STEC pueden perder los genes *stx*, Schmidt *et al.* (2001) sugieren, que esta variación genética quizás es el producto de las múltiples replicaciones o subcultivos de las cepas bacterianas. Este fenómeno fue descrito por Karch *et al.* (1992) en cepas STEC pertenecientes a los serotipos O2:H5, O26:H11, O73:H34, y O100:H32. Por su parte, Friedrich *et al.* (2007) proponen que la pérdida de este marcador de virulencia puede ocurrir en algún estado de la infección, debido a que el sitio de integración del fago convertidor de *stx* en el genoma podría ser un factor que influye en la estabilidad de los genes *stx*.

Por lo tanto y desde el punto de vista de la patogénesis, las cepas STEC de *E. coli* productoras o no de shiga toxinas, tienen relevancia clínica, ya que se ha demostrado que en aislados de pacientes con HUS, cepas carentes del gen para Stxs, han provocado la enfermedad por un mecanismo independiente de la Stx y probablemente hayan colonizado a los pacientes sin estar involucrados en la

patogénesis del síndrome (Schmidt *et al.*, 1999; Mellmann *et al.*, 2005; Friedrich *et al.*, 2007).

En función de lo antes expuesto y para efecto de este estudio, el número de cepas positivas halladas por serología y por PCR, son consideradas como positivas para efecto de reporte epidemiológico de este patógeno en alimentos de origen cárnico.

La presencia de cepas STEC en carne de res y porcina coincide con los resultados obtenidos por Levine (1987), Karmali (1989), Blanco *et al.* (1996), Borie *et al.* (1997), Parma *et al.* (2000), Zhou *et al.* (2002) y Padola *et al.* (2004), quienes además de hallar este patógeno en productos cárnicos, alegan que los bovinos y porcinos son importantes reservorios de STEC. Por ende, ambas especies animales como principales vehículos de transmisión de las *E. coli*, constituyen un riesgo a la salud pública, si éstos no son procesados del modo más idóneo para su venta.

Reportes en España como por ejemplo el de Blanco *et al.* (2003), ponen en evidencia que muestras de carne cruda son potenciales vehículos de transmisión de STEC no-O157, ya que pueden mostrar una prevalencia de hasta el 12%. De igual modo, en los Estados Unidos la frecuencia de estas cepas es tan alto, que en Enero de 2002 la "American Society for Microbiology Public and Scientific Affaire Board Committee on Agriculture and Food Microbiology" recomendó la necesidad de incluir el diagnóstico de serotipos STEC de *E. coli*, en los servicios de inspección alimentaria (Parck *et al.*, 2002).

En otros estudios realizados por Hussein y Sakuma (2005), determinaron que las STEC no-O157 fueron el serogrupo de *E. coli* con mayor prevalencia en el ganado bovino, logrando un aislamiento de 39 serogrupos O (entre ellos O26:H11, O91: H⁻, O103:H2, O111: H⁻ y O145 H⁻) para un total de 77 serotipos de STEC. Este

hecho implica un alto riesgo para quienes consuman productos cárnicos, aún más teniendo en cuenta que son las no-O157 las cepas mas comúnmente aisladas (Wang *et al.*, 2002), incluso en personas con diarrea o HUS (Scotland *et al.*, 1988; Tzipori *et al.*, 1988; Dorn *et al.*, 1989; Eklund *et al.*, 2001; Brooks *et al.*, 2005).

En Latinoamérica, la República de Argentina se ha ubicado como uno de los países con mayor reporte de estas cepas, en especial en carne bovina (Rivero *et al.*, 2004). Tal es el caso del reporte realizado por Cicuta *et al.* (2006), quienes trabajando con carne molida expendida en la población de Corrientes (Argentina) lograron identificar por PCR, STEC no-O157 en 1,3% de las 75 cepas identificadas como *E. coli* (39 de reses bovinas y 36 de carnes molidas), refiriendo el método como sensible y relativamente rápido en el diagnóstico de este patógeno.

En esta investigación, el hecho de reportar por primera vez la circulación de cepas STEC en carne de res y porcina en nuestro país, deja al descubierto la importancia de mantener un sistema de monitoreo y vigilancia de estos productos cárnicos, en especial los que ingresan por importación, quedando claramente establecido que la epidemiología de esta bacteria indica que los mecanismos de transmisión están relacionados con el consumo de carne vacuna o productos lácteos contaminados (Huguet *et al.*, 2002); bien sea en el mismo momento de sacrificio del animal en el matadero, o por la manipulación errónea por parte de los expendedores de los distintos puntos de ventas del Mercado Municipal de Cumaná. Este tipo de situación representa un alto riesgo para quienes consumen carne cruda o mal cocida, en vista de que este patógeno tiene una baja dosis infectiva, sólo 100 bacterias pueden producir la infección (Rivero *et al.*, 2004; Gómez *et al.*, 2005), conllevando así graves consecuencias al consumidor, desde un simple cuadro de diarrea hasta el padecimiento del síndrome urémico hemolítico (HUS). Así lo señala Rivas *et al.* (1996), quienes demostraron por primera vez en Argentina, la asociación entre esta patología y el consumo de hamburguesas caseras contaminadas por STEC, las cuales

llegaron a alcanzar una tasa de incidencia de HUS de 12.5 casos por cada 100 000 niños menores de 5 años en el año 2004 en este mismo país, la más alta a nivel mundial.

En Venezuela, la prevención de enfermedades y demás aspectos sanitarios del ganado se ha visto desmejorada por razones socio-económicas y de seguridad rural. Asimismo, la higiene en mataderos, procesadores, frigoríficos almacenadores y expendios al mayor y al detal (supermercados y carnicerías) deja aún mucho que desear (Arenas y Huerta, 2005). Por ello, y pensando en la salud del consumidor, se hace necesario la continua evaluación microbiológica de los productos cárnicos, a modo de mantener un registro constante que indique la calidad de los alimentos que se ofertan en el Mercado, principalmente aquellos susceptibles de contaminación, en vista de que el aspecto más importante para quienes consumen productos cárnicos es la inocuidad con la que llega este rubro comercial a manos del consumidor, pero muchas veces ante la necesidad de obtener estos productos en función de la capacidad económica, se recurre a expendios públicos donde las condiciones de manipulación y conservación no son los más adecuadas, lo que trae como consecuencia, la adquisición de un producto contaminado por microorganismos que pueden ser agentes infecciosos causantes de diarrea, que pueden fácilmente diseminarse por vía digestiva.

Es conveniente tener siempre en cuenta, que los alimentos juegan un papel importante en la transmisión de enfermedades de origen alimentario y la magnitud del impacto socio-económico que generan estas enfermedades es difícil de medir, más aún cuando muchos casos ni siquiera son informados. Se consideran como la mayor causa de morbilidad, tanto en países industrializados como en vías de desarrollo, y en estos últimos, son causa frecuente de mortalidad (Todd, 1989; Echandi y Antillón, 2000).

CONCLUSIONES

La carne de res y la porcina están siendo comercializadas en el Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná con niveles de coliformes fuera de los rangos establecidos por la ICMSF, lo que indica la ausencia de condiciones higiénicas satisfactorias.

El aislamiento de cepas de *E. coli* en estos productos cárnicos es un indicativo de contaminación de origen fecal.

Existe un riesgo a la salud pública en el Mercado Municipal de Cumaná, ya que se aislaron cepas no-O157 en la carne porcina y se detectaron cepas STEC tanto en la carne de res como en la porcina, lo cual evidencia que se está ante la presencia de un microorganismo con una elevada capacidad patogénica y son estos productos un vehículo para su transmisión.

Las cepas identificadas como no-O157 y las STEC resultaron ser sorbitol positivas, lo cual es una evidencia de la respuesta variable a la prueba de fermentación de sorbitol de estos grupos patogénicos.

RECOMENDACIONES

Validar los datos obtenidos con muestreos periódicos.

Desarrollar normas higiénico-sanitarias para implementarlas en los puntos de ventas de los productos cárnicos, a fin de evitar posibles brotes epidémicos por la contaminación microbiana de los alimentos.

El ministerio de sanidad debe exigir y supervisar periódicamente, en los expendios de productos cárnicos, el cumplimiento de las normas higiénico-sanitarias.

Debe realizarse la adecuada cocción de la carne, para eliminar patógenos que estén presentes y puedan afectar la salud del consumidor.

Deben realizarse periódicamente análisis microbiológicos de estos productos, para descartar la presencia de microorganismos que puedan afectar la salud humana.

Concientizar a la población cumanesa y a los expendedores, mediante campañas educativas, sobre el manejo inadecuado de alimentos para su consumo, con la finalidad de evitar posibles brotes comunitarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Arenas, L. y Huerta, N. 2005. *Manual de ganadería, doble propósito*. Instituto de Investigaciones Agronómicas, Núcleo Agropecuario. Universidad del Zulia.
- Arthur, T.; Barkocy, G. y Rivera, M. 2002. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (10): 4847-4852.
- Astorga, J.; Avendaño, S.; Bengoa, S.; Cordano, A.; Fernández, M.; Insunza, M.; Jacob, C.; López, L.; Marambio, E.; Parada, V. y Venegoni, C. 1998. *Manual de técnicas microbiológicas para alimentos y agua*. Instituto de Salud Pública de Chile. Chile.
- Becerril, M. y Romero, R. 2004. *Parasitología médica: de las moléculas a la enfermedad*. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Bettelheim, K. 2000. Role of non-O157 VTEC. *Journal of Applied Microbiology Supplement*, 88: 38-50.
- Beutin, L.; Krase, G.; Zimmermann, S.; Kaulfuss, S. y Gleier, K. 2004. Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (3): 1099-1108.
- Blanco, J.; Blanco, M. y Blanco, J. 1995. *Escherichia coli* enterohemorrágica,

verotoxigénicas y necrotoxigénicas en alimentos y en muestras clínicas. Papel de los animales como reservorio de cepas patógenas para el hombre. *Microbiología Semanal, II*: 97-110.

Blanco, J.; Blanco, M.; Blanco, J.; Mora, A.; González, E.; Bernárdez, M.; Alonso, M.; Coira, A.; Rodríguez, A.; Rey, J.; Alonso, J. y Usera, M. 2003. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental Biology and Medicine*, 228: 345-351.

Blanco, L.; Blanco, J. y Blanco, J. 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.

Borie, C.; Monreal, Z.; Guerrero, P.; Sánchez, M.; Martínez, J.; Arellano, C. y Prado, V. 1997. Prevalencia y caracterización de *Escherichia coli* enterohemorrágica aisladas de bovinos y cerdos sanos faenados en Santiago, Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 29 (2): 205-212.

Bravo, V. y Villalobos de Bastardo, L. 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22 (2): 119-121.

Brooks, H.; Mollison, B.; Bettelheim, K.; Matejka, K.; Paterson, K. y Ward, V. 2001. Occurrence and virulence factors of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in retail meat in Dunedin, New Zealand. *Letters in Applied Microbiology*, 32: 118-122.

- Brooks, J.; Sowers, E.; Wells, J.; Greene, K.; Griffin, P. y Hoekstra, R. 2005. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *Journal of Infectious Diseases*, 192: 1422-1429.
- Bryan, F. 1978. Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) Systems for retail food and restaurant operations. *Journal Food Protection*, 41: 816-27.
- Caballero, A.; Carrera, J. y Lengomín, M. 1998. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 12 (1): 7-10.
- Caiced, J. 2000. "Intoxicaciones alimentarias". <http://osso.univalle.edu.co/docs/plani/cap03/text12.htm>. (12/01/2008).
- Chinen, I.; Tanaro, J.; Miliwebsky, E.; Lound, L.; Chillemi, G.; Ledri, S.; Baschkier, A.; Scarpin, M.; Manfredi, E. y Rivas, M. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *Journal Food Protection*, 64: 1346-1351.
- Cicuta, M.; Deza, N.; Roibón, W.; Pereyra, D.; Benitez, M.; Arzú, R. y Boehringer, S. 2006. Detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga en reses bovinas y carne molida de Corrientes, Argentina. *Revista Veterinaria*, 17 (1): 20-25.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1984. Resolución 1086 – 1984. Alimentos, métodos para el recuento de coliformes en placa de Petri. 1ª revisión.
- Dorn, C.; Scotland, S.; Smith, H.; Willshaw, G. y Rowe, B. 1989. Properties of

- verocytotoxin-producing *Escherichia coli* of human and animal origin belonging to serogroups other than O157:H7. *Epidemiology and Infection*, 103: 83-95.
- Echandi, M. y Antillón, F. 2000. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. *Revista de Biomedicina*, 11: 113-122.
- Eklund, M.; Scheutz, F. y Siitonen, A. 2001. Clinical isolates of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli*: serotypes, virulence characteristics, and molecular profiles of strains of the same serotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 39 (8):2829-2834.
- Fernández, A.; Izquierdo P.; Valero, K.; Allara, M.; Piñero, M. y García A. 2006. Efecto del tiempo y temperatura de almacenamiento sobre la calidad microbiológica de carne de hamburguesa. *Revista Científica FCV-LUZ*, 16 (4): 428 – 437.
- Food and Drug Administration (FDA). 1992. *Manual of operations*. Part I. US. Department of health and human services. Washington, D.C. USA.
- Forrest, J. 2006. Meat spoilage, meat safety and quality. Trabajo de Investigación. Animal Sciences Department, University of Purdue, Indiana.
- Franzolin, M.; Barbosa, R.; Keller, R.; Tardelli, T.; Beutin, L.; Barreto, M.; Milroy, C.; Strina, A.; Ribeiro, H. y Trabulsi, L. 2005. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* in children with diarrhea in Salvador, Bahia, Brazil. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 100 (4): 359-363.
- Fratamico, P.; Bagi, L.; Bush, E. y Solow, B. 2004. Prevalence and

characterization of shiga toxin producing *Escherichia coli* in swine feces recovered in the national animal health monitoring system swine 2000 study. *Applied Environmental Microbiology*, 70 (12): 7173-7178.

Frazier, W. 1976. *Microbiología de los alimentos*. Segunda edición. Acribia. España.

Friedrich, A.; Zhang, W.; Bielaszewska, M.; Mellmann, A.; Köck, R.; Fruth, A.; Tschape, H. y Karch, H. 2007. Prevalence, Virulence Profiles, and Clinical Significance of Shiga Toxin–Negative Variants of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Infection in Humans. *Clinical Infectious Diseases*, 45: 39-45.

García, M. y Pérez, J. 1981. Relación de la calidad de agua de consumo con enfermedades de transmisión digestiva. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 19: 451-457.

Gómez, A. 2002. Síndrome diarreico agudo: Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico. *Revista Chilena de Infectología*, 19: 2- 4.

Gómez, D.; Miliwebsky, E.; Silva, A.; Deza, N.; Zotta, C.; Cotella, O.; Martínez, E.; Chinen, I.; Fernández, C. y Rivas, M. 2005. Aislamiento de *Escherichia coli* productor de toxina shiga durante un brote de gastroenteritis en un jardín maternal de la ciudad de Mar del Plata. *Revista Argentina de Microbiología*, 37: 176-181.

Griffith, A.; Miller, J.; Suzuki, D.; Lewontin, R. y Gelbart, W. 1993. *Introducción al análisis genético*. Quinta edición. McGraw-Hill Interamericana. España.

- Hahm, B.; Maldonado, Y.; Schreiber, A.; Bhunia, K. y Nakatsu, H. 2003. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rcp-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. *Journal Microbiology Methods*, 53:387-399.
- Heller, L.; Davis, R.; Peak, K.; Wingfield, D.; Cannons, P. y Cattani, J. 2003. Comparison of methods for DNA isolation from food samples for detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli* by real-time PCR. *Applied Environmental Microbiology*, 69:1844-1846.
- Huguet, J.; Huapaya, B. y Salazar, E. 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escherichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 19 (2): 63-67.
- Hunt, P. y Hardy, S. 1991. Heat-labile enterotoxin can be released from *Escherichia coli* cells by hot intestinal factor. *Infection and Immunity*, 59: 168-171.
- Hussein, H. y Sakuma, T. 2005. Invited review: prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy and their products. *Journal of Dairy Science*, 88: 450-465.
- International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMFS). 1975. *Microbiología de alimentos: técnicas y análisis microbiológico*. Volúmen I. Segunda edición. ACRIBIA. España.
- Iriarte, M. 1993. *Manual de prácticas de laboratorio de microbiología de los alimentos*. Colección Cuadernos Flasa. Serie Ciencia y Tecnología, Nº 5.

- Karch, H.; Meyer, T.; Russmann, H. y Heesemann, J. 1992. Frequent loss of shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infection and Immunity*, 60: 3464-3467.
- Karmali, M. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2: 15-38.
- Leotta, I.; Chinen, S.; Epszteyn, E.; Miliwebsky, I.; Melamed, M.; Ferrer, M. y Marey, 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.
- Levine, M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases*, 155: 377-389.
- Maldonado, Y.; Fiser, J.; Nakatsu, C. y Bhunia, A. 2005. Cytotoxicity potencial and genotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from environmental and food sources. *Applied Environmental Microbiology*, 71 (4): 1890-1898.
- March, S. y Ratnam, S. 1986. Sorbitol-MacConkey medium for detection of *Escherichia coli* O157:H7 Associated with hemorrhagic colitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 23: 869:872.
- Margall, N.; Domínguez, A.; Prats, G. y Sallera, L. 1997. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *Revista Española de Salud Pública*, 5: 71-5.
- Marzocca, M.; Marucci, P.; Sica, M. y Álvarez, E. 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas.

Revista Argentina de Microbiología, 38: 38-40.

Mellmann, A.; Bielaszewska, M.; Zimmerhackl, L.; Prager, R.; Harmsen, D.; Tschäpe, H. y Karch, H. 2005. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: *in vivo* evolution of a bacterial pathogen. *Clinical Infectious Diseases*, 41 (6):785-792.

Mims, C.; Playfair, J.; Roih, I.; Wakelin, D. y Willians, R. 1999. *Microbiología médica*. Segunda edición. Harcourt Brace de España. España.

Monday, S.; Beisaw, A. y Feng, P. 2007. Identification of shiga toxigenic *Escherichia coli* seropathotypes A and B by multiplex PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 21: 308-311.

Monday, S.; Keys, C.; Hanson, P.; Shen, Y.; Whittam, T. y Feng, P. 2006. Produce isolates of *Escherichia coli* Ont:H52 serotype that carry both shiga toxin 1 and stable toxin genes. *Applied and Environmental microbiology*, 72(4): 3062–3065.

Mossel, D. Y Struijk, C. 1995. *Escherichia coli*, otras enterobacterias e indicadores adicionales como marcadores de la calidad microbiológica de los alimentos. *Microbiología Semanal*, II: 75-90.

Nataro, J.; Steiner, T. y Guerrant, R. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases*, 4: 251–261

Ohara, T.; Kojio, S.; Taneike, I.; Nakagawa, S.; Gondaira, F.; Tamura, Y.; Gejyo, F.; Zhang, H. y Yamamoto, T. 2002. Effects of azithromycin on shiga toxin production by *Escherichia coli* and subsequent host inflammatory response.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46 (11): 3478-3483.

Padola, N.; sanz, M.; Blanco, J.M.; Blanco, M.; Blanco, J.; Etcheverria, A.; Arroyo, G.; Usera, M. y Parma, A. 2004. Serotypes and virulence genes of bovine shigatoxigenic *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. *Veterinary Microbiology*, 100: 3-9.

Parck, C.; Kim, H. y Hixon, D. 2002. Importance of testing stool specimens for shiga toxins. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 3542-3543.

Parma, A.; Sanz, M.; Blanco, J.M.; Blanco, J.; Viñas, M.; Blanco, M.; Padola, N. y Etcheverria, A. 2000. Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and foods in Argentina. *European Journal of Epidemiology*, 16: 757-762.

Paton, A. y Paton, J. 1998. Detection and characterization of shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36 (2):598–602.

Paton, A. y Paton, J. 2002. Direct detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by multiplex PCR for *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA* and *saa*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (1): 271-274.

Paton, A.; Voss, E.; Manning, P. y Paton, J. 1997. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from cases of human disease show enhanced adherence to intestinal epithelial (henle 407) cells. *Infection and Immunity*, 65 (9): 3799-3805.

- Pistone, V.; Fernández, M.; Martín, F.; Zotta, E.; Silberstein, C. y Ibarra, C. 2004. The shiga toxin 2 B subunit inhibits net fluid absorption in human colon and elicits fluid accumulation in rat colon loops. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37: 799-808.
- Prescott, L.; Harley, J. y Donald, K. 2004. *Microbiología*. Quinta edición. McGraw-Hill Interamericana. España.
- Radu, S.; Linga, O.; Rusulb, M.; Karima, A. y Nishibuchi, M. 2001. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. *Journal Microbiology Methods*, 46:131-139.
- Rivas, M.; Leotta, G. y Chinen, I. 2007. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina shiga a partir de alimentos. Departamento Bacteriología Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
- Rivas, M.; Voyer, L.; Tous, M. De Mena, M.; Leardini, N.; Wainsztein, R.; Callejo, R.; Quadri, B.; Corti, S. y Prado, V. 1996. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in family members of children with hemolytic uremic síndrome. *Medicina (Buenos Aires)*, 56: 119-125.
- Rivero, M.; Padola, N.; Etcheverria, A. y Parma, A. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 64: 352-356.
- Rodríguez, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos

- patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de Mexico*, 44: 464-475.
- Schmidt, H. 2001. Shiga-toxin-converting bacteriophages. *Research Microbiology*, 152: 687-695.
- Schmidt, H.; Scheef, J.; Huppertz, H.; Frosch, M. y Karch, H. 1999. *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H strains that do not produce shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(1): 3491-3496.
- Scotland, S.; Rowe, B.; Smith, H.; Willshaw, G. y Gross, R. 1988. Verocytotoxin-producing strains of *Escherichia coli* from children with haemolytic uremic syndrome and their detection by specific DNA probes. *Journal of Medical microbiology*, 25: 237- 243.
- Shima, K.; Terajima, J.; Sato, T.; Nishimura, K.; Tamura, K.; Watanabe, H.; Takeda, Y. y Yamasaki, S. 2004. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for the epidemiological analysis of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42 (11):5205–5213.
- Siegler, R.; Pavia, A.; Christofferson, R. y Milligan, M. 1995. A 20-year population-based study of postdiarrheal hemolytic syndrome in Utah. *Pediatrics*, 94: 35-40.
- Soto, Y. 2007. Evaluación microbiológica de la carne de res de Puerto Rico sometida a dos formas de empaques. Trabajo de Maestría. Departamento de Ciencias y Tecnología de los Alimentos, Recinto Universitario de Mayagüez, Puerto Rico.

- Stanfield, W. 1992. *Genética*. Tercera edición. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Todd, E. 1989. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the United States. *Journal Food Protection*, 52: 595-601.
- Tzipori, S.; Wachsmuth, K.; Smithers, J. y Jackson, C. 1988. Studies in genotobiotic piglrts on non-O157:H7 *Escherichia coli* serotypes isolated from patients with hemorrhagic colitis. *Gastroenterology*, 94: 590-597.
- Villarroel, J. 1999. Aislamiento de *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH) en productos cárnicos provenientes del mercado municipal de la ciudad de Cumaná. Trabajo de Grado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.
- Walker, S. 2000. *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Wang, G.; Clark, C. y Rodgers, F. 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (10): 3613–3619.
- Warseck, M.; Ray, B. y Speck, M. 1973. Repair and enumeration of injured coliforms in frozen foods. *Applied of Microbiology*, 26: 919-927.
- Zhou, Z.; Nishikawa, Y.; Zhu, P.; Hong, S.; Hase, A.; Cheasty, T.; Smith, H.; Zheng, M. y Haruki, K. 2002. Isolation and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 from beef, pork and cattle fecal samples in Changehun, China. *Journal Veterinary Medic Sciences*, 64 (11): 1041-1044.

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Detección de <i>Escherichia coli</i> productora de shiga toxina (STEC) en muestras de carne de res y porcina comercializadas en el mercado municipal de la ciudad de Cumaná.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Cardozo Rodríguez Lourdes Teresa de Jesus	CVLAC	16 816 215
	e-mail	loucr2006@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Escherichia coli</i> , Shiga toxina , STEC .

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

Esta investigación tuvo como objetivo principal, detectar la presencia de cepas de *Escherichia coli* productora de shiga toxina (STEC) en muestras de carne de res y porcina comercializadas en el Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná; para ello, se analizaron 35 muestras frescas de carne de res y 35 de carne porcina. A ambos productos, se les determinaron los niveles de coliformes mediante recuentos en placa (COVENIN resolución 1086-84), seguido del aislamiento de cepas de *E. coli* e identificación fenotípica por pruebas bioquímicas convencionales según la FDA (1992). Las cepas identificadas como *E. coli* fueron probadas serológicamente con el kit Dryspot *E. coli* SEROSCREEN (Oxoid) para serogrupos no-O157. Luego se llevó a cabo la extracción del ADN bacteriano de acuerdo con Rivas *et al.* (2007). La detección de cepas STEC se realizó por la reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Para el recuento de coliformes se obtuvo un valor promedio de $1,18 \times 10^6$ ufc/g para la carne de res y $7,24 \times 10^5$ ufc/g para la porcina; siendo estos niveles en ambos productos superiores a lo establecido por la ICMSF ($5,0 \times 10^3$ ufc/g) para las carnes crudas. Se aislaron e identificaron un total de 50 cepas de *E. coli* (30 en la carne de res y 20 en la porcina), de las cuales 3 (sorbitol positivas), aisladas de la carne porcina, resultaron ser no-O157. El ensayo de PCR permitió detectar 3 cepas STEC sorbitol positivas (2 de la carne de res y 1 de la porcina); además mostró que las 3 cepas no-O57 de origen porcino carecían de genes *stx*. Estos resultados revelan condiciones higiénico-sanitarias poco satisfactorias en los puestos de ventas de estos productos cárnicos, y la circulación de cepas STEC en ambos productos. En vista de la relevancia clínica de este patógeno, su detección hace necesaria la implementación de normas y exigencias para la manipulación de estos alimentos por parte de los expendedores, con la finalidad de evitar brotes epidémicos de enfermedades asociadas a STEC.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Martínez Rosa Elena	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
Villalobos Luz Bettina	ROL	CA <input checked="" type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
Bastardo Jesús	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
Araque Yasmina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2009	04	30
------	----	----

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_LTJCR.doc	APPLICATION/Word

Alcance:

Espacial: _____ (Opcional)

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Biología

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente del Núcleo de Sucre

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

Derechos:

Autorizo publicar en la Web solo el título y el resumen de este trabajo de grado.



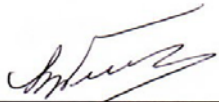
Lourdes Cardozo

AUTOR



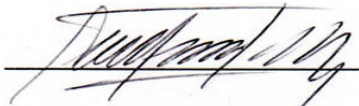
Rosa E. Martínez

ASESORA



Luz B. Villalobos

COASESORA



Jesús Bastardo

JURADO 1



Yasmina Araque

JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

