



INFORME BREVE

Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos

Mónica Z. Alonso, Marcelo E. Sanz, Nora L. Padola* y Paula M.A. Lucchesi

Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Centro de Investigación Veterinaria de Tandil (CIVETAN)-CONICET-CICPBA, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNCPBA, Tandil, Argentina

Recibido el 2 de enero de 2014; aceptado el 11 de abril de 2014

PALABRAS CLAVE

EPEC;
Pollo;
Faena;
Cloaca;
Carcasa

Resumen

En Argentina, *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) es uno de los agentes más prevalentes aislados de niños con diarrea. Debido a que la contaminación con este patotipo en productos de pollo podría ocurrir durante el proceso de faena, nos planteamos como objetivo aislar y caracterizar EPEC de muestras de animales vivos (cloacas), carcasas evisceradas sin lavar, carcasas lavadas y agua del tanque de enfriamiento. Se caracterizaron 29 aislamientos de EPEC que presentaron una amplia variedad de serotipos, algunos de los cuales (O2:H40, O8:H19 y O108:H9) han sido informados en otras especies animales. También se encontró el serotipo O45:H8, aislado con anterioridad de niños con diarrea. Se detectaron aislamientos de los serotipos O2:H40, O108:H9 y O123:H32 en distintas etapas del proceso de faena, lo que sugiere que el procesamiento no se realiza en forma adecuada. Se torna necesario reforzar las medidas de control e higiene en las distintas etapas del proceso para disminuir la contaminación microbiana.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

EPEC;
Chicken;
Slaughter;
Cloacae;
Carcass

Characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains isolated during the chicken slaughtering process

Abstract

In Argentina, EPEC is one of the most prevalent agents isolated from children with diarrhea. Because contamination with this pathotype could occur during slaughter, the aim of this study was to isolate and characterize EPEC strains obtained from live animals (cloacae), eviscerated carcasses, washed carcasses and water from chillers. Twenty nine isolates of atypical EPEC were characterized. These isolates presented a wide variety of serotypes, some of which (O2:H40, O8:H19 and O108:H9) had been reported in other animal species. Serotype O45:H8, previously isolated from children with diarrhea was

* Autor correspondencia.

Correo electrónico: nlpadola@vet.unicen.edu.ar (N.L. Padola).

also found. Isolates of serotypes O2:H40, O108:H9 and O123:H32 were detected at different stages of the slaughtering process, suggesting that the process is not adequately performed. This latter fact highlights the importance of reinforcing control and hygienic measures at different stages of the chicken slaughtering process in order to reduce microbial contamination.

© 2014 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Escherichia coli enteropatógeno [enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)] produce diarrea acuosa en niños y ha sido responsable de varios brotes a nivel mundial. En Argentina, la incidencia de diarreas infantiles es de 150/100 000 en niños menores de cinco años¹², y EPEC es uno de los agentes más prevalentes. EPEC produce una lesión característica denominada A/E ("attaching and effacing") mediada por la intimina (codificada por el gen *eae*), el receptor trasladado de la intimina y otras proteínas secretadas. La intimina puede presentar variantes que difieren en la región de unión al receptor^{2,9}. Es importante aclarar que el gen *eae* no es exclusivo de EPEC, ya que existen cepas de *E. coli* productoras de verotoxinas que también lo portan.

Algunas cepas EPEC tienen la capacidad de expresar una fimbria llamada BFP ("bundle forming pili"), que permite formar redes tridimensionales entre las bacterias y cuya subunidad principal está codificada por el gen *bfpA*. La presencia o ausencia de BFP permite clasificar a las cepas EPEC en típicas y atípicas, respectivamente¹⁴. Las cepas EPEC atípicas tienen mayor prevalencia que las típicas, tanto en los países en desarrollo como en los desarrollados¹⁰.

Los serotipos más frecuentes entre las cepas EPEC típicas son O55:H6, O55:H-, O86:H34, O111:H2, O111:H-, O114:H2, O119:H6, O119:H-, O127:H6, O142:H6 y O142:H34¹⁴. Dentro de las EPEC atípicas se ha descrito una amplia variedad de serotipos a nivel mundial, entre los cuales predominan O33:H6, O51:H40, O51:H49, O111:H-, O119:H2, O127:H40, O132:H34, O145:H-, OR:H- y una gran proporción de ONT⁶. Sin embargo, un mismo serogrupo puede estar asociado a una cepa típica o a una atípica (O55, O86)¹³.

Al igual de lo que sucede con otras *E. coli* diarreogénicas, la transmisión de EPEC ocurre por vía fecal-oral a través de manos, agua y alimentos contaminados. La contaminación de los alimentos puede ocurrir durante el proceso de faena de los animales que son reservorios de la bacteria: bovinos, cerdos y pollos, entre otros^{1,8}. En el caso de los pollos, y específicamente en la planta de faena muestreada, una vez que arriban a la planta los pollos son colocados en una noria de colgado, insensibilizados y desangrados. Luego se realizan los pasos de escaldado y pelado. El eviscerado es automatizado, ayudado por operarios que quitan restos de la evisceración. La carcasa es lavada tanto en la superficie externa como interna con agua potable corriente y clorada aplicada a presión, y luego ingresa en dos tanques para su enfriamiento. Por último, la carcasa es escurrida y envasada.

Debido a que EPEC ha sido comunicado en materia fecal, carne y carcasas de pollo, pero no durante su procesamiento, nos planteamos como objetivo aislar y caracterizar cepas EPEC de muestras *eae* positivas obtenidas en distintas etapas del proceso de faena (animales vivos, carcasas evis-

ceradas sin lavar, carcasas lavadas después del pasaje por los tanques de enfriamiento y muestras de los tanques de enfriamiento) en un trabajo previo¹.

En el presente trabajo, a partir de las zonas confluentes positivas para *eae* conservadas a -70 °C se sembraron en estría placas de agar Mac Conkey y se cultivaron 24 h a 37 °C. Se realizaron *pools* de 5 colonias y se realizó PCR multiplex para detectar *eae* y los genes de verotoxinas *vt*₁ y *vt*₂¹. De los *pools* positivos a *eae*, cada colonia individual se cultivó en 800 µl de caldo LB durante 18 h a 37 °C con agitación y se realizó nuevamente la PCR multiplex. La detección de los genes *vt*₁ y *vt*₂ se incluyó para identificar a los aislamientos correspondientes a EPEC (*eae*-positivos pero *vt*-negativos) y diferenciarlos de *E. coli* productores de verotoxinas.

Cada aislamiento de EPEC se procesó para detectar *bfpA* por PCR monoplex según Gunzburg *et al.*⁵ y la presencia de las variantes α , β , γ y ϵ del gen *eae* según la metodología descrita por Oswald *et al.*¹¹. Los antígenos O y H se determinaron por la técnica de microaglutinación en placa y tubo, respectivamente, con un *kit* de antiseros (O1-O186) y 56 antiseros H producidos por el Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC) (Lugo, España).

Se obtuvo un total de 29 aislamientos EPEC, ninguno de los cuales presentó el gen *bfpA*, lo que indica que los pollos y las carcasas estaban contaminados con cepas EPEC atípicas, en concordancia con los resultados obtenidos por Krause *et al.*⁹ y Farooq *et al.*³ en materia fecal de pollos. Este dato también concuerda con los publicados por Trabulsi *et al.*¹⁴, quienes demostraron que serotipos de cepas EPEC atípicas estaban asociados con huéspedes animales.

Los aislamientos presentaron 12 antígenos O diferentes (O2, O3, O4, O8, O25, O45, O108, O119, O123, O153, O177 y OR), mientras que 5 aislamientos fueron NT (ausencia de reacción con los antiseros empleados) y uno se clasificó como O? (reacción con más de un antisuero en título similar), combinados con 10 antígenos H diferentes (H4, H8, H9, H19, H21, H26, H28, H32, H40 y H49), mientras que un aislamiento fue no móvil. No se observó predominio de ningún serotipo en particular (tabla 1).

Algunos serotipos se encontraron en distintas etapas del proceso de faena, por ejemplo, en el segundo muestreo se detectó un aislamiento O2:H40 en el interior de una carcasa eviscerada sin lavar y otro en el interior de una carcasa lavada. Además, en el tercer muestreo se detectaron aislamientos O123:H32 tanto en el interior de carcasas evisceradas sin lavar como en la superficie de una carcasa lavada, mientras que se identificaron aislamientos del serotipo O108:H9 en el agua de un tanque de enfriamiento y en la superficie de una carcasa lavada en el mismo muestreo.

Se ha informado la presencia de algunos de los serotipos EPEC encontrados en cloacas y carcasas en otras especies

Tabla 1 Serotipos de EPEC en la planta de faena. Se indica la variante de intimina entre paréntesis

Muestreo	Cloacas	Carcasas evisceradas sin lavar ^a (superficie interna)	Tanque de enfriamiento	Carcasas lavadas	
				Superficie externa	Superficie interna
1°	O8:H19 (ND) ^a			O45:H8(β) ^b	OR:H32(β) ^c
	O119:H4 (β)			O8:H28(β) ^b	ONT:H19(β) ^c
	ONT:H49 (ND)				
2°	O108:H40 (β)	O2:H40 (ND)			O4:H21 (β)
	O177:H40 (ND)	O3:H26 (β)			O4:H- (ND)
	ONT:H40 (ND)				O8:H21 (β)
					O25:H32 (β)
					O153:H26 (β)
3°	O2:H40 (ND)	O123:H32 (β)	O108:H9 (β)	O8:H21 (ND)	O108:H9 (β)
	O108:H40 (β)	O123:H32 (β)		O123:H32 (β)	ONT:H21 (β)
	ONT:H40 (ND)				O?:H40 (ND) ^d

^a ND: no determinada, fue negativa para las variantes α, β, γ, ε.
^b Serotipos aislados de la misma carcasa.
^c Serotipos aislados de la misma carcasa.
^d O?: reacción con más de un antisuero en igual título.

animales (O2:H40, O8:H19 y O108:H9) y en niños con diarrea (O45:H8)⁹. El serotipo O4:H- fue identificado previamente como VTEC portador de intimina en bovinos con diarrea y carne picada, y estuvo asociado a casos de SUH⁷. Este dato es importante, ya que algunos autores postulan que tanto cepas VTEC como así también cepas EPEC típicas pueden convertirse en EPEC atípicas durante la infección debido a la pérdida de elementos genéticos móviles como bacteriófagos o plásmidos codificantes de *vt* y *bfp*, respectivamente⁶.

Por otra parte, en el presente trabajo se detectaron nuevos serotipos de EPEC como O3:H26, O4:H21, O8:H21, O8:H28, O25:H32, O108:H40, O123:H32, O153:H26 O177:H40 y OR:H32, que no habían sido comunicados previamente en la bibliografía a nivel mundial.

La mayoría de los aislamientos (65 %) presentó la variante β de la intimina, en concordancia con lo hallado por Kobayashi *et al.*⁸, quienes detectaron dicha variante en 12 cepas EPEC atípicas provenientes de cloacas de pollos parrilleros. Esta variante se encuentra ampliamente distribuida en cepas EPEC aisladas del hombre y de varias especies animales como bovinos, cerdos, conejos, perros y aves¹¹. Además, es una de las variantes más frecuentemente encontradas en cepas EPEC atípicas de diferentes serotipos^{4,14}. El resto de los aislamientos fueron negativos a las variantes α, β, γ y ε. Estos datos sugieren que los aislamientos de pollo y sus productos podrían ser portadores de otras variantes conocidas, pero aisladas con menor frecuencia, o de nuevas variantes. Los serotipos O8:H19 y O108:H9 presentaron la misma variante informada por otros autores en aislamientos de bovinos y cerdos^{4,9}. Sin embargo, el serotipo O2:H40 ha sido comunicado en otras especies animales con otra variante⁴, y, aunque en muchos casos cepas EPEC atípicas correspondientes a un mismo serotipo aisladas en diferentes

países portan una misma variante de intimina, también se ha informado la presencia de diferentes variantes en EPEC atípicas de un mismo serotipo⁶.

En la planta de faena se detectó EPEC en cloacas, y su presencia a lo largo del proceso posterior de faena demuestra que este no se realiza bajo las condiciones adecuadas. Se detectaron aislamientos correspondientes a un mismo serotipo en distintas etapas del proceso de faena, lo que refuerza esta idea. Además de la detección de EPEC en carcasas en distintas etapas, es llamativa su detección en el agua de un tanque de enfriamiento, dado que algunos autores sostienen que aquel reduce los niveles de contaminación con *E. coli* y coliformes.

Sobre la base de los resultados de este trabajo, se considera necesario reforzar las medidas de control e higiene, en particular, se recomienda realizar una evisceración completa de las carcasas, un recambio permanente del agua clorada de los tanques de enfriamiento y el control de la carga microbiana, de acuerdo con las BPM recomendadas.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Financiación

Este trabajo fue apoyado por becas de CONICET tipo I y II (M. Z. Alonso) y por subsidios de la Secretaría de Ciencia, Arte y Tecnología, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNICEN-SECAT) y PICT 2010 Proy. 1655. P. M. A. Lucchesi es miembro de la Carrera del Investigador del CONICET. N. L. es miembro de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia Buenos Aires (CICPBA).

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores agradecen a María Rosa Ortiz por su asistencia técnica, al MV Guillermo Arroyo y al Dr. Daniel Fernández por su asistencia en la toma de muestras.

Bibliografía

- Alonso MZ, Padola NL, Parma AE, Lucchesi PMA. Enteropathogenic *Escherichia coli* contamination at different stages of the chicken slaughtering process. *Poult Sci*. 2011;90:2638-41.
- Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI, Blanco J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae* ξ). *J Clin Microbiol*. 2004;42:645-51.
- Farooq S, Hussain I, Bhat MA, Wani SA. Isolation of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and shiga toxin 1 and 2f-producing *Escherichia coli* from avian species in India. *Lett Appl Microbiol*. 2009;48:692-7.
- Fröhlicher E, Krause G, Zweifel C, Beutin L, Stephan R. Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol*. 2008;8:144.
- Gunzburg ST, Tornieporth NG, Riley LW. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J Clin Microbiol*. 1995;33:1375-7.
- Hernandes RT, Elias WP, Vieira MAM, Gomes TAT. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 2009;297:137-49.
- Hussein HS, Bollinger LM. Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Sci*. 2005;71:676-89.
- Kobayashi H, Pohjanvirta T, Pelkonen S. Prevalence and characteristics of intimin and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from gulls, pigeons and broilers in Finland. *J Vet Med Sci*. 2002;64:1071-3.
- Krause G, Zimmermann S, Beutin L. Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin (*eae*) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet Microbiol*. 2005;106:87-95.
- Ochoa TJ, Contreras CA. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Curr Opin Infect Dis*. 2011;24:478-83.
- Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marche`s O, Caprioli A. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* 2000;68: 64-71.
- Rivas M, Padola NL, Lucchesi PMA, Masana M. Chapter 10: Diarrheagenic *Escherichia coli* in Argentina. En: Torres AG, editor. *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Oak Park (IL), Estados Unidos, Bentham Science Publishers Ltd; 2010. p. 348-92.
- Sanchez S, Ropmecin P, Guachalla LM, Iñiguez V. Genotypic characterization of AEEC *Escherichia coli* isolated from children with infectious diarrhea in La Paz: Epidemiology and diagnostic implications. *Rev Chil Pediatr*. 2006;77:412-27.
- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2002;8:508-13.