

Primer reporte de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en carne cruda en Colombia

Fanny Herrera Arias,^{1*} Jesús Santos Buelga,² Raquel Villamizar Gallardo.¹

Resumen: Primer reporte de *Escherichia coli* Productora de Toxina Shiga no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en carne cruda en Colombia. Dentro de los patotipos de *Escherichia coli*, el grupo STEC puede producir en el ser humano desde diarrea hemorrágica hasta insuficiencia renal aguda e incluso la muerte; el ganado bovino es el principal reservorio de este agente patógeno y por ende la ingestión de alimentos derivados de estos animales de abasto son una fuente muy importante de infección para el hombre. El objetivo principal de este estudio fue determinar la prevalencia de STEC en muestras de carne cruda comercializada en Pamplona-Colombia y en cepas obtenidas a partir de las muestras. Se analizaron cien muestras de carne cruda aplicando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de los siguientes genes en muestras y en cepas STEC: *stx1*, *stx2*, *eae* y *hlyA*. Adicionalmente, se estableció el patrón de resistencia-susceptibilidad antibiótica de cepas STEC aisladas empleando métodos regulados. En el 39% de las muestras fue posible detectar el gen *stx2*; en el 38%, de ellas, se detectaron los genes *stx1* y *stx2*. Además, se aislaron cepas STEC en el 13% de las muestras analizadas, 85% de ellas portaban el gen *hlyA*. No se detectó la presencia del gen *eae* o del serogrupo O157. Las cepas aisladas demostraron resistencia frente a algunos antibióticos de primera y segunda generación. En conclusión, se detectó la presencia de genes que codifican factores de virulencia en las muestras de carne analizadas que representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores. Este es el primer reporte de STEC no O157 que codifica el gen de la enterohemolisina en alimentos en Colombia. **ALAN, 2019; 69(1): 59-67.**

Palabras clave: Enterohemolisina, *Escherichia coli*, carne, STEC no-O157, Toxina Shiga.

Summary: First report of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* non-O157 that encodes the enterohemolysin gene in raw beef in Colombia. Within the *Escherichia coli* patotypes, the STEC group can produce in humans from hemorrhagic diarrhea to acute renal failure and even death; cattle are the main reservoir of this pathogen and therefore the ingestion of food derived from these stock animals are a very important source of infection for man. The main objective of this study was to determine the prevalence of STEC in raw meat samples marketed in Pamplona-Colombia and in strains obtained from those samples. One hundred raw meat samples were analyzed using the Polymerase Chain Reaction technique for the detection of the following genes in samples and in STEC strains: *stx1*, *stx2*, *eae* and *hlyA*. In addition, STEC strains were isolated in 13% of the analyzed samples, 85% of them carried the *hlyA* gene. The presence of the *eae* gene or serogroup O157 was not detected. The isolated strains demonstrated resistance against some first and second generation antibiotics. In conclusion, the presence of genes encoding virulence factors in the meat samples analyzed, that represent a potential health risk factor to consumers, was confirmed. This is the first report of STEC non-O157 that encodes the enterohemolysin gene in foods in Colombia. **ALAN, 2019; 69(1): 59-67.**

Key words: Enterohemolysin, *Escherichia coli*, Beef, STEC, no-O157, Shiga Toxin.

Introducción

La carne es un sustrato nutritivo con una actividad de agua de a_w (0.99) adecuada para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos. El crecimiento microbiano ocurre principalmente a expensas de moléculas de bajo peso molecular (carbohidratos, lactato y aminoácidos). Bajo este contexto, la carne de origen bovino es

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Básicas. Universidad de Pamplona. ²Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, España.

Autor para la correspondencia: Fanny Herrera Arias. Email: fannh@unipamplona.edu.co

reconocida como una fuente importante de infección por patotipos de *Escherichia coli*; estos se caracterizan por los antígenos O (somáticos) y H (flagelares) que definen serogrupos (sólo el antígeno O) o serotipos (antígeno O y antígeno H) (1).

Los patotipos existentes de *Escherichia coli* son: *E. coli* Enteropatógena, *E. coli* Enteroinvasiva, *E. coli* Enterotoxigénica, *E. coli* Enterohemorrágica, *E. coli* Enteroagregativa y *E. coli* Enterohemorrágica (ECEH). La *Escherichia coli* Enterohemorrágica puede producir lesiones de adhesión-borrado en las microvellosidades del epitelio intestinal debido a la presencia de la isla de patogenicidad LEE, pero su característica principal es la capacidad de producir toxinas. La molécula Stx1 es una estructura altamente conservada que es idéntica a la de la toxina Shiga de *Shigella dysenteriae* tipo 1; en contraste, hay varias variantes antigénicas de Stx2 que difieren en su actividad biológica y asociación con la enfermedad. Aunque existen más de 200 serotipos de cepas de *E. coli* capaces de producir toxinas Shiga, la mayor parte no poseen la isla de patogenicidad LEE. Esto ha llevado al uso del término de *E. coli* productoras de toxinas Shiga (STEC) para designar a cualquier cepa de *E. coli* que produce toxinas *Stxs* y el término EHEC para las cepas que, además de producir *Stx*, contienen la isla de patogenicidad LEE (1). En esta isla de patogenicidad se hallan los genes que codifican para la proteína externa de membrana (intimina –*eae*–), los genes *esp* (*E. coli* secreted proteins a, b y d), el gen que codifica para el receptor traslocado de intimina Tir (*translocated intimin receptor*) y los genes para la síntesis del sistema de secreción tipo III (1). Otros factores de virulencia incluyen fimbrias, OMPs, el lipopolisacárido (LPS O157) o el plásmido pO157 y la enterohemolisina, presente en la mayor parte de cepas STEC, que contribuye al desarrollo de enfermedad a través de la lisis de eritrocitos y la liberación de hemoglobina como fuente de hierro para la bacteria (2).

La infección por STEC se produce por ingestión de alimentos contaminados, siendo su principal reservorio el tracto gastrointestinal de los bovinos. Las cepas STEC, además de tener una dosis infecciosa muy baja (10-100 células), sobreviven en su paso a través del tracto gastrointestinal porque suelen ser resistentes a la acidez; una vez en el intestino, se presenta enfermedad de diferente gravedad dependiendo de los factores de virulencia que presente la cepa en cuestión.

El factor de virulencia más importante de las cepas STEC son las toxinas Shiga; estas son producidas en el intestino grueso y ejercen una acción local al inducir apoptosis en las células epiteliales del intestino, dando lugar a diarrea hemorrágica, colitis hemorrágica (CH), necrosis y formación de úlceras. Además, estas toxinas pueden viajar a través del torrente sanguíneo hasta los riñones, dando lugar a inflamación renal. El daño renal puede evolucionar al Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), caracterizado por anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal aguda (2).

De acuerdo con el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de los EEUU (CDC) entre el 2009-2015 el patotipo STEC fue la segunda causa bacteriana de brotes de Enfermedades Transmitidas por los Alimentos (ETAs) en ese país, estando entre los agentes que ocasionan mayor porcentaje de hospitalizaciones y muertes, 13 y 9%, respectivamente; siendo los serogrupos principalmente identificados O157, O26, O111, O121, O145, O45, O103 y O186 (3).

En Colombia, el primer reporte de *E. coli* O157 en alimentos se presentó en carne de res y cerdo (4). A partir de aquí, se ha reportado la presencia de STEC en diferentes alimentos de origen animal (5, 6,7).

El tratamiento de las infecciones en humanos por STEC con antibióticos es controversial debido al incremento de cepas multirresistentes; de hecho, se han detectado cepas ambientales aisladas de animales y/o alimentos resistentes a la ampicilina, estreptomycin, trimetoprim/sulfonamida, eritromicina, cefalotina, amikacina, kanamicina y gentamicina, entre otros (8,9).

Los objetivos de este estudio fueron, determinar la prevalencia de STEC en muestras de cárnicos crudos de origen bovino expendidos en la Ciudad de Pamplona, Colombia, estableciendo, la presencia de genes que codifican factores de virulencia en cepas aisladas a partir de las muestras y el patrón de resistencia-susceptibilidad antibiótica de estas cepas.

Materiales y Métodos

Tipo de muestreo y tamaño de la muestra:

Se realizó un muestreo no probabilístico intencional, conformado por 100 muestras de carne cruda de bovino expendidos formalmente en la ciudad de Pamplona (Colombia) que incluían carne molida (80 muestras) y porcionada (20 muestras). Se tomaron, aproximadamente, 200 g de cada muestra y se transportaron en condiciones de refrigeración, realizando los análisis microbiológicos en un periodo no mayor a 2 horas.

Detección de los genes *stx1* y *stx2* en las muestras mediante PCR:

De cada una de las muestras se tomaron 10 g y se dispensaron en 90 ml de Caldo Trypticasa de Soja (TSB) e incubadas a 37°C durante 24 horas; posteriormente se transfirieron 700 µL y se resuspendieron en 700 µL de glicerol, conservando a temperatura de congelación. A partir de la muestra congelada, se tomaron 100 µL, se inocularon en TSB, e incubados a 37°C durante 24 horas. 1 mL del caldo fue centrifugado a 12,000 rpm/3 min; Posteriormente, se adicionaron 200 µL de Chelex, resuspendiendo el pellet completamente, se agitó cada tubo empleando un vortex durante

10 segundos; luego se transfirió cada tubo a un bloque de calentamiento a 100°C durante 10 minutos. Finalmente, cada tubo fue centrifugado a 12,000 rpm /3 min.

Se realizó una PCR múltiple para detectar los genes *stx1* y *stx2*. Se emplearon los pares de cebadores correspondientes a una concentración de 25 mM y un cóctel comercial 5 PRIME MasterMix (Taq polimerasa, buffer, dNTPs y Mg+2). (Tabla 1). Fueron amplificados los diferentes genes en un equipo Mastercycler Personal. El ciclo de amplificación fue el siguiente: se realizó una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 25 ciclos, cada uno de ellos compuesto por tres pasos; un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, un segundo de hibridación a 56°C durante 40 segundos y una elongación a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó un último paso de elongación final a 72°C durante 7 minutos. Se sometieron los productos de la amplificación (5 µl) a electroforesis en gel de agarosa (Bio-Rad) al 1,5 % p/v a 100 V durante 1 h. Se realizó la visualización mediante tinción con RedSafe™, empleando un transiluminador de luz ultravioleta, documentando con la aplicación del Digimage System acoplado a una cámara digital Canon Power Shot G11.

Obtención de cepas STEC a partir de las muestras:

A partir del caldo TSB correspondiente a cada una de las 100 muestras, se realizaron siembras en SMAC (Agar Sorbitol MacConkey, Oxoid). *E.coli* O157 normalmente no fermenta

Tabla 1. Cebadores empleados en la prueba de PCR para la detección de genes en muestras y en cepas.

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Tamaño (pb)	Referencia
<i>stx1</i>	VT1a	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	130	(10)
	VT1b	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
<i>stx2</i>	SLTII1	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	448	(11)
	SLTII2	GGATGCATCTCTGGTCATTG		
<i>eae</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	881	(12)
	SK2	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		
<i>hlyA</i>	HlyA-a	AGCTGCAAGTGCGGGTCTG	569	(13)
	HlyA-b	TACGGGTTATGCCTGCAAGTTCAC		

el sorbitol, por lo que produce colonias incoloras, mientras que otras *E. coli* no-O157:H7 generalmente si fermentan el sorbitol, por lo que darán lugar a colonias de color rosa. Se observaron estas placas tras su incubación a 37°C durante 24 horas. Se confirmaron las colonias rosas e incoloras por PCR para la detección de *stx*s, 176 cepas en total. Las muestras que fueron negativas por PCR a partir del SMAC fueron inoculadas en el CHROMagar™ STEC; el aspecto de las colonias STEC en este medio de cultivo es violeta, las cepas STEC O157 son no fluorescentes y las STEC no-O157 evidencian fluorescencia variable.

Detección de genes de virulencia en cepas STEC mediante PCR:

Las colonias típicas obtenidas en SMAC y CHROMagar STEC se sometieron a pruebas de PCR buscando de forma separada los genes que codifican para las toxinas Shiga (*stx1* y *stx2*), el gen que codifica para la intimina (*eae*) y el gen que codifica para la enterohemolisina (*hlyA*) (Tabla 1). Se trabajó con las concentraciones de reactivos, equipos para la amplificación, ciclo de amplificación y visualización descritos en las muestras.

Identificación del serogrupo en cepas STEC:

Las cepas STEC se sometieron a dos pruebas de aglutinación con partículas de látex:

- Dryspot *E. coli* O157 test (Oxoid): prueba para la identificación de *E. coli* O157.
- Dryspot *E. coli* Seroscreen (Oxoid): prueba para la detección de seis serogrupos de *E. coli* no-O157: O26, O91, O103, O111, O128 y O145.

En ambos casos se utilizaron partículas azules de látex sensibilizadas con anticuerpos específicos de conejo reactivos frente al antígeno somático correspondiente, siguiendo las indicaciones del fabricante en cada caso.

Patrón de Resistencia-Susceptibilidad antibiótica de las cepas STEC:

A partir de las cepas STEC aisladas, se tomaron al azar cinco de ellas con el fin de realizar la prueba de antibiograma aplicando el método de difusión en agar de acuerdo con los lineamientos del EUCAST (14).

Los antibióticos ensayados fueron: Ampicilina 10 µg (AMP);

Estreptomycin 10 µg (S); Cefalotina 30 µg (KF); Ácido Nalidíxico 30 µg (NA); Cefotaxima 5 µg (CTX); Tetraciclina 30 µg (TE); Amoxicilina – Ácido Clavulánico 30 µg (AMC); Trimetoprim - Sulfametoxazol 25 µg (SXT); Gentamicina 10 µg (CN); Ciprofloxacina 5 µg (CIP); Cloranfenicol 30 µg (C); Cefoxitina 30 µg (FOX); Cefepima 30 µg (FEP); Cefaclor 30 µg (CEC); Ticarcilina 75 µg (TIC); Ceftazidima 30 µg (CAZ); Aztreonam 30 µg (ATM); Piperaciclina 30 µg (PRL); Cefuroxima 30 µg (CXM); Imipenem 10 µg (IPM).

Resultados:

En la tabla 2, se describen los perfiles de virulencia detectados en las muestras y en las cepas aisladas de las mismas. En el 22% de las muestras no se observaron amplificadas para las toxinas buscadas. Se encontró una importante prevalencia del gen *stx2* en las muestras, a pesar de esto, sólo a partir del 13% de las mismas fue posible detectar cepas *stx*s positivas (Tabla 3). Adicionalmente, en el 84.6% de estas cepas se detectó el gen que codifica para la enterohemolisina (*hlyA*). No se reveló la presencia del *eae* en las cepas aisladas a partir de las muestras.

En la figura 1 se muestran los amplificados obtenidos de las muestras y las cepas aisladas en este estudio. La detección de los genes *stx1* y *stx2* se realizó mediante PCR múltiple. Partiendo de 176 cepas sospechosas, se encontró una prevalencia de STEC del 7.4%; 4.55 % de ellas fueron obtenidas mediante la utilización del CHROMagar STEC, las cuales revelaron el genotipo *stx1* +, *stx2* +, *hlyA* +; en el medio de cultivo Sorbitol MacConkey se aislaron 2.85% de las cepas, que evidenciaron la presencia del *stx2* o del genotipo *stx2* +, *hlyA* +; El gen *stx1* de forma única fue el menos prevalente tanto en muestras como en cepas.

La figura 2 describe los resultados obtenidos para la prueba de resistencia-susceptibilidad antibiótica. Se evidencia que, de acuerdo con los criterios de interpretación estipulados por el EUCAST (15) y CLSI (16), las cinco cepas ensayadas tuvieron

Tabla 2. Contenido de humedad del aislado proteico de chachafruto.

Perfil de Virulencia	Número de muestras		Número de cepas SMAC (%)		Número de cepas CHROMagar (%)	
	Porcionada	Molida	Porcionada	Molida	Porcionada	Molida
<i>stx1</i>	0	1	0	0	0	0
<i>stx2</i>	6	33	0	2 (1.14)	0	0
<i>stx1 + stx2</i>	7	31	0	0	0	0
<i>stx2 + hlyA</i>	NE ^a	NE ^a	1(0.57)	2 (1.14)	0	0
<i>stx1 + stx2 + hlyA</i>	NE ^a	NE ^a	0	0	1(0.57)	7(3.98)
<i>eae</i>	NE ^a	NE ^a	0	0	0	0

^a: NE: La presencia de los genes *hlyA* y *eae* no fue examinada en las muestras.

el mismo patrón de resistencia-susceptibilidad antibiótica, siendo resistentes frente a Cefalotina, Ampicilina, Amoxicilina – Ácido Clavulánico, Cefuroxima, Ticarcilina y Piperaciclina.

En la tabla 3 se puede apreciar la comparación

entre las características fenotípicas y genotípicas de las cinco cepas STEC seleccionadas al azar; se evidencia su uniformidad fenotípica incluso en el patrón de resistencia antibiótica, todas fueron *stx2* positivas, *eae* negativas y sólo una fue *hlyA* negativa.

Tabla 3. Características fenotípicas y genotípicas de cepas STEC seleccionadas

CEPA	Aspecto en SMAC	CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS				CARACTERÍSTICAS GENOTÍPICAS			
		Aspecto en CHROM agar	Dryspot <i>E. coli</i> O157	Dryspot <i>E. coli</i> Seroscreen	RESISTENCIA ANTIBIÓTICA	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>hlyA</i>	<i>eae</i>
74	Rosa	Violeta fluorescente	NEG	NEG	KF, AMP, AMC, CXM, TIC, PRL	NEG	POS ²	POS	NEG
84	Rosa	Violeta fluorescente	NEG	NEG	KF, AMP, AMC, CXM, TIC, PRL	NEG	POS	POS	NEG
86	Rosa	Violeta fluorescente	NEG	NEG	KF, AMP, AMC, CXM, TIC, PRL	NEG	POS	POS	NEG
97	Rosa	Violeta fluorescente	NEG	NEG	KF, AMP, AMC, CXM, TIC, PRL	NEG	POS	NEG	NEG
98	Rosa	Violeta fluorescente	NEG	NEG	KF, AMP, AMC, CXM, TIC, PRL	NEG	POS	POS	NEG

¹: Negativo; ²: Positivo

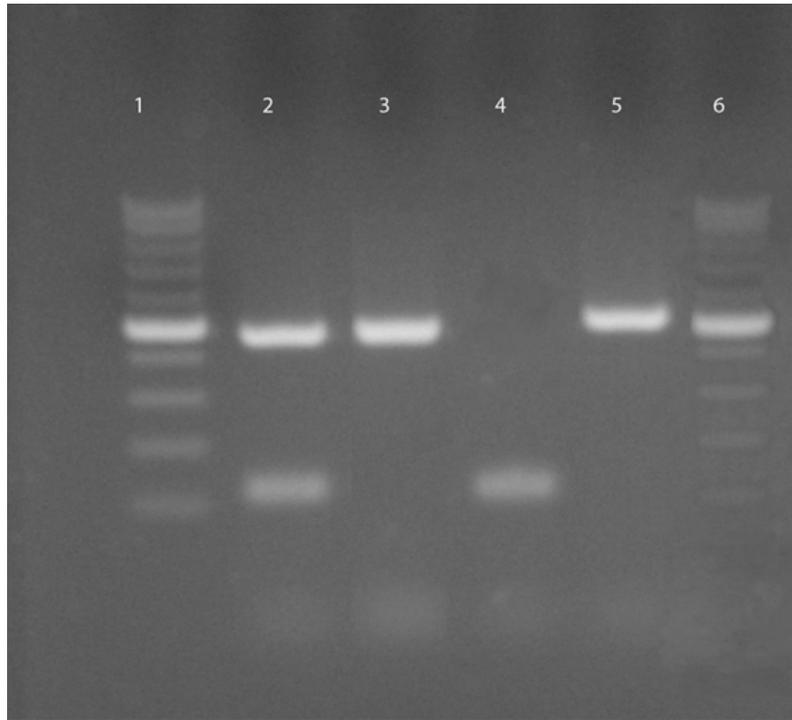


Figura 1. Ejemplos de amplificados obtenidos en muestras y cepas aisladas a partir de las muestras. Líneas: 1 y 6: patrón de peso molecular de 100 pb. 2: Muestra *stx1* y *stx2* positivo. 3: Cepa *stx2* positivo. 4: Muestra *stx1* positivo. 5: Cepa *hlyA* positivo.

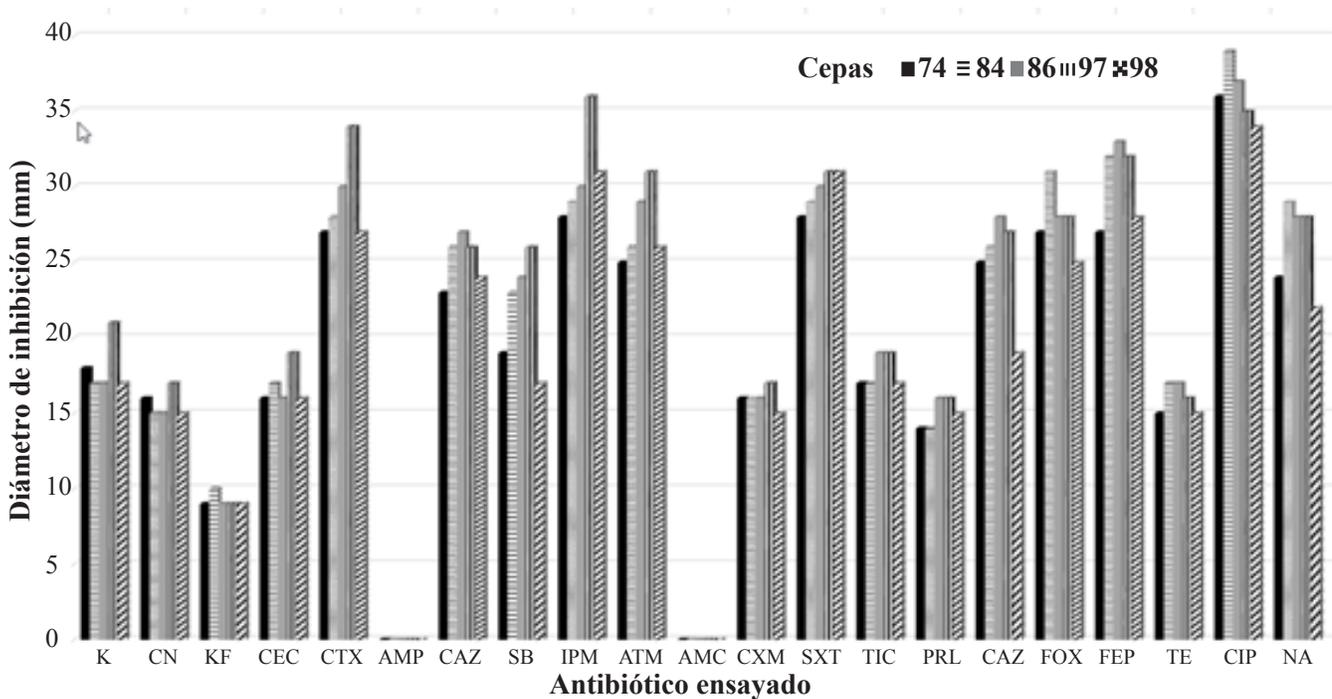


Figura 2. Resultados de la prueba de resistencia-susceptibilidad antibiótica de cepas STEC

Discusión

La alta prevalencia del gen *stx2* detectada en este estudio se relaciona con los resultados obtenidos en estudios similares realizados en Sur América (6, 17, 18). La importancia clínica de las cepas *stx2+* es superior tanto a la de las cepas *stx1+* y a la de las cepas *stx1+/stx2+*, ya que la probabilidad de que las primeras puedan inducir la aparición del síndrome SUH es más alta (19). Se detectó alta frecuencia del genotipo *stx1+stx2* en las muestras y en las cepas, lo que puede tener una implicación sanitaria adicional debido a que los genes que codifican las toxinas Shiga se encuentran localizados en el genoma de bacteriófagos lamboides denominados fagos-Stx, elementos genéticos altamente móviles que pueden infectar bacterias comensales del intestino, haciendo que puedan producir Stxs y por tanto agravando la enfermedad. Otra característica importante de los fagos-Stx es su estabilidad en el ambiente durante largos periodos de tiempo y pueden como ya se ha dicho, insertarse en bacterias convirtiéndolas en productoras de toxinas Stxs (20).

La reducida recuperación de cepas STEC a partir de las muestras analizadas puede atribuirse a varias razones como son: la presencia de un número muy pequeño de células STEC en las mismas que no lograron detectarse en ninguno de los medios de cultivo ensayados; la mayoritaria presencia de fagos portando *stxs* en las muestras de carne y/o a la existencia de una elevada microbiota acompañante que pudo haber inhibido su crecimiento (21).

Se encontró, en un importante porcentaje de cepas STEC, el gen que codifica para la enterohemolisina (*hlyA*), lo cual, concuerda con los resultados de otros autores (17, 18, 22). La enterohemolisina es una α -hemolisina que contribuye al desarrollo de la enfermedad, favoreciendo la liberación de hierro para la realización de las reacciones metabólicas bacterianas; además, puede alterar la membrana de diferentes células del huésped e inducir la producción de citoquinas pro-inflamatorias (2).

El gen *eae* codifica para la intimina, una proteína de membrana externa que contribuye en el borrado

de los enterocitos y a la formación de un pedestal en la membrana de los mismos, permitiendo la adhesión íntima de la bacteria a la célula (1). La no detección de este gen en las cepas concuerda con otros estudios realizados en Latinoamérica en cepas STEC no-O157 obtenidas de muestras de diferentes alimentos y ambientes (6, 17, 18). El hecho de no detectar la presencia del gen *eae* en las cepas no las hace inofensivas para el ser humano, ya que se han encontrado serotipos productores de *stxs* que son *eae* negativos y han sido implicados en diarrea, SUH y en brotes de ETAs (21, 23); de hecho, el brote de ETAs más importante ocurrido en Alemania en el 2011 fue por una cepa STEC *eae* negativa que ocasionó 4,321 casos confirmados, 852 casos de SUH y 54 muertes (23).

Se pudo evidenciar la alta especificidad y selectividad del medio de cultivo cromogénico para la detección de las cepas STEC. Está demostrado que el telurito de potasio presente en el suplemento del Sorbitol MacConkey puede inhibir el crecimiento de STEC no-O157, razón por la cual resulta más conveniente el empleo del CHROMagar, que tiene la ventaja adicional de permitir diferenciar la presencia de *E. coli* O157 de las no-O157 por la no fluorescencia que no emiten las primeras (24), lo que se comprobó en este trabajo.

Al realizar la prueba de aglutinación a cada una de las cepas STEC empleando el Dryspot *E. coli* O157 y el Dryspot Seroscreen (Oxoid), ninguna arrojó resultados positivos, lo que puso en evidencia que no se correspondían a los serogrupos O157, O26, O91, O103, O111, O128 ni O145; resultados similares fueron obtenidos en cepas STEC aisladas a partir de muestras de carne molida en Chile (18).

El serogrupo STEC O157 tradicionalmente se ha vinculado con enfermedades en el ser humano, sin embargo se han reportado más de 400 serogrupos STEC que igualmente producen enfermedad, entre ellos los serogrupos pertenecientes al grupo referido como “el gran 6” (O111, O26, O121, O103, O145 y O45) que son los principales serogrupos no-O157 aislados de infecciones clínicas humanas en los EEUU (21). La nula o baja detección del serogrupo O157 se relaciona con otros estudios en diferentes muestras de alimentos en Colombia y Chile (5, 6, 7, 18). En Argentina y Brasil, se ha reportado mayor frecuencia de STEC no-O157 en diferentes muestras de origen bovino (22, 25). Adicionalmente, Islam *et al* 2014, analizando datos del 1980-2012, reportan una prevalencia en Latinoamérica

de *E. coli* O157 en ganado bovino del 1.65% (26). Estos resultados sugieren la reducida incidencia de cepas STEC O157 en alimentos de origen animal en la región. A pesar de esto, Franco *et al* 2013, detectaron el serotipo O157:H7 en el 28% en muestras de carne de cerdo provenientes de Cartagena-Colombia (27).

Las cepas aisladas en este trabajo, revelaron ser homogéneas fenotípicamente, razón por la cual se seleccionaron al azar cinco de ellas para la prueba de antibiograma. La resistencia a la ampicilina detectada se relaciona con la obtenida en cepas no-O157 aisladas de humanos (9). De otra parte, cepas ECTS no O157 aisladas a partir de heces animales evidenciaron similar resistencia a la cefalotina (8).

Se encontró una alta prevalencia de STEC no-O157 en muestras de carne cruda de origen bovino comercializadas en Pamplona-Colombia; las cepas aisladas presentaron, además, el gen que codifica para la enterohemolisina; sin embargo, no pertenecían a serogrupos identificables. Esto sugiere que en el medio ambiente de explotaciones ganaderas podrían estar circulando STEC no conocidos y de los cuales se ignora su efecto para la salud del ser humano.

La ausencia del serogrupo O157 en las cepas aisladas a partir de las muestras no asegura la inocuidad de las mismas, ya que se detectaron STEC portadores de factores de virulencia implicadas en enfermedad en el hombre, aunque demostraron resistencia únicamente frente a algunos antibióticos de primera y segunda generación.

La gran mayoría de las cepas STEC aisladas en América del Sur a partir de ganado bovino y sus derivados son no O157 con un perfil de virulencia *stx2* + *hlyA* y son *eae* negativas.

Este es el primer reporte de STEC no-O157 que codifican el gen para la enterohemolisina en alimentos en Colombia.

Agradecimientos

Fanny Herrera Arias agradece la estancia concedida por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad de Pamplona, Colombia, para llevar a cabo los ensayos de PCR en el Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria- Universidad de León, España.

Referencias

1. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2: 123-140.
2. Gyles C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci*. 2007; 85: E45-E62.
3. Dewey-Mattia D, Manikonda K, Hall A, Wise M, Crowe S. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 2009-2015. *MMWR Surveill Summ*. 2018; 67(10):1-11. doi: 10.15585/mmwr.ss6710a1.
4. Mattar S, Vásquez E. *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Colombia. *Emerg Infect Dis*. 1998; 4(1):126-127.
5. Martínez A, Bossio C, Durango A, Vanegas M. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from foods. *J Food Prot*. 2007; 70(12):2843-6.
6. Rúgeles I, Bai J, Martínez A, Vanegas M, Gómez-Duarte O. Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *Int J Food Microbiol*. 2010; 138(3): 282-286.
7. Amézquita-Montes Z, Tamborski M, Kopsombut U, Zhang C, Arzuza O, Gómez-Duarte O. Genetic Relatedness Among *Escherichia coli* Pathotypes Isolated from Food Products for Human Consumption in Cartagena, Colombia. *Foodborne Pathog Dis*. 2015; 12(5):454-461.
8. Mahanti A, Samanta I, Bandopaddhay S, Joardar S, Dutta T, Batabyal S, *et al*. Isolation, molecular characterization and antibiotic resistance of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from buffalo in India. *Lett Appl Microbiol*. 2013; 56(4):291-8.
9. Day M, Doumith M, Jenkins C, Dallman TJ, Hopkins KL, Elson R, *et al*. Antimicrobial resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 isolated from human cases of diarrhoeal disease in England, 2015. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(1):145-152.
10. Pollard D, Johnson W, Lior H, Tyler S, Rozee K. Rapid and specific detection of Verotoxin genes in *Escherichia coli* by the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol*. 1990; 28 (3): 540-545.
11. Olsen J, Aabo S, Hill W, Notermans S, Wernars K, Granum P, *et al*. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. *Int J Food Microbiol* 1995; 28 (1): 1-78.
12. Oswald E, Schmidt H, Morabito S, Karch H, Marchès 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 (1): 64-71.

13. Wang G, Clark C, Rodgers F. 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. *J Clin Microbiol.* 2002; 40 (10): 3613-3619.
14. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method [Internet]. Version 7.0. Editors European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2019. [actualizado Enero 2019; citado 26 Junio de 2019]. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf.
15. EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [Internet]. Version 9.0. Editors European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2019. [actualizado 1 de Enero 2019; citado 26 Junio de 2019]. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9
16. CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [Internet]. 26th Edition. Editors Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016. [actualizado 1 de Enero 2019; citado 26 Junio de 2019] Disponible en: <http://jzxc.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>
17. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega E, de la Torre J, Linares L, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013; 171(2):1-6. doi: 10.3389/fcimb.2012.00171
18. Toro M, Rivera D, Jiménez M, Díaz L, Navarrete P, Reyes-Jara A. Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from retail ground beef in Santiago, Chile. *Food Microbiol.* 2018; 75:55-60. doi: 10.1016/j.fm.2017.10.015.
19. Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, et al. Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol.* 2013; 162 (2): 190-212.
20. Bergan J, Dye Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon.* 2012; 60 (6): 1085-1107.
21. Hoang Minh S, Kimura E, Hoang Minh D, Honjoh K, Miyamoto T. Virulence characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw meats and clinical samples. *Microbiol Immunol.* 2015; 59 (3): 114–22. doi: 10.1111/1348-0421.12235
22. Llorente P, Barnech L, Irino K, Rumi M, Bentancor A. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef collected in different socioeconomic strata markets in Buenos Aires, Argentina. *Biomed Res Int.* 2014; ID 795104. doi: 10.1155/2014/795104
23. Newton H, Sloan J, Bulach D, Seemann T, Allison C, Tauschek M, Robins-Browne R, Paton J, Whittam T, Paton A, Hartland E. Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* Strains Negative for Locus of Enterocyte Effacement. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(3): 372–380. doi: 10.3201/eid1502.080631
24. Verhaegen B, De Reu K, Heyndrickx M, De Zutter L. Comparison of Six Chromogenic Agar Media for the Isolation of a Broad Variety of Non-O157 Shigatoxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Serogroups. *Int J Environ Res Public Health.* 2015; 12 (6): 6965-6978.
25. Irino K, Kato MA, Vaz TM, Ramos II, Souza MA, Cruz AS, et al. Serotypes and virulence markers of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from dairy cattle in Sao Paulo State, Brazil. *Vet Microbiol.* 2005; 105 (1): 29-36.
26. Islam MZ, Musekiwa A, Islam K, Ahmed S, Chowdhury S, Ahad A, et al. Regional Variation in the Prevalence of *E. coli* O157 in Cattle: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *PLoS One.* 2014; 9(4): e93299.
27. Franco P, Ramírez L, Orozco M, López L. Determinación de *Escherichia coli* e identificación del serotipo O157:H7 en carne de cerdo comercializada en los principales supermercados de la ciudad de Cartagena. *Rev Lasallista Investig.* 2013; 10 (1): 91-100.

Recibido: 28/01/2019
Aceptado: 21/06/2019