



# APLICACIÓN DE IRRADIACIÓN GAMMA ( $^{60}\text{Co}$ ) PARA EL CONTROL DE STEC *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORAS DE TOXINA SHIGA (O26, O45, O103, O111, O121, O145 Y O157:H7) EN HAMBURGUESAS CRUDAS CONGELADAS

Mussio, Paula<sup>1</sup>; Martínez, Inés<sup>3</sup>; Soria, Alejandra<sup>1,2</sup>, Soumastre, Martina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Gerencia de Análisis, Ensayos y Metrología - Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU.

<sup>2</sup>Comité Nacional de Irradiación

<sup>3</sup>Gerencia de Investigación, Desarrollo e Innovación, Laboratorio Tecnológico del Uruguay, LATU. [imartin@latu.org.uy](mailto:imartin@latu.org.uy)

## INTRODUCCIÓN

Las *Escherichia coli* productoras de Toxina Shiga (STEC) O157:H7 y no-O157:H7 han sido identificadas como patógenos alimentarios emergentes (Brooks *et al.*, 2005), siendo los principales alimentos vinculados a estos brotes las hamburguesas de carne bovina insuficientemente cocidas (Masana *et al.*, 2011).

Las STEC son responsables de enfermedades gastrointestinales e infecciones graves, tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica (HC) (D'Aoust *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2008).

La patogenicidad de las STEC depende mayoritariamente de los factores de virulencia: toxinas Shiga, intimina y enterohemolisina. Las primeras son proteínas codificadas por los genes *stx1* y *stx2*, ambos con actividades biológicas similares (Hussein, 2007). La intimina y la enterohemolisina están involucradas en la adherencia íntima de la bacteria a la superficie intestinal del hospedero y el posterior daño a los enterocitos (Hussein, 2007). La primera es codificada por el gen *eae*, mientras que *ehxA* codifica para enterohemolisina. Ambos genes se encuentran en todas las cepas de *E. coli* O157:H7 (Neill, 1997) y en la mayoría de las cepas STEC no-O157. Por definición, una STEC contiene uno o ambos genes *stx* (*stx1* y/o *stx2*) y el gen *eae* (Paton y Paton, 2000; Hussein, 2007), por lo que los mismos suelen utilizarse como marcadores moleculares para la detección de estos microorganismos.

Pese al creciente interés por la detección de las STEC a nivel mundial, las técnicas de búsqueda e identificación de estas cepas en alimentos se encuentran aún en pleno desarrollo. Tanto en Europa como en Estados Unidos la detección de estos patógenos se limita a unos pocos laboratorios especializados. Esto se debe a que la detección y posterior caracterización de los diversos serogrupos circulantes en los medios de cultivo comercialmente disponibles no resulta sencilla (CDC, 2005; USDA, 2011). En Uruguay hemos logrado poner a punto una metodología que permite la detección rápida de los siete serogrupos de STEC más prevalentes a nivel mundial (O26, O45, O103, O111, O145, O121 y O157) en hamburguesas congeladas crudas. La misma se basa en el empleo de PCR en tiempo real empleando wet pools (Mussio *et al.*, 2014).

Por otra parte, es importante disponer de herramientas que permitan la mitigación de estos patógenos en la matriz cárnica como medida de control de los mismos, logrando también el cumplimiento de los estándares establecidos en el comercio internacional. Uruguay fomenta el interés de aplicar la tecnología de irradiación en la carne vacuna para cumplir este objetivo, por ser un país exportador y producir importantes volúmenes de abasto local. El proceso de irradiación involucra exponer al alimento a cantidades de radiación ionizante cuidadosamente controladas, durante un tiempo determinado (IGCFI, 1999). La irradiación, como técnica de intervención, es un excelente punto crítico de control dentro de un sistema HACCP y es reconocido como tal por el USDA (FSIS, 2000). La aplicación de radiación ionizante a dosis relativamente bajas se presenta como una herramienta alternativa y factible de ser aplicada para la obtención de hambur-

guesas inocuas. Trabajos anteriores realizados en otros países demostraron que la radiación ionizante (4,5 KGy) aplicada a muestras de carne picada mezclada y enfiada (Tuncay *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2010) que contenía *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* fue capaz de eliminar estos patógenos de las muestras contaminadas.

En este trabajo se evaluó el comportamiento y resistencia de siete cepas de STEC (O26, O45, O103, O111, O145, O121 y O157:H7) a la irradiación gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) en hamburguesas congeladas crudas, demostrándose una vez más los beneficios del uso de la energía ionizante como método de reducción de microorganismos patógenos en muestras de alimentos. El plan de trabajo involucró dos etapas:

- 1) Determinar la dosis de irradiación necesaria para disminuir un orden logarítmico la concentración de cada una de las siete cepas (D10).
- 2) Determinar la dosis de irradiación capaz de eliminar distintas cargas de STEC inoculadas en muestras de hamburguesas congeladas crudas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Etapa 1) Determinación del D10 para cada una de las siete cepas de STEC

Triplicados de 11 g de hamburguesas 100% de carne vacuna previamente irradiadas con 7,7 kGy de  $^{60}\text{Co}$  se inocularon con una carga aproximada de  $10^6$  células/g de cada una de las siete cepas de STEC en forma individual. Las muestras se irradiaron con: 0, 0.44 y 0.8 kGy de  $^{60}\text{Co}$  y se conservaron a  $-20^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Cumplido ese tiempo, se realizó el recuento bacteriano en Tempo<sup>®</sup> AC (Aerobic Count). Se calculó el valor D10 correspondiente a cada cepa a partir de las pendientes del gráfico Log del recuento bacteriano en función de la dosis de irradiación (kGy) para cada cepa.

### Etapa 2) Determinación de la dosis de $^{60}\text{Co}$ capaz de eliminar distintas cargas de STEC

Muestras de 65 g de hamburguesas 100% de carne vacuna previamente irradiadas con 7,7 kGy de  $^{60}\text{Co}$  se inocularon con diferentes cargas de cada una de las siete cepas de STEC. Las mismas se irradiaron con distintas dosis y posteriormente se evaluó la presencia de STEC mediante PCR en tiempo real (BaxSystem<sup>®</sup>, Dupont). Adicionalmente se realizaron recuentos de aerobios totales (Plate Count Agar, Oxoid), STEC (Rainbow agar, Biolog) e inmunoseparación magnética de serogrupos positivos (RapidCheck<sup>®</sup> Magnetic Particles, Sdix), a modo de confirmación.

**RESULTADOS**

**Etapa 1) Determinación del D10 para cada una de las siete cepas de STEC**

La figura 1 muestra los valores del logaritmo del recuento bacteriano en función de la dosis de irradiación aplicada para cada cepa. Los valores D10 obtenidos en estas condiciones fueron: 0,55 para *E. coli* O26; 0,32 para *E. coli* O45; 0,28 para *E. coli* O103; 0,30 para *E. coli* O111; 0,33 para *E. coli* O145 y 0,38 para *E. coli* O157.

**Etapa 2) Determinación de la dosis de <sup>60</sup>Co capaz de eliminar distintas cargas de STEC**

**Inóculo: 6 log UFC de STEC**

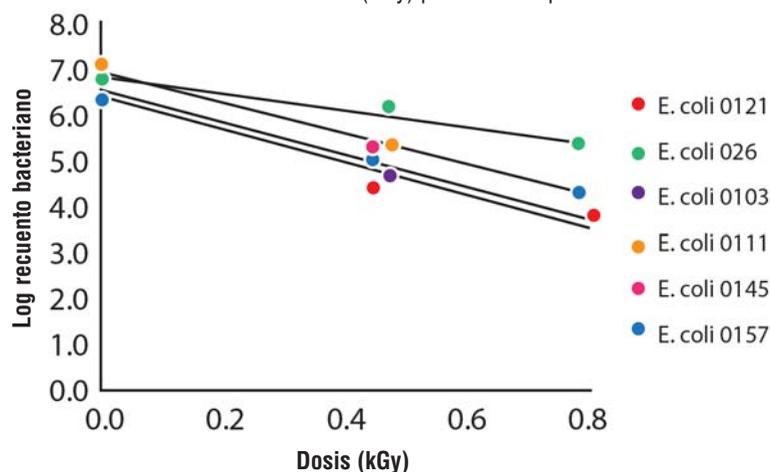
La tabla 1 muestra los resultados de los recuentos bacterianos, detección de genes de virulencia (*stx/eae*) y confirmación de serogrupos positivos en las muestras inoculadas con una carga de STECs de 10<sup>6</sup> células/g de muestra e irradiadas posteriormente con 2.2; 3.2; 3.5 y 3.7 kGy.

**TABLA 1** - Resultados de los recuentos bacterianos, detección de genes de virulencia (*stx/eae*)

y confirmación de serogrupos positivos en las muestras inoculadas con una carga de aproximadamente 10<sup>6</sup> células de STEC e irradiadas con 2.2; 3.2; 3.5 y 3.7 kGy. nd: No determinada

Dosis Irradiación Aplicada (kGy)	Recuento Inóculo (células/65g)		Screening <i>stx/eae</i>	Paneles	IMS/ serología
	Aerobios (PCA/TEMPO <sup>®</sup> AC)	STECs (RA)			
0	7.1x10 <sup>5</sup>	5.1x10 <sup>5</sup>	nd	Cepas +: O26 (Ct 27.4), O121 (Ct 38.2), O45 (Ct 33.0), O103 (Ct 33.0), O145 (Ct 23.0), O111 (Ct 26.5) y O157:H7 (Ct 30.8)	nd
2.2 ± 0.09	2.1 x10 <sup>3</sup>	< 2.6 x10 <sup>3</sup>	stx + (Ct 37.3) eae + Ct 37.8)	Cepas +: O26 (Ct 39.4), O121 (Ct 39.6), O111 (Ct 38.7), O45 (Ct 40.5), O103 (Ct 40.2), O145 (Ct 39.8)	IMS O26 + IMS O111 +
3.2 ± 0.14	< 2.6 x10 <sup>2</sup>	< 2.6 x10 <sup>2</sup>	stx + (Ct 34.5) eae + Ct 36.6)	Cepas +: O26 (Ct 41.5), O121 (Ct 41.1), O45 (Ct 40.8), O103 (Ct 39.6), O145 (Ct 40.5)  Cepas -: O111 y O157:H7	IMS O103 -
0	1.2x10 <sup>6</sup>	1.1x10 <sup>6</sup>	+	nd	nd
3.5 ± 0.17	3.9x10 <sup>3</sup>	< 2.6 x10 <sup>2</sup>	stx + (Ct 36.1) eae + Ct 37.0)	Cepas +: O26 (Ct 40.6), O121 (Ct 39.6), O45 (Ct 39.5), O103 (Ct 38.9), O145 (Ct 38.7)  Cepas -: O111 y O157:H7	IMS O145 -
3.7 ± 0.16	2.1x10 <sup>3</sup>	< 2.6 x10 <sup>2</sup>	stx + (Ct 37.7) eae + Ct 37.4)	Cepas +: O26 (Ct 40.8), O121 (Ct 40.7), O45 (Ct 40.0), O103 (Ct 39.9), O145 (Ct 39.0)  Cepas -: O111 y O157:H7	IMS O145 -

**FIGURA 1** - Log del recuento bacteriano en función de la dosis de irradiación (kGy) para cada cepa



**Inóculos: 3 log, 4 log, 5 log UFC de STEC**

La tabla 2 muestra los resultados de los recuentos bacterianos, detección de genes de virulencia (*stx/eae*) y confirmación de serogrupos positivos en las muestras inoculadas con cargas de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  UFC de STEC y posteriormente irradiadas con 4.0 kGy.

**TABLA 2** - Resultados de los recuentos bacterianos, detección de genes de virulencia (*stx/eae*) y confirmación de serogrupos positivos en las muestras inoculadas con cargas de  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  UFC de STEC e irradiadas con 4.0 kGy de  $^{60}\text{Co}$ . nd: No determinada.

Dosis Irradiación Aplicada (kGy)	Inóculo inicial estimado en 65 g	Inóculo Real en 65 g	Recuento (células/65g)		Screening <i>stx/eae</i>	Paneles	
			Aerobios (PCA/TEMPO <sup>®</sup> AC)	STECs (RA)			
0	$1 \times 10^3$	$3.9 \times 10^3$	$3.9 \times 10^3$	$1.5 \times 10^3$	nd	Cepas +: O26 (Ct 32.6), O45 (Ct 25.6), O103 (Ct 23.9), O111 (Ct 28.2), O121 (Ct 33.0), O145 (Ct 22.8) y O157:H7	
$4.10 \pm 0.17$	$1 \times 10^3$	$3.9 \times 10^3$	$< 2.6 \times 10^2$	$< 2.6 \times 10^2$	-	nd	
$4.30 \pm 0.18$	$1 \times 10^4$	$3.9 \times 10^4$	$< 2.6 \times 10^2$	$< 2.6 \times 10^2$	-	nd	
$4.20 \pm 0.17$	$1 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$< 2.6 \times 10^2$	$< 2.6 \times 10^2$	<i>stx</i> + (Ct 37.5) <i>eae</i> + (Ct 38.9)	Réplica A) Cepas +: O45 (Ct 40.8) y O145 (Ct 41.4). Cepas -: O26, O103, O111, O121 y O157:H7	Réplica B) Cepas +: O121 (Ct 39.7) y O145 (Ct 40.2). Cepas -: O26, O45, O103, O111 y O157:H7

## CONCLUSIONES

Se demostró la aplicabilidad de la técnica de irradiación con (<sup>60</sup>Co) como estrategia de mitigación de STECs en muestras de hamburguesas crudas congeladas.

La dosis de irradiación promedio que permitió disminuir un orden de magnitud (D10) las cargas de STEC inoculadas en muestras de hamburguesas 100% carne vacuna previamente irradiadas fue de 0.34 kGy. Dosis superiores a 2.2 kGy disminuyeron los recuentos bacterianos, mientras que dosis superiores a 3.0 kGy comprometieron la viabilidad de las cepas estudiadas. La eliminación efectiva de las siete cepas de STEC inoculadas en 65 g de hamburguesas con una carga de 1x10<sup>3</sup> y 1x10<sup>4</sup> UFC de STEC se logró con una dosis de 4.0 kGy.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), al Instituto Nacional de Carnes (INAC) y al Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) por la financiación del proyecto de investigación gracias al cual se desarrolló este trabajo de investigación.

## REFERENCIAS

Brooks, J.T., Sowers, E.G., Wells, J.G., Greene, K.D., Griffin, P.M., Hoekstra, R.M. y Strockbine, N.A., 2005. Non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States 1983-2002. En: *The Journal of Infectious Disease*. 192, pp.1422-9.  
 CDC, 2005. Bacterial foodborne and diarrheal disease national case surveillance [En línea]. Atlanta: CDC. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/national-surveillance/PDFs/fbsurvsumm2005.pdf>  
 D'Aoust, J.Y., Barnes, R., Carter, M., Drake, S.L., Evanson, D., Fanning, S., Flowers, R., Giaccone, V., Jaykus, L.A., Jouve, J.L., Kennedy, J., McClure, J., McNamara, A., Madsen, M., Nesbakken, T., Notermans, S., O'Brien, S., Ottaviani, F., Ottaviani, M., Smoot,

M., Swaminathan, B., Vernozy-Rozand, C., Wall, P. y Whyte, P., 2007. *Food safety handbook. Microbiological challenges*. Montreal: Biomérieux. ISBN: 978-2-917162-08-8.  
 FSIS, 2000. Directive 7700.1 2-22-00 <http://www.fsis.usda.gov>  
 Hussein, H. S., 2007. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef cattle and their products. En: *Journal of Animal Science*, 85 (E. Suppl.), pp.E63-E72.  
 International Consultative Group on Food Irradiation: Facts about Food Irradiation, IGCFI. 1999 Viena Austria.  
 Masana, M.O., D'Astek, B. A., Palladino, P. M., Galli, L., Castillo, L. L., Carbonari, C., Leotta, G.A., Vilacoba, E., Irino, K. y Rivas, M., 2011. Genotypic characterization of non-O157 shiga toxin producing *Escherichia coli* in beef abattoirs of Argentina. En: *Journal of Food Protection*, 74(12), pp.2008-2017.  
 Mussio, P., Martínez, I., Soumastre, M., Maquieira, A.M., 2014. Validación de la detección de STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145 y O157) en hamburguesas crudas mediante el uso de PCR a tiempo real (BAX® System Q7, DuPont) utilizando «WET POOLS». *INNOTEC 2014*, No. 9 (75-83)- ISSN 1688-3691-75.  
 Neill, M.A., 1997. Overview of verotoxigenic *Escherichia coli*. En: *Journal of Food Protection*, 60, pp.1444-1446.  
 Park J.G., Yoon Y., Park J., Han J., Song B., Kim J., Kim W, Hwang H, Han S., Lee J., Effects of gamma irradiation and electron beam irradiation on quality, sensory, and bacterial populations in beef sausage patties, *Meat Science* 85 368–372, 2010.  
 Paton, J.C. y Paton, A.W., 2000. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. En: *Science & Medicine*, 8(3), pp.28-37.  
 Tuncay G, Demirci A., Velioglu M., Serap D., Yilmaz I., Sagdic O., Application of gamma irradiation for inactivation of three pathogenic bacteria inoculated into meatballs. *Radiation Physics and Chemistry* 77 1093– 1096, 2008.  
 USDA, Food Safety and Inspection Service, 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products [En línea]. Washington: USDA. [Consulta: enero 2012]. Disponible en: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/rdad/FRPubs/2010-0023FRN.pdf>  
 Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M.I., González, S., González, G., Gugliada M.J., Carbonari, C.C., Algorta, G., Bernadà, M., Sabelli, R., Pardo, L., Rivas, M. y Schelotto, F., 2008. Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. En: *Revista Argentina de Microbiología*, 40, pp.93-100.

## ASPECTOS NUTRICIONALES DE VITAMINAS Y MINERALES EN EL SIGLO XXI

María Luz P.M. de Portela



EN VENTA EN AATA

[www.alimentos.org.ar](http://www.alimentos.org.ar) | [tecnologos@alimentos.org.ar](mailto:tecnologos@alimentos.org.ar)

