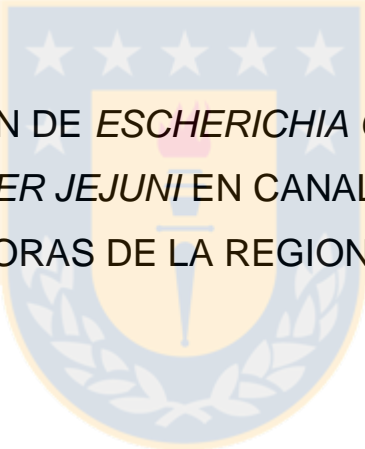




Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Veterinarias - Programa de Magíster en Ciencias
Veterinarias con mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal



DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 Y
CAMPYLOBACTER JEJUNI EN CANALES DE BOVINOS EN
FAENADORAS DE LA REGION DEL BIO BIO

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Veterinarias con
Mención en Calidad e Inocuidad de Alimentos de Origen Animal.

FELIPE IGNACIO FAÚNDEZ RETAMAL
CHILLÁN-CHILE
2018

Profesor Guía: Juana López Martín
Dpto. de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad de Concepción

Detección de *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* en canales de bovinos en faenadoras de la Región del Bío Bío

Aprobador por:

Juana López Martín
Médico Veterinario, Mg.Sc.

Profesora Guía

Fernando González Schnake
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet.

Evaluador interno

Jorge Ávila Stagno
Médico Veterinario, Dr. Med. Vet

Evaluador externo

Mario Briones Luengo
Médico Veterinario, Mg. Cs

Director (s) de Programa



TABLA DE CONTENIDOS

| CAPÍTULO | PÁGINA |
|--------------------------------------|---------------|
| Índice de tablas..... | IV |
| Índice de Figuras..... | VI |
| RESUMEN..... | VII |
| SUMMARY..... | VIII |
| I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 17 |
| III. MATERIALES Y MÉTODO..... | 18 |
| IV. RESULTADOS..... | 27 |
| V. DISCUSIÓN..... | 40 |
| VI. CONCLUSIONES..... | 51 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 52 |
| DECLARACIÓN DE AUTORIA..... | 59 |



ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA N° | PÁGINA |
|---|--------|
| EN EL TEXTO | |
| 1. Secuencia de primers utilizados para el Multiplex PCR (Wang <i>et al.</i> , 2002)..... | 21 |
| 2. Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción del Multiplex PCR para los genes <i>fliC</i> y <i>rfbE</i> | 22 |
| 3. Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción del Multiplex PCR para los genes <i>stx-1</i> , <i>stx-2</i> y <i>eaeA</i> | 22 |
| 4. Protocolo de amplificación de la técnica Multiplex PCR..... | 23 |
| 5. Secuencia de los primers del gen <i>mapA</i> para realizar la detección por PCR tradicional (Singh <i>et al.</i> , 2011)..... | 24 |
| 6. Concentraciones y volúmenes de reactivos a utilizar en la técnica PCR tradicional para detección del gen <i>mapA</i> | 25 |
| 7. Protocolo de amplificación de la técnica PCR tradicional para el gen <i>mapA</i> (Zumbado <i>et al.</i> , 2014)..... | 25 |
| 8. Cepas positivas a <i>Escherichia coli</i> según fase de la cadena productiva y zona de muestreo..... | 27 |
| 9. Total de cepas positivas a <i>Escherichia coli</i> según zonas de muestreo..... | 28 |
| 10. Canales de bovinos positivas a <i>Escherichia coli</i> por faenadora..... | 28 |
| 11. Canales de bovinos positivas a <i>Escherichia coli</i> por fase de la cadena productiva..... | 29 |
| 12. Canales de bovinos positivas a <i>Escherichia coli</i> O 157:H7 del total de canales positivas a <i>Escherichia coli</i> (n=91)..... | 30 |
| 13. Cepas positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> según fase de la cadena productiva y zona de muestreo..... | 30 |

| | |
|--|----|
| 14. Total de cepas positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> según zona de muestreo..... | 31 |
| 15. Canales de bovinos positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> por faenadora.. | 31 |
| 16. Canales de bovinos positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> según fase de la cadena productiva..... | 32 |
| 17. Canales positivas a <i>E. coli</i> por determinación microbiológica en las distintas faenadoras..... | 35 |
| 18. Canales positivas a <i>E. coli</i> O157:H7 por determinación molecular según Faenadora..... | 35 |
| 19. Canales positivas a <i>E. coli</i> por determinación microbiológica en las distintas fases de la cadena productiva..... | 36 |
| 20. Canales positivas a <i>E. coli</i> O157:H7 por determinación molecular en las distintas fases de la cadena productiva..... | 36 |
| 21. Canales positivas a <i>E. coli</i> por determinación microbiológica según zona de muestreo..... | 37 |
| 22. Canales positivas a <i>E. coli</i> O157:H7 por determinación molecular según zona de muestreo..... | 37 |
| 23. Canales positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> por determinación microbiológica en las distintas faenadoras..... | 38 |
| 24. Canales positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> por determinación microbiológica en las distintas fases de la cadena productiva..... | 38 |
| 25. Canales positivas a <i>Campylobacter jejuni</i> por determinación microbiológica en las distintas zonas de muestreo..... | 39 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA N° | PÁGINA |
|--|--------|
| EN EL TEXTO | |
| 1. Gel de agarosa de 25 carriles al 1% correspondiente al PCR Multiplex para los genes <i>fliC</i> y <i>rfbE</i> | 33 |
| 2. Gel de agarosa al 1% de 8 carriles correspondientes a PCR Multiplex para los 5 genes a detectar..... | 33 |
| 3. Gel de agarosa al 1% de 25 carriles, para PCR Multiplex de los genes <i>stx1</i> , <i>stx2</i> y <i>eaeA</i> | 34 |



RESUMEN

DETECCIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 Y *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN CANALES DE BOVINOS EN FAENADORAS DE LA REGION DEL BIO BIO

DETECTION OF *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 AND *CAMPYLOBACTER JEJUNI* IN BOVINE CARCASSES IN SLAUGHTERHOUSES OF THE BIO BIO REGION

Escherichia coli O157:H7 como *Campylobacter jejuni* son microorganismos patógenos que pueden ser causantes de severos cuadros clínicos, y al mismo tiempo, ambos se puede asociar su presencia en carnes de bovinos. La normativa chilena para carnes de consumo nacional no regula la pesquisa obligatoria específica de *Escherichia coli* O157:H7 ni a *Campylobacter jejuni*. Se analizaron 544 muestras para la detección de cada microorganismo, obtenidas a partir de 272 canales de bovinos provenientes de 2 faenadoras de la Región del Bío Bío. El muestreo fue realizado en diferentes etapas de la línea productiva, en el momento de la post ducha, y posterior al paso de la canal por la cámara de frío. Las muestras positivas a *E. coli* por medio de técnicas tradicionales de detección microbiológica y bioquímica se les realizó un PCR Multiplex, de las cuales 11 canales fueron positivas a la detección de los genes *fliC* y *rfbE* para *E. coli* O157:H7 (4,0%), y de esas, solo 6 canales (2,2%) fueron positivas a los genes de patogenicidad *stx1*, *stx2* y *eaeA*. En el caso de *C. jejuni*, 22 canales (8,0%) fueron positivas por detección microbiológica y bioquímica, pero ninguna amplificó para el gen *mapA* por medio de un PCR tradicional.

Palabras clave: *Escherichia coli* O157:H7; *Campylobacter jejuni*; Faenadoras; PCR Multiplex

SUMMARY

Escherichia coli O157:H7 as *Campylobacter jejuni* are pathogenic microorganisms that can cause severe clinical symptoms, and at the same time, both can be associated with bovine meat.

Chilean regulations for meat for domestic consumption do not regulate the specific mandatory research of *Escherichia coli* O157: H7 or *Campylobacter jejuni*. We analyzed 544 samples for the detection of each microorganism, obtained from 272 carcasses of cattle from 2 slaughterhouses in the Bío Bío Region. The sampling was done at different stages of the production line, at the time of the post-shower, and after the passage of the channel through the cold chamber. The samples that were positive for *E. coli* by means of microbiological and biochemical detection techniques were subjected to a Multiplex PCR, of which 11 carcasses were positive for the detection of the *fliC* and *rfbE* genes for *E. coli* O157:H7 (4, 0%), and of these, only 6 carcasses (2.2%) were positive for the pathogenicity genes *stx1*, *stx2* and *eaeA*. In the case of *C. jejuni*, 22 carcasses (8.0%) were improved for microbiological and biochemical detection, but were not amplified for the gen *mapA*.

I. INTRODUCCIÓN

Inocuidad alimentaria

Todo alimento al momento del consumo debe ser inocuo, por esta razón cada país genera diferentes medidas para lograr tal efecto. En Chile el concepto de inocuidad alimentaria es definido por el Ministerio de Salud, el que dice así: “La inocuidad de un alimento es la garantía de que no causará daño al consumidor, cuando sea preparado o ingerido y de acuerdo con el uso a que se destine. La inocuidad es uno de los cuatro grupos básicos de características que junto con las nutricionales, organolépticas y comerciales componen la calidad de los alimentos” (ISP, 2015). Una de las características que debe cumplir un alimento de calidad, es que esté exento de algún elemento nocivo para el consumidor, es decir que cumpla con los estándares de calidad higiénica, por lo tanto, las materias primas y los alimentos deben estar libres de microorganismos patógenos, de toxinas, de residuos químicos de origen fitosanitario o terapéutico o de compuestos indeseables que se generan en el proceso (Jeantet *et al.* 2006).

La industria alimentaria a partir de las exigencias de los mercados y la toma de conciencia de sus derechos por parte de los consumidores, está obligada a la elaboración de alimentos de calidad y sobre todo inocuos. Para mantener la calidad e inocuidad de los alimentos en toda su cadena de producción, se deben de implementar ciertas medidas. Estas medidas son conocidas como los Sistemas de Aseguramiento de Calidad basados en Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) y su prerrequisito de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) (SAG, 1999 b).

En el caso de las buenas prácticas de manufactura, comprenden la descripción de los procedimientos de control de todos los procesos productivos de manera sistemática, en el cual se incluyen los Procedimientos Operacionales Estandarizados (SOP) y los Procedimientos Operacionales de Sanitización Estandarizados (SSOP), conocidos también como pre-HACCP. Por su parte el sistema de los SSOP se compone de dos programas: Programa de higiene, limpieza y sanitización de la planta, del personal y el programa de control de plagas. El programa SOP incluye las instrucciones de operación que debe realizar

en cada proceso el operador (SAG, 1999 b).

La implementación de estos sistemas de aseguramiento de calidad se ha ido estableciendo en la práctica, paulatinamente desde los años 70 en el país. La definición del SAG para el HACCP es: “Documento escrito basado en los principios del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos, que delinea los procedimientos formales que deben seguirse, en concordancia con los principios generales que aseguran el control y especifican procesos y procedimientos”. Por punto de control crítico se entiende como el punto, fase o procedimiento del proceso en el que se puede aplicar un control, para impedir, eliminar o reducir a niveles aceptables un peligro, mejorando así la inocuidad de alimentos (SAG, 1999 b). Este método pretende generar una actitud preventiva frente a los problemas de orden higiénico. Permite jerarquizar y orientar la acción a desarrollar para mejorar la calidad sanitaria de los productos (Jeantet *et al.*, 2006).

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) son ocasionadas al consumir algún alimento o agua contaminada. Se consideran contaminados cuando en ellos se detecta la presencia de microorganismos, virus, parásitos, sustancias extrañas o deletéreas de origen mineral, orgánico o biológico, sustancias radioactivas, sustancias tóxicas en cantidades superiores a las permitidas por las normas vigentes, o que se presuman nocivas para la salud, o si se encuentra en el alimento cualquier tipo de suciedad o restos de excrementos (Minsal, 2011).

La gravedad del cuadro depende de muchos factores: el agente, la cantidad consumida del alimento, y el estado de salud del consumidor, desencadenando un cuadro de mayor agresividad si el afectado pertenece a uno de los grupos de mayor riesgo como son la tercera edad, niños, embarazadas e inmunodeprimidos. Los cuadros pueden ser diversos, pueden variar desde uno digestivo autolimitante a un cuadro que afecte al sistema nervioso, que incluso podría llevar a la muerte (Olea, 2007).

Los brotes de ETAs son evitables, ya que generalmente suceden por desconocimiento de ciertas medidas de higiene al momento de la manipulación y preparación de los alimentos por parte del consumidor. Los datos más actualizados entregan que durante el 2013 en la Región del Bío-Bío el 65% de los

brotos de ETAs se produjeron en los hogares de los consumidores (Minsal, 2014). Con relación a los brotes y los agentes causantes de ETAs en la Región del Bío-Bío, el 99% corresponde a un agente bacteriano, aunque la gran mayoría no son identificados, debido a que el 88% de los agentes involucrados en las ETAs fueron intoxicaciones alimentarias bacterianas no especificadas (Minsal, 2014).

Con respecto a los alimentos involucrados en el desarrollo de brotes de ETAs en la Región del Bío-Bío, el 66% se relaciona con productos de origen marino, esto principalmente por no respetar los tiempos ni temperaturas de cocción al momento de la preparación. Con respecto a los productos cárnicos, aproximadamente el 20% de los brotes de las ETAs en año 2013 están relacionados a estos tipos de alimentos, donde se incluyen carnes rojas, de aves y productos o alimentos preparados en los cuales se utilizaron carnes, por esta razón son alimentos a considerar como posibles desencadenadores de brotes, si no se respeta la higiene en las cadenas productivas como en faenadoras, o al momento de la preparación en el hogar, debido a que podrían ser portadores de microorganismos patógenos para el consumidor. Por último, porcentajes inferiores al 5% se atribuyen como los responsables de brotes de ETAs a productos de pastelería, bebidas y otros alimentos que no fueron identificados (Minsal, 2014).

Las carnes rojas en general (vacunos, cerdos, ovejas, cabras, llamas y otras especies), son un medio de cultivo excepcional para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, ya que poseen una actividad de agua (a_w) de 0,99. Las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas, pues tienen un pH entre 5,1 y 5,6, adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, y un potencial de reducción que permite el crecimiento de los anaerobios en profundidad y los aerobios en la superficie (Jeantet *et al.*, 2006).

En las cadenas productivas de carnes rojas la unidad a trabajar es la canal, la que se define como la unidad primaria de carne, que resulta del animal una vez insensibilizado, desangrado, descuerado, eviscerado, con la cabeza cortada a nivel de la articulación atlantooccipital, sin órganos genitales externos y las extremidades cortadas a nivel de las articulaciones carpometacarpianas y tarsometatarsianas. La canal sólo podrá incluir la cola, pilares y porción periférica

del diafragma, la grasa perirrenal, pélvica, torácica, cervical y caudal, las cuales no se deben cortar. (INN, 2002).

La calidad microbiológica de la carne depende de múltiples factores como son el estado fisiológico del animal al momento del beneficio, la propagación de la contaminación durante este proceso, la manipulación, la temperatura y otras condiciones como de almacenamiento y distribución. De hecho, algunos de los microorganismos contaminantes provienen del tracto intestinal del animal, así como del entorno con el que el animal tenía contacto antes o durante el proceso del beneficio. Esto es evidente con los estudios sobre el origen de los contaminantes que muestran una asociación de las superficies de trabajo con la presencia de enterobacterias en las carnes (Nychas *et al.*, 2008).

Para mantener la inocuidad de la canal es importante respetar el bienestar del animal debido a que, si el animal llega fatigado al momento del beneficio, ya no poseería reservas de glucógeno, desencadenando una insuficiente disminución del pH de la canal por la poca producción de ácido láctico en el proceso del rigor mortis, transformando la canal en un medio propicio para el crecimiento de diversos microorganismos posiblemente patógenos. En general los microorganismos patógenos están confinados en la mucosa del tubo digestivo, y si las condiciones del beneficio son correctas, teóricamente no deberían contaminar la carne. Cuando se desarrolla el beneficio de manera no óptima podría desencadenar que las bacterias puedan migrar desde el tubo digestivo hacia el músculo, conociéndose este proceso como la bacteriemia del sacrificio. Estas pueden atravesar la pared intestinal transportándose en la linfa y en la sangre. Son detenidos en los ganglios y en el hígado, que forma el sistema reticuloendotelial. Esto podría suceder cuando el animal está estresado durante la faena o en un período de fatiga, se producen catecolaminas que paralizan este sistema, pudiéndose liberar los microorganismos que estaban retenidos tanto en los ganglios como en el hígado, a partir de esto, se podrían multiplicar los microorganismos en la sangre según la velocidad del enfriamiento de la parte interna de la canal. Los microorganismos que contaminan la canal de esta forma son eliminados principalmente en el desangrado, pero algunos se adhieren al

epitelio capilar continuando su multiplicación. Otro factor que puede influir en la contaminación de la canal sería la evisceración tardía en un tiempo mayor a 45 minutos post beneficio, ya que los tejidos digestivos se debilitan permitiendo un tránsito fácil de microorganismos hacía los músculos (Jeantet *et al.*, 2006).

Se deben tomar las precauciones máximas de higiene al momento del proceso de la faena, con énfasis en el desangrado y desollado, ya que todos los animales transportan grandes cantidades de microorganismos como bacterias, mohos y levaduras, que están presentes en el cuero, los pelos y las pezuñas de los vacunos, que son transmitidos a la canal luego del beneficio, al ser arrastrados por el flujo sanguíneo cuando se cortan las carótidas. Por lo anterior, antes de practicar las incisiones de desangrado se aconseja la limpieza de la piel en el lugar de corte o incisión, y también la desinfección de la hoja del cuchillo. Así se reduce la entrada de microorganismos a la circulación, debido a que se ha demostrado que, si se contamina la hoja del cuchillo con un determinado microorganismo, este aparece después en las vísceras y en la canal, al haber sido distribuido por la circulación sanguínea. Por último, las bacterias también pueden proceder de los pisos, paredes, mesas, cuchillos y manos de los operadores en la planta de faena (Moreno García, 2006).

La principal fuente de contaminación de la superficie de la canal es el mismo animal que era portador, se ha reportado en estudios que el 70% de la contaminación proviene del mismo animal, y que un 30% es a partir de otros animales portadores. En el mismo estudio se concluyó que solo un 25% de las canales fueron contaminadas por genotipos presentes en las heces. Muchas veces la contaminación de la canal es generada durante el transporte o se produce una contaminación cruzada con otras canales ya contaminadas (Arcos-Ávila *et al.*, 2013).

La presencia de patógenos en la carne cruda es un problema imposible de solucionar. Ninguno de los procedimientos disponibles puede proporcionar una carne roja cruda, libre de potenciales patógenos (Roberts y Hobbs, 1997).

La importancia del estudio de la prevalencia de microorganismos en canales tanto en plantas de beneficio como en los expendios, radica en que muchos de los

animales infectados con enterobacterias no evidencian signos clínicos que permitan aislarlas antes de la entrada a la planta de beneficio, o no son detectados en la inspección post-mortem, también es posible que la contaminación ocurra por los equipos para el procesamiento y beneficio de los animales, otra opción es que la contaminación provenga de los operarios (Arcos- Ávila *et al.*, 2013).

Las principales bacterias que son las implicadas en las ETAs, a partir del consumo de carnes contaminadas son las que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae (bacterias entéricas). Esta familia se conforma por 41 géneros y más de 100 especies (Quinn *et al.*, 2002). Las enterobacterias habitan en el tracto intestinal de los animales y el hombre, muchas veces pueden provocar enfermedades en éstos, y también podrían contaminar la vegetación, el suelo y el agua (Quinn y Markey, 2010). Pueden clasificarse de forma arbitraria en tres categorías: agentes patógenos oportunistas, patógenos principales, y no patógenos. Los patógenos oportunistas como los de las especies del género *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes* ocasionan principalmente enfermedades a nivel del tracto digestivo. Los patógenos principales como son *E. coli*, *Salmonella spp.* y los del género *Yersinia*, pueden causar daños entéricos y sistémicos, al poseer una estructura antigénica compleja y por producir diferentes toxinas y factores de virulencia. Por último, existen otras bacterias que carecen de interés desde el punto de vista de su patogenicidad, como las de los géneros *Hafnia* y *Erwinia* (Biberstein y Chung Zee, 1994).

Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria bacilo Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* descrita en 1885 por el pediatra alemán Theodor Escherich en las heces de un niño con diarrea. Mientras algunas cepas son comensales de la microbiota en el tracto intestinal de animales y humanos, constituyendo una de las especies bacterianas más abundantes en esta localización, algunas otras son importantes patógenos que causan un amplio espectro de enfermedades, desde enfermedades autolimitantes a enfermedades más graves tanto intestinales como extra intestinales (Mainil, 2013).

Algunas cepas de *E. coli* patógenas son capaces de crecer a temperaturas tan bajas como 7°C y tan altas como a 46°C, siendo las temperaturas óptimas entre 35-40°C. A temperatura de refrigeración sobrevive bien en los alimentos durante un almacenamiento de 1 a 5 semanas. En la carne picada *E. coli* O157:H7 se ha descrito que ha permanecido durante 9 meses a -20°C, también es capaz de crecer en un medio con un pH de 4,5. (Roberts y Hobbs, 1997).

Una de las funciones que cumple *E. coli* es ser un microorganismo indicador de una posible contaminación bacteriana, donde se clasifica como un coliforme fecal. Comprenden un grupo de microorganismos seleccionados por incubación de los inóculos procedentes de un caldo de enriquecimiento de coliformes a temperaturas superiores a las normales (44-45,5°C) (Jay, 1994). El concepto de coliformes como indicadores bacterianos de la calidad microbiana se basa en la premisa de que estas bacterias están presentes en gran número en las heces de seres humanos y otros animales homeotérmicos. Por ello, la presencia de este microorganismo en un alimento o agua, indica generalmente una contaminación directa o indirecta de origen fecal (Stevens *et al.*, 2003). *E. coli* es el indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos en el agua, en moluscos, en productos lácteos y en otros tipos de alimentos (Stevens *et al.*, 2003). Concentraciones altas de *E. coli* en alimentos sugieren una falta general de higiene en el manejo del mismo, y un almacenamiento inadecuado, esto sucede por ejemplo por un quiebre en la cadena de frío (Jeantet *et al.*, 2006). La presencia de *E. coli* no constituye una connotación directa de la presencia de un patógeno, sino que implica únicamente un cierto riesgo de que pudiera estar presente. Con pocas excepciones, los coliformes no se consideran un riesgo para la salud (Jay, 1994).

E. coli al año provoca 630 millones de casos de diarrea y aproximadamente de 775.000 muertes al año, afectando principalmente a la población infantil del tercer mundo (Kaper *et al.*, 2004).

La transmisión puede ser de persona a persona debida a los manipuladores de alimentos, también se sugiere la importancia de la mosca doméstica como vector en la transmisión tanto de *E. coli* O157:H7 como de cepas no-O157:H7 cuya

frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7 (Rodríguez Angeles, 2002).

Reservorios

Pocos después del nacimiento de los mamíferos se produce la colonización del tracto intestinal por parte de *E. coli* desde el ambiente para persistir como un componente importante de la flora normal del intestino a lo largo de toda la vida. La mayoría de las cepas presenta escasa virulencia, las cepas patógenas poseen factores de virulencia que les permiten colonizar las mucosas y posteriormente desencadenar la enfermedad. Entre los factores predisponentes que permiten dicha colonización se encuentran la edad, el estado inmunitario, la naturaleza de la dieta y la exposición intensa a cepas patógenas (Quinn y Markey, 2010). El nicho de *E. coli* es la capa mucosa del colon de los mamíferos, donde predomina y es un microorganismo competidor exitoso (Kaper *et al.*, 2004).

Los rumiantes domésticos son portadores asintomáticos de cepas STEC y *E. coli* O157:H7, responsables de la contaminación del ambiente, de fuentes de agua y de la persistencia de estas cepas en las granjas (Baltasar *et al.*, 2014). El ganado bovino es el principal reservorio para infecciones en humanos. La carne de ganado bovino picada o molida e insuficientemente cocida, como la que se utiliza en hamburguesas, ha sido el vehículo más frecuente en los brotes epidémicos (Méndez *et al.*, 2013). Aunque igual se ha aislado *E. coli* O157:H7 en cabras, borregos y con menos frecuencia en cerdos y pollos (Rodríguez Angeles, 2002). El tracto intestinal del ganado es un reservorio importante, entonces los alimentos crudos de origen animal pueden estar contaminados por *E. coli* O157:H7 por contacto con materia fecal durante las operaciones del beneficio (Roberts y Hobbs, 1997).

Patogenicidad

Existen cepas de *E. coli* que han adquirido atributos que le otorgan una virulencia específica, con una capacidad de adaptarse a nuevos nichos y les permite causar un amplio espectro de enfermedades intestinales como extra intestinales. Estos atributos de virulencia se codifican con frecuencia en elementos genéticos móviles como fagos, plásmidos o por mutaciones. (Chandra *et al.*, 2013). A partir de estos

factores de virulencia se clasifican en patotipos, donde cada uno tiene características distintivas, relacionadas con la epidemiología, patogenia, manifestaciones clínicas y de su tratamiento (Huang *et al.*, 2006).

Se conocen bajo el nombre de *Escherichia coli* shigatoxigénicas (STEC) a un grupo de *E. coli* asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos y reportadas tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. En el humano pueden causar dolores estomacales, diarreas hemorrágicas, incluso desarrollar un cuadro más severo, como es el síndrome urémico hemolítico (SHU) (Botkin *et al.*, 2012), también se han reportado casos de púrpura trombocitopénica a partir de la presencia de estos patógenos (Méndez *et al.*, 2013). Pueden alcanzar a desarrollar SHU hasta el 61% de los individuos afectados en los brotes por STEC, una condición que se caracteriza por anemia hemolítica y trombocitopenia que puede culminar en la insuficiencia renal con riesgos de letalidad de 5 a 10% (Baltasar *et al.*, 2014).

El cuadro clínico se desarrolla por las citotoxinas denominadas toxinas Shiga, cuya síntesis está codificada por genes *stx1* y *stx2* de bacteriófagos lisogénicos que se insertan en su genoma en forma estable. El grupo STEC presenta factores de virulencia que aumentan su patogenicidad como la intimina que es una proteína de membrana externa de 97 KDa, codificada por el gen *eaeA* localizado en el cromosoma de la bacteria, y es responsable de la adherencia íntima a las células epiteliales, del barrido de las microvellosidades de la mucosa colónica (lesión A/E) y la inhibición de la síntesis de proteínas (Baltasar *et al.*, 2014). Otro factor es la enterohemolisina, que es una proteína de la familia RTX de las citolisinas formadoras de poros, es codificada por el gen *hlyA* (Fagan *et al.*, 1998).

La toxina Stx está constituida de una subunidad A y cinco subunidades B idénticas, la toxina se fija a receptores celulares compuestos por glicolípidos (globotriaosilceramida (Gb3)). La subunidad A que se escinde actúa evitando la correcta síntesis de proteínas (Vadillo *et al.*, 2002). Stx se produce en el colon y viaja por el torrente sanguíneo a los riñones, donde las células endoteliales que dañan son renales y ocluye la microvasculatura a través de una combinación de toxicidad directa y la inducción de citoquinas y quimioquinas de producción local,

lo que resulta en la inflamación renal, este daño puede desencadenar en SHU (Kaper *et al.*, 2004). La toxina también induce la apoptosis en las células epiteliales intestinales, media el daño local en el colon, lo que resulta en diarrea con sangre, colitis hemorrágica, necrosis y perforación intestinal (Chandra *et al.*, 2013).

El subgrupo *E. coli* enterohemorrágico (EHEC) es el serotipo más agresivo para el humano y según la WHO, una cepa STEC para ser considerada EHEC deberá producir intimina y enterohemolisina. Existen más de 200 serotipos, el más frecuente a nivel mundial es *E. coli* O157:H7 (Méndez *et al.*, 2013). Además de Stx, la mayoría de las cepas de EHEC también contienen la isla de patogenicidad LEE. Aunque más de 200 serotipos de *E. coli* pueden producir Stx, la mayoría de estos serotipos no contienen esta isla de patogenicidad y no están asociados con la enfermedad humana. (Chandra *et al.*, 2013).

La secuencia del proceso patogénico sería: adherencia laxa al enterocito por la fimbria, seguida de adherencia íntima y lesión de la pared del enterocito por producción de la proteína intimina codificada por el gen *eaeA* y posterior liberación de las toxinas (Margall *et al.*, 1997).

El periodo de incubación de EHEC en el afectado varía de 1 a 8 días; inicialmente produce diarrea sin sangre, con o sin vómito, dolor abdominal, fiebre, y después de 1 a 2 días la diarrea se torna sanguinolenta y se intensifica el dolor abdominal, de una duración de 4 a 10 días, produce heces abundantemente sanguinolentas. Si no se trata de forma correcta el cuadro podría llegar a desarrollar SHU (Rodríguez. Angeles, 2002).

Situación nacional

Con respecto a la situación nacional de los casos y aislados detectados de *E. coli* O157:H7 se han descrito frecuencias de aislamiento de STEC, desde el contenido intestinal de cerdos y bovinos faenados, en un 7% y 17 % respectivamente. Así, si los protocolos o procesos de faenamiento para estos animales no son los adecuados, la carne se puede contaminar si por error su contenido intestinal tiene contacto con la materia muscular (Vidal, 2011).

Según datos entregados por el Instituto de Salud Pública (ISP), durante el transcurso de los años 2007 a 2013 se analizaron 2425 cepas presuntivas a *E. coli* STEC donde 599 (24,7%) fueron confirmadas como positivas. En el caso de la Región del Bío Bío en este mismo período de años se analizaron 173 cepas sospechosas donde 31 (17,9%) resultaron positivas. Si se clasifican por grupo etario el 86,4 % de los confirmados a STEC son niños menores a 9 años. Y por último el serotipo predominante de las cepas STEC positivas fue el O157:H7 abarcando un 52,7%, siendo 288 cepas positivas a este serotipo. En la Región del Bío Bío 4 cepas fueron positivas a O157:H7 (ISP, 2014 a).

Campylobacter jejuni

La denominación genérica de *Campylobacter* fue adoptada en los años sesenta para referirse a los anteriormente llamados vibrios microaerófilos. Bacterias que están implicadas en dos grandes tipos de enfermedades: infecciones genitales, fetales en ovinos y bovinos, y enterocolitis agudas en seres humanos. *Campylobacter* es considerada una de las principales causas de infecciones y toxiinfecciones alimentarias, junto a *Salmonella spp.* y *E. coli*, a nivel mundial (Vadillo *et al.*, 2002).

Campylobacter jejuni es una bacteria microaerófila, es decir una atmósfera con mucho CO₂ y un poco de oxígeno favorece su crecimiento, es una bacteria muy móvil, se clasifica como bacilo Gram negativo e intracelular facultativo (0,2–0,8 µm de ancho y 0,5–5 µm de largo), no forma esporas. Posee una forma característica que es similar a la letra S o espiral, con flagelos polares aislados a uno o a ambos extremos, lo que le confiere una movilidad característica, como la de un sacacorchos, son termófilas, ya que crecen óptimamente a 42°C (Quinn y Markey, 2010). Su morfología es una de las características más sobresalientes, está configuración espiral, curvada o en S parece que representa una adaptación al ambiente de la mucosa intestinal, ya que dicha forma facilitaría la movilidad de las bacterias en el seno de los líquidos viscosos (Vadillo *et al.*, 2002).

Es el agente primario de la forma más frecuente de gastroenteritis bacilar humana, la campilobacteriosis. Es una enfermedad aguda, sus signos y síntomas varían de acuerdo con las condiciones del hospedero. En países en vías de desarrollo es

endémica, afecta principalmente a lactantes y niños pequeños (Day *et al.*, 2000). Alrededor del 90% de las infecciones por *Campylobacter* en humanos se deben a *Campylobacter jejuni* (Jonas *et al.*, 2014). Se cree básicamente que la fuente de infección por *C. jejuni* en humanos es por la manipulación y/o el consumo de carne contaminada, especialmente carne de aves de corral, siendo esta una posible fuente de contagio (Quinn y Markey, 2010).

Con respecto a sus características de sobrevivencia en distintos ambientes que pudieran facilitar o evitar el crecimiento de *C. jejuni*, se sabe que los campilobacter son muy sensibles a los agentes físicos y químicos, como la desecación (aw menor a 0,97), calor, viento, pH bajo, radiación gamma, desinfectantes. Pueden sobrevivir hasta 4 semanas en medios acuosos a 4°C, pero son inactivados en pocos días a temperaturas superiores a 15°C. Permanecen viables durante meses a temperaturas de -20°C o menos. El consumo de agua no clorada ha sido causa de brotes de enteritis humana a partir de *C. jejuni*. (Vadillo *et al.*, 2002). *C. jejuni* no crece a 30 o a 47°C, a pH menor o igual a 4,7, o en presencia de cloruro sódico al 2% (Roberts y Hobbs, 1997).

La industria alimentaria para evitar la presencia de este patógeno en los productos cárnicos adopta medidas preventivas en su cadena productiva. Actualmente se proponen métodos de control combinados que comprenden el mejorar las técnicas de lavado de las carcasas y la aplicación de desinfectantes químicos e irradiación gamma. Todas estas medidas pretenden reducir el grado de contaminación de las carnes. El adecuado envasado en condiciones estériles y la cadena de frío en todo el proceso de comercialización de los productos alimenticios son claves para disminuir la incidencia de *C. jejuni* (Stanchi, 2007).

La refrigeración y congelación se utilizan para controlar el crecimiento bacteriano en los alimentos. En la carne, la supervivencia microbiológica es mayor que en la leche. El efecto de estas intervenciones sobre la supervivencia de *C. jejuni* no está del todo claro (Roberts y Hobbs, 1997). Los recuentos de *C. jejuni* en el caso de las canales de aves (que son las más estudiadas) disminuyen durante la refrigeración o congelación, pero no son eliminados. Hay muchos factores que pueden causar lesiones o la muerte de las células de *Campylobacter spp.*, como

nucleación de hielo, la deshidratación, o el estrés oxidativo. La detección de células viables después del almacenamiento refrigerado o congelado es importante, ya que la dosis infecciosa de *C. jejuni* se cree que es alrededor de 500 células. *C. jejuni* es capaz de sobrevivir hasta 56 días bajo almacenamiento en congelación a -20°C (que es la temperatura que se encuentra en la mayoría de los congeladores domésticos). Por lo tanto, el almacenamiento congelado de alimentos no puede ser considerado un procedimiento de seguridad, debido a la baja dosis infectante que necesita *Campylobacter spp* para generar un cuadro clínico (Maziero *et al.*,2010).

C. jejuni bajo condiciones de estrés entra a un estado “viable no cultivable”, caracterizado por captar aminoácidos y mantenerse con la membrana externa intacta, pero sin poder multiplicarse en ningún medio selectivo, no obstante, a pesar de esta condición, el microorganismo puede ser transmitido a los animales. En esta condición *Campylobacter* se ve de forma cocoide (Singh *et al.*, 2011).

Reservorios

Campylobacter jejuni puede colonizar superficies mucosas, generalmente del tracto intestinal, en la mayoría de las especies de mamíferos, aves e inclusive de insectos, actuando estos últimos como vectores mecánicos (Stanchi, 2007).

C. jejuni y *C. lari* colonizan el intestino de las aves, lo que da lugar a la contaminación fecal de cursos de agua y alimentos almacenados (Quinn y Markey, 2010). Sin embargo, el contacto con animales domésticos y con el ganado, el consumo de carne, agua contaminada o leche cruda y viajes a zonas donde la enfermedad es endémica se consideran factores de riesgo para la enfermedad (OIE, 2004).

El tracto intestinal puede albergar a *C. jejuni* sin síntomas visibles de enfermedad en una gran variedad de animales homeotérmicos, tanto domésticos como salvajes (Roberts y Hobbs, 1997). En el sur de Chile, el ganado de carne y leche se deben considerar un reservorio importante de contaminación de *Campylobacter jejuni*, también se ha demostrado que gallinas y perros callejeros son reservorios, siendo posibles fuentes de contaminación del medio ambiente. Sin embargo, existe poca información sobre la pertinencia de los bovinos en la transmisión de *C.*

jejuni a los seres humanos. La mayor prevalencia de *Campylobacter jejuni*. es en el ganado de carne en comparación con el ganado lechero, esto puede estar asociado con el medio en que habitan, debido a que son criados en el exterior y en contacto con un ambiente diverso, en cambio el ganado lechero se mantiene en mejores condiciones higiénicas confinados en los establos (Fernández y Hirschfeld, 2009).

C. jejuni se puede aislar en las canales de carne roja de animales recién faenados, pero en menor cantidad que en las aves de corral. Los animales de compañía que se alimentan con restos crudos pueden transmitir la infección al hombre. Los microorganismos presentes en las carnes crudas pueden contaminar las zonas de trabajo y las manos del personal de cocina antes de preparar a los alimentos o son causantes de una autoinfección (Roberts y Hobbs, 1997). Las aguas residuales, podrían ser reservorios y contaminar los cuerpos de agua. *C. jejuni* pueden sobrevivir en agua varios días, incluso semanas, dependiendo de la temperatura del agua, aunque *C. coli* podría ser más resistente que el *C. jejuni* en condiciones ambientales (Fernández y Hirschfeld, 2009).

Patogenicidad

En los seres humanos el período de incubación varía de 2 a 7 días, desencadenando los siguientes síntomas: decaimiento, anorexia, dolor de cabeza, mareos, dolor de espalda, mialgia, dolor abdominal, fiebre, diarrea y a veces vómitos. La diarrea puede ser intensa, pero los problemas de deshidratación suceden principalmente en los grupos de riesgo, como son niños menores de 5 años, embarazadas y personas de la tercera edad. La fiebre puede alcanzar 40°C. La diarrea aguda dura 2 o 3 días. En humanos susceptibles, la infección por *C. jejuni* puede durar hasta 7 días o más (Roberts y Hobbs, 1997). Aunque tales infecciones son autolimitadas, pueden producirse complicaciones, como bacteremias, desencadenando el síndrome de Guillain-Barré, artritis reactiva o aborto (Stanchi, 2007).

El principal mecanismo de patogenicidad de *Campylobacter spp.* es la invasión de la mucosa intestinal. La invasión de la lámina propia se observa tanto a nivel del intestino delgado como del colon. Se adhieren a la mucosa del intestino delgado

próxima y elaboran una enterotoxina (Roberts y Hobbs, 1997). Su infección produce una notable depleción de las células caliciformes y consecuentemente su presencia se acompaña de abundante mucus en la luz intestinal. Se considera que la colonización del mucus es un paso esencial en la patogénesis de las infecciones por *Campylobacter spp.* (Stanchi, 2007). El resultado es generalmente una enterocolitis inespecífica, que puede incluir los siguientes hallazgos: degeneración y atrofia glandular, pérdida de la producción de mucus, abscesos de las criptas, y ulceración de la mucosa epitelial (Quinn y Markey. 2010).

Situación nacional

En E.E.U.U, registros indican que *C. jejuni* se aísla con mayor frecuencia que *Salmonella spp.* y *Shigella*. En Inglaterra, los aislamientos reportados de *Campylobacter spp.* también superan a los de *Salmonella spp.* y *Shigella* en conjunto. En Chile, la notificación y derivación de *Campylobacter spp.* hacia el laboratorio de referencia es baja, debido principalmente a que no todos los laboratorios estudian este agente por falta de implementación de técnicas de diagnóstico, a pesar que desde el año 1983 *Campylobacter spp.* es agente de vigilancia de laboratorio según lo establece el Reglamento sobre Notificación de Enfermedades Transmisibles de Declaración Obligatoria, DS N°158. En Chile entre el período de los años 2005-2013 se detectaron 462 cepas positivas a *Campylobacter spp.*, provenientes de pacientes con sintomatología sospechosa a *Campylobacter spp.* donde solo 7 (1,5%) provenían de la Región del Bío Bío. El grupo etario con más casos positivos fue de los niños menores a 9 años (30,7%). La especie más frecuente fue *C. jejuni* con un 79,2% de la totalidad de cepas confirmadas (ISP, 2014 b). En el caso de estudios o datos sobre la presencia o detección de *Campylobacter jejuni* en alimentos en Chile, no hay datos oficiales entregados por el ISP o SAG, y en el caso específico de detectar la presencia de *C. jejuni* en carnes de consumo, solo se encuentran datos de estudios realizados en faenadoras de aves tanto para pollos como para pavos donde la presencia de este patógeno es alta, no es así el caso para carnes de bovinos, donde no se han realizado estudios sobre la detección de *C. jejuni* en faenadoras. Existe una relación génica estrecha entre aislados de *C. jejuni* de origen humano y de origen

animal en el país, sugiriendo que estos podrían actuar como una importante fuente de contagio para los chilenos (González-Hein *et al.*, 2013).

Tanto *Campylobacter jejuni* como *Eschericia coli* O157:H7 son patógenos de gran impacto a nivel mundial por la cantidad de brotes relacionados con alimentos contaminados y el impacto económico que causan por la cantidad de personas que presentan cuadros relacionados con estos microorganismos. Pero en el reglamento sanitario chileno de los alimentos su pesquisa no es obligatoria en las diferentes matrices alimentarias en las cuales podrían detectarse, principalmente en carnes y productos cárnicos de destino nacional. Además, en el caso de *C. jejuni*, se sabe que no solo las aves son posibles reservorios de este microorganismo, sino porcinos, ovinos y bovinos. En Chile se ha detectado la presencia de *C. jejuni* en bovinos. A partir de estos antecedentes es que se ha planteado la siguiente hipótesis:



II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

“Se detectará *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* en distintas muestras de canales de bovinos, provenientes de distintas etapas de la línea de procesamiento de faenadoras de carnes nacionales”.

Objetivo general

Evaluar la calidad microbiológica de las canales de bovinos en distintas etapas de la línea productiva en dos faenadoras de la Región del Bío-Bío.

Objetivos específicos

- 1- Detectar *Escherichia coli* O157:H7 mediante técnicas microbiológicas tradicionales de aislamiento, identificación bioquímica, y un Multiplex PCR de genes de patogenicidad, a partir de muestras de canales de bovinos provenientes de la fase de post ducha y post cámara de frío de las 2 plantas faenadoras.
- 2- Detectar *Campylobacter jejuni* mediante técnicas microbiológicas tradicionales de aislamiento, y PCR a partir del gen *mapA*, a partir de muestras de canales de bovinos provenientes de la fase de post ducha y post cámara de frío de las 2 plantas faenadoras.
- 3- Comparar los resultados obtenidos en 2 plantas faenadoras de la Región del Bío Bío, en las diferentes fases de la línea productiva, y de los resultados microbiológicos con los estudios moleculares a partir de análisis estadísticos.

III. MATERIALES Y MÉTODO

Se realizó un muestreo de canales de bovinos en 2 faenadoras de la Región de Bío Bío, obteniendo un total de 544 muestras. Estas muestras fueron obtenidas al azar, el único requisito era que debían ser canales de bovinos. Se analizaron para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 272 canales de bovinos, donde 136 canales fueron muestreadas al momento de post ducha post eviscerado, y 136 canales fueron muestreadas al momento previo de salir de la cámara de frío. Se obtuvieron 2 muestras por canal, una de cuello y otra de pecho. Se realizó un duplicado de este muestreo de canales, para realizar la detección de *Campylobacter jejuni*. Las muestras fueron obtenidas provenientes de 2 faenadoras de la Región de Bío Bío. Previamente a realizar el muestreo se tomaron las medidas de bioseguridad pertinentes propuestas por las faenadoras, con el fin de proteger la calidad microbiológica de los productos y de las muestras, como por ejemplo el uso, desinfección y lavado de botas, utilizar pechera, mascarilla, cofia, casco y un correcto lavado de manos antes de la postura de guantes estériles.

El protocolo de muestreo de canales realizado es el descrito por el Servicio Agrícola Ganadero en su documento general “Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación” (SAG, 2004) con algunas modificaciones.

Al momento del muestreo de cada canal, tanto en el momento de la post ducha como a la salida de la canal de la cámara de frío se obtuvieron muestras de diferentes áreas, las cuales son: Pecho: el muestreo fue en la parte ventral del tórax, sobre los músculos pectorales que rodean el esternón. Cuello: el muestreo fue en la cara lateral dorsal del cuello, sobre el músculo trapecio en la porción cervical. Por cada área analizada de la canal se obtuvo 1 muestra, resultando un total de 4 muestras por canal, 2 muestras (cuello y pecho) para la detección de *Escherichia coli* y 2 muestras (cuello y pecho) para la detección de *Campylobacter jejuni*. Para la toma de muestras se utilizaron hisopos estériles (BBL Culture Swab®). De cada canal bovina seleccionada se tomó una muestra compuesta por áreas de 100 cm² cada una (10 cm x 10 cm) que estuvieron delimitadas por una

plantilla. El hisopo en la superficie de la canal en el área delimitada, en un primer lugar 10 veces verticales y luego 10 veces horizontales. Posteriormente finalizado el muestreo, las muestras se rotularon con el número de la canal, la zona muestreada y la faenadora de la cual se obtuvo la muestra. Inmediatamente después de realizado el muestreo, las muestras se guardaron en un cooler con gel pack, manteniendo la cadena de frío hasta llegar al laboratorio. Las muestras comenzaron a ser procesadas el mismo día que fueron obtenidas.

Análisis microbiológico

Aislamiento de *Escherichia coli*

Muestras de hisopo proveniente de canales

Pre enriquecimiento de las muestras En tubos de ensayo con 5 ml de caldo lauril sulfato triptosa (Merck®), se depositaron los hisopos de forma individual en cada uno de estos. Posteriormente se incubaron a 35°C por 48 horas en la estufa (Wise Cube®).

Aislamiento en agar selectivo Las muestras provenientes del caldo lauril sulfato triptosa se sembraron en placas con agar Mc conkey (Merck®). La incubación fue a 37°C por 24 horas.

Confirmación de *E. coli* Las colonias presuntivas a *E. coli* desde el agar Mac conkey (colonias lactosa positiva) (Merck®), se confirmaron a partir de la batería bioquímica IMVIC.

Identificación bioquímica Las colonias aisladas presuntivas a *E. coli* se incubaron en una batería bioquímica IMVIC, que determina las pruebas del Indol, Rojo metilo, Vogues Proskauer y Citrato.

Para la prueba del Indol se inoculó una colonia presuntiva en caldo triptonado (Merck®). Se incubó por 24h a 37°C, posterior a eso se le adicionó unas gotas del reactivo de Kovacs (Merck®). Si forma un anillo de color rojo en la superficie del tubo indica que es positivo a la presencia del indol y si fuese negativo se formaría un anillo amarillo. *E. coli* es positiva para esta prueba.

Las pruebas del rojo metilo y Vogues–Proskauer se realizan en el mismo tipo de caldo de cultivo. Para la prueba de rojo metilo se inoculó una colonia aislada presuntiva en caldo glucosado por 48h a 37°C en estufa (Wise Cube®). Luego se

le agregaron unas gotas de rojo metilo al cultivo, si cambia a color rojo es positivo a esta prueba, si cambia a amarillo es negativo. *E. coli* es positivo para la prueba de rojo metilo.

Para el caso de la prueba Vogues-Proskauer se repite el mismo procedimiento anterior, pero en este caso al cultivo se le adicionaron unas gotas de alfa-naftol y KOH con agitación, se dejó reposar por 20 minutos, si es positiva a la prueba cambia a un color anaranjado y si no, queda del color del medio incubado. *E. coli* es negativo para Vogues-Proskauer.

La última prueba bioquímica para la confirmación de *E. coli* fue la siembra de una colonia en el agar Citrato de Simmons (Merck®). Se sembró una colonia presuntiva en el agar por 24h a 37°C. Si es positiva a la prueba el agar cambia a un color azul por el indicador de pH azul de bromotimol, y si es negativo no hay un cambio de coloración, quedando el medio de color verde. *E. coli* es negativa a esta prueba. La confirmación de la presencia de *E. coli* O:157:H7, se realizó a partir de un Multiplex PCR para detectar la presencia de genes responsables en la codificación de ciertos factores de patogenicidad específicos.

Multiplex PCR Se realizó un Multiplex PCR para la detección de genes que definen el serotipo O157:H7 (*rfbE* y *fliC*), posterior a este se realizó otro Multiplex PCR para la detección de los genes que codifican los factores de patogenicidad más importantes en como son *stx1*, *stx2* y *eaeA*.

El ADN se obtuvo a partir de muestras presuntivas a *E. coli* según los resultados obtenidos de la batería bioquímica IMVIC. Se traspasó desde el Citrato a un caldo de enriquecimiento Trypticase (Merck®) con glicerol, para la mantención de la muestra a -20°C, hasta el momento del análisis. La extracción y purificación del ADN bacteriano de las muestras se realizará a partir del procedimiento de lisis térmica.

Lisis térmica El procedimiento para la obtención del ADN que se se realizó fue el descrito por Mazurier *et al.* (1992). A partir del tubo eppendorf con caldo de enriquecimiento Trypticase (Merck®) con glicerol, en el cual está el aislado de la bacteria. Se añadió 600ul de suero fisiológico, para luego pasar el tubo por el vortex, posteriormente la muestra se centrifugó a 5000 rpm en la centrifuga por 5

minutos, luego se eliminó el sobrenadante, dejando solo el pellet. Este proceso se repitió por tres veces. Luego se resuspendió el pellet con 500 ul de agua destilada estéril, y las muestras fueron dejadas en el termoloque a 100°C por 10 minutos, posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos. El ADN microbiano extraído se cuantifico con el programa I. control 1.9 infinite 2000 Pro® en el cuantificador de ADN Nanoquam modelo Infinite M200 Pro (Tecan®).

El modelo del termociclador que fue utilizado es XP cycler (Bioer®).

Para la preparación del mix PCR, para las diferentes amplificaciones se utilizó el Mix Takara sapphireamp® fast PCR que contiene todo lo necesario para realizar la amplificación. Las secuencias de los primers que se utilizaron en la detección son los descritos en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de primers utilizados para el Multiplex PCR (Wang *et al.*, 2002).

| Iniciador | Secuencia | Producto de amplificación |
|---------------|-------------------------------|---------------------------|
| <i>stx1-F</i> | 5'- TCTCAGTGGGCGTTCTTATG-3' | 338 pb |
| <i>stx1-R</i> | 5'- TACCCCTCAACTGCTAATA -3' | |
| <i>stx2-F</i> | 5'- GCGGTTTTATTTGCATTAGC -3' | 115pb |
| <i>stx2-R</i> | 5'- TCCCGTCAACCTTCACTGTA -3' | |
| <i>eaeA-F</i> | 5'- ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG -3' | 248pb |
| <i>eaeA-R</i> | 5'- GCCTTCATCATTTGCTTTC -3' | |
| <i>rfbE-F</i> | 5'- CTACAGGTGAAGGTGGAATGG-3' | 327pb |
| <i>rfbE-R</i> | 5'- ATTCCTCTCTTTCCTCTGCGG -3' | |
| <i>fliC-F</i> | 5'- TACCATCGCAAAGCAACTCC-3' | 247pb |
| <i>fliC-R</i> | 5'- GTCGGCAACGTTAGTGATACC-3' | |

Tabla 2. Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción del Multiplex PCR para los genes *fliC* y *rfbE*.

| Reactivo y concentración | Volumen |
|--------------------------|--------------|
| Partidor <i>fliC</i> F | 0.5 μ l |
| Partidor <i>fliC</i> r | 0,5 μ l |
| Partidor <i>rfbE</i> F | 0,5 μ l |
| Partidor <i>rfbE</i> R | 0.5 μ l |
| ADN | 1 μ l |
| Mix Takara | 12.5 μ l |
| Agua destilada | 9,5 ul |
| Total de Mix PCR | 25 ul |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción del Multiplex PCR para los genes *stx-1*, *stx-2* y *eaeA*.

| Reactivo y concentración | Volumen |
|--------------------------|-------------|
| Partidor <i>stx-1</i> F | 0,5 μ l |
| Partidor <i>stx-1</i> R | 0,5 μ l |
| Partidor <i>stx-2</i> F | 0,5 μ l |
| Partidor <i>stx-2</i> R | 0,5 μ l |
| Partidor <i>eaeA</i> F | 0,5 μ l |
| Partidor <i>eaeA</i> R | 0,5 μ l |
| ADN | 1 ul |
| Takara Master Mix | 12, 5 ul |
| Agua destilada | 8,5 ul |
| Total de Mix PCR | 25 ul |

Fuente: Elaboración propia.

El protocolo a utilizar para lograr la amplificación de los genes detectados es el recomendado por el comerciante del mix Takara sapphireamp® fast PCR con

algunas modificaciones. Está descrito en la Tabla 4, es el utilizado para los diferentes PCR realizados en esta investigación.

Tabla 4. Protocolo de amplificación de la técnica Multiplex PCR.

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Nº de ciclos |
|-------------------|------------------|-------------|--------------|
| Desnaturalización | 94(°C) | 1 minuto | 1 |
| Desnaturalización | 94(°C) | 30 segundos | 35 |
| Alineamiento | 58(°C) | 30 segundos | 35 |
| Extensión | 72(°C) | 75 segundos | 35 |
| | 72 (°C) | 10 minutos | 1 |

Fuente: Elaboración propia.

Electroforesis El gel a utilizar para desarrollar la electroforesis fue un gel de Agarosa al 1%. Para la preparación del gel se necesita 0.8 g de agarosa (Merck®) más 35 ml de buffer TAE al 1% (Santa Cruz Biotechnology Inc.®) y se agrega 1,8 µl de Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotum®) que cumple con teñir el ADN.

Se sembraron 5 µl de ADN y 2 µl del marcador de peso molecular (Maestrogen®) independiente del volumen de la cámara a utilizada. La fuente de poder Voltronix (NYX Technix®) funcionó a 80V por 75 minutos.

Los resultados se visualizaron en el programa Enduro GDS de Labnet®.

Detección microbiológica *Campylobacter jejuni*

La metodología utilizada para la detección microbiológica para *C. jejuni* es la descrita por la ISO 10272-1 (ISO,2017).

Enriquecimiento en medio selectivo En tubos de ensayo que contenían 5 ml de caldo Bolton (Oxoid®), se depositaron los hisopos correspondientes a las muestras. Las muestras se incubaron en condiciones de microaerofilia a dos temperaturas, en un principio a 37°C durante un período de 4 a 6 horas y luego a 41,5°C por 44 horas. El ambiente de microaerofilia se obtuvo a partir de que los tubos fueron incubados dentro de una cámara de microaerofilia.

Aislamiento en agar selectivo El agar que se utilizó fue el agar selectivo agar Karmali (Oxoid®). Posteriormente las placas se incubaron (estufa Wise Cube®) en condiciones de microaerofilia a 41,5°C por 44 horas.

Confirmación de los aislados

Confirmación microbiológica y bioquímica Las colonias que crecieron con una morfología presuntiva a *Campylobacter jejuni* se les realizó una tinción Gram y una prueba de oxidasa, donde si el resultado era bacilos Gram negativo con una morfología característica de esta bacteria (curvadas, similares a una letra “S”), y positiva a la prueba de la oxidasa se procedió a realizar un PCR tradicional para confirmar el resultado presuntivo a *Campylobacter jejuni*.

PCR tradicional El tipo de PCR realizado para la detección del gen *mapA* fue un PCR tradicional. El procedimiento de extracción del ADN es el mismo descrito anteriormente para el Multiplex PCR al igual que la cuantificación del ADN. El gen a detectar específico para *Campylobacter jejuni* es el gen *mapA* que posee 589pb y es encargado de la expresión de la proteína A de membrana.

La extracción del ADN bacteriano se realizó a partir de colonias presuntivas a *Campylobacter jejuni*, del agar Karmali traspasadas a un caldo de enriquecimiento Tripticasa (Merck®) con glicerol, para la mantención de la muestra a -20°C, hasta el momento del análisis. Se utilizó el mismo procedimiento de extracción descrito anteriormente.

Los partidores a utilizados para la reacción son los de la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencia de los primers del gen *mapA* para realizar la detección por PCR tradicional (Singh *et al.*, 2011).

| Iniciador | Secuencia | Producto de amplificación |
|---------------|---------------------------------|---------------------------|
| <i>mapA</i> F | 5'-CTATTTTATTTTGGAGTGCTTGTG-3' | 589 pb |
| <i>mapA</i> R | 5'-GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA-3' | |

La Tabla 6 muestra las concentraciones y volúmenes para obtener el mix de PCR para el análisis.

Tabla 6. Concentraciones y volúmenes de reactivos a utilizar en la técnica PCR tradicional para detección del gen *mapA*.

| Reactivo y concentración | Volumen | |
|------------------------------|---------|----|
| Partidor <i>mapA</i> F | 0,5 | µl |
| Partidor <i>mapA</i> R | 0,5 | µl |
| ADN | 1 | µl |
| Takara Master Mix | 12.5 | ul |
| Agua destilada | 9.5 | ul |
| Volumen final de la reacción | 25 | µl |

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla 7 se puede observar el protocolo utilizado para poder obtener la amplificación correcta del gen *mapA*.

Tabla 7. Protocolo de amplificación de la técnica PCR tradicional para el gen *mapA*.

| Paso | Temperatura (°C) | Tiempo | Nº de ciclos |
|---------------------------|------------------|-------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94(°C) | 1 minuto | 1 |
| Desnaturalización | 95(°C) | 30 segundos | 35 |
| Alineamiento | 58(°C) | 30 segundos | 35 |
| Extensión | 72(°C) | 75 segundos | 35 |
| Extensión final | 72 (°C) | 10 minutos | 1 |

Fuente: Elaboración propia.

Electroforesis El procedimiento para la realización del gel como de la misma electroforesis son los descritos anteriormente en el Multiplex PCR para la detección de *E. coli* O157:H7.

Todo el análisis microbiológico de las muestras se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Campus Chillán.

Tanto el Multiplex PCR, el PCR tradicional y las electroforesis se realizaron en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, sección molecular, del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción, Campus Concepción.

Interpretación de los resultados

Si cualquiera de las muestras de la canal (cuello o pecho) sin importar en la fase productiva que fueron obtenidas (post ducha o post cámara de frío), resulta positiva tanto para el diagnóstico presuntivo (microbiológico y bioquímico) como para el diagnóstico molecular (PCR), la canal será positiva para efectos de este trabajo, sin la necesidad de que ambas muestras obtenidas de la misma canal entreguen un mismo resultado positivo. Esto es tanto tomado en cuenta tanto para el análisis de *Escherichia coli* O157:H7, como para el análisis de *Campylobacter jejuni*.



IV. RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron ordenados en tablas, por cada faenadora y fase de la línea productiva, donde se observaron los porcentajes de positividad tanto para *Escherichia coli* O157:H7 y *Campylobacter jejuni* obtenidos en los distintos análisis.

Para el análisis y comparación de los resultados positivos por faenadora, fase de la línea productiva y zona de muestra se realizó un análisis de Chi cuadrado y C de Contingencia, los datos se distribuirán en Tablas MxN.

Se realizó un análisis para evaluar el real nivel de concordancia entre los resultados obtenidos por técnicas tradicionales de aislamiento microbiológico con técnicas moleculares, como un Multiplex PCR para la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 y PCR tradicional para *Campylobacter jejuni*, aplicando la índice kappa de Cohen, a partir de los resultados obtenidos por el análisis de las las muestras de las canales.

Tabla 8. Cepas positivas a *Escherichia coli* según fase de la cadena productiva y zona de muestreo.

| | Post ducha | | | | Post frío | | | | |
|-------------------|------------|------|-----------|-----|-------------------|-----------|------|-----------|-----|
| | IMVIC | | PCR | | IMVIC | | PCR | | |
| Muestra | Positivos | % | Positivos | % | Muestra | Positivos | % | Positivos | % |
| Cuello (n=136) | 43 | 31,6 | 3 | 2,2 | Cuello (n=136) | 28 | 20,5 | 2 | 1,4 |
| Pecho (n=136) | 54 | 39,7 | 4 | 2,9 | Pecho (n=136) | 31 | 22,7 | 2 | 1,4 |
| Total (n=272) | 97 | 35,6 | 7 | 2,5 | Total (n=272) | 59 | 21,6 | 4 | 1,4 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 9. Total de cepas positivas a *Escherichia coli* según zonas de muestreo.

| Muestra | IMVIC | | PCR | |
|-------------------|-----------|------|-----------|-----|
| | Positivos | % | Positivos | % |
| Cuello (n=272) | 71 | 26,1 | 5 | 1,8 |
| Pecho (n=272) | 85 | 31,2 | 6 | 2,2 |
| Total (n=544) | 156 | 28,6 | 11 | 2,0 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 10. Canales de bovinos positivas a *Escherichia coli* por faenadora.

| Canales | Faenadora A | | | | Faenadora B | | | |
|-------------------------------|-------------|------|-----------|-----|-------------|------|-----------|-----|
| | IMVIC | | PCR | | IMVIC | | PCR | |
| | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % |
| Post ducha (n=68) | 39 | 57,3 | 5 | 7,3 | 17 | 25,0 | 2 | 2,9 |
| Post frío (n=68) | 22 | 32,3 | 3 | 4,4 | 13 | 19,1 | 1 | 1,4 |
| Total faenadora (n=136) | 61 | 44,8 | 8 | 5,8 | 30 | 22,0 | 3 | 2,2 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 11. Canales de bovinos positivas a *Escherichia coli* por fase de la cadena productiva

| Canales | IMVIC | | PCR | |
|-----------------------|-----------|------|-----------|-----|
| | Positivos | % | Positivos | % |
| Post ducha (n=136) | 56 | 41,1 | 7 | 5,1 |
| Post frío (n=136) | 35 | 25,7 | 4 | 2,9 |
| Total (n=272) | 91 | 33,4 | 11 | 4,0 |

Fuente: Elaboración propia.

A partir del análisis de la totalidad de muestras obtenidas (n=544) provenientes de ambas faenadoras, se logró aislar 156 cepas positivas (28,6%) a *Escherichia coli*, por medio de métodos tradicionales de detección microbiológicos y bioquímicos.

De las 272 canales analizadas, 91 canales fueron positivas a *Escherichia coli* (33,4%) por métodos tradicionales de detección. En algunos casos se pudo aislar *E. coli* en ambas zonas de muestreo.

Se realizó PCR para la detección de ciertos genes de patogenicidad con la finalidad de determinar si las cepas positivas a *E. coli* pertenecían al serotipo 0157 H:7. Los resultados arrojaron 11 cepas positivas (2%) del total de muestras recolectadas (n=544). Con respecto al total de canales, 11 fueron positivas (4%) del total analizadas en las distintas fases de la cadena productiva (n=272).

Tabla 12. Canales de bovinos positivas a *Escherichia coli* O 157 H:7 del total de canales positivas a *Escherichia coli* (n=91).

| Muestra | PCR | | | |
|----------------------|----------------------|------|------------------------|------|
| | Positivos O157:H7 | % | Positivos a toxinas | % |
| Post ducha (n=56) | 7 | 12,5 | 4 | 57,1 |
| Post frío (n=35) | 4 | 11,4 | 2 | 50 |
| Total (n= 91) | 11 | 12,0 | 6 | 54,5 |

Fuente: Elaboración propia.

Luego de la realización del Multiplex PCR, se determinó que 11 de las 91 canales positivas a *E. coli* fueron positivas al serotipo O157:H7 (12%), debido a que hubo amplificación de los genes *fliC* y *rfbE*. Luego nuevamente se realizó un Multiplex PCR para determinar si estas cepas tenían los genes para poder codificar las toxinas *stx1*, *stx2* y *Tyr*. De las 11 cepas O157:H7, 6 codificaban los genes para dichas toxinas (54,5%).

Tabla 13. Cepas positivas a *Campylobacter jejuni* según fase de la cadena productiva y zona de muestreo.

| Muestra | Canales post ducha | | | | Canales post frío | | | | |
|-------------------|------------------------|-----|-----------|---|------------------------|---|-----------|-----|---|
| | Pruebas Bioquímicas | | PCR | | Pruebas Bioquímicas | | | PCR | |
| | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % | |
| Cuello (n=136) | 6 | 4,4 | 0 | 0 | Cuello (n=136) | 4 | 2,9 | 0 | 0 |
| Pecho (n=136) | 9 | 6,6 | 0 | 0 | Pecho (n=136) | 3 | 2,2 | 0 | 0 |
| Total (n=272) | 15 | 5,5 | 0 | 0 | Total (n=272) | 7 | 2,5 | 0 | 0 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14. Total de cepas positivas a *Campylobacter jejuni* según zona de muestreo.

| Muestra | IMVIC | | PCR | |
|-------------------|-----------|-----|-----------|---|
| | Positivos | % | Positivos | % |
| Cuello (n=272) | 10 | 3,6 | 0 | 0 |
| Pecho (n=272) | 12 | 4,4 | 0 | 0 |
| Total (n=544) | 22 | 4,0 | 0 | 0 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 15. Canales de bovinos positivas a *Campylobacter jejuni* por faenadora.

| Canales | Faenadora A | | | | Faenadora B | | | |
|-------------------------------|---------------------|------|-----------|---|---------------------|-----|-----------|---|
| | Pruebas Bioquímicas | | PCR | | Pruebas Bioquímicas | | PCR | |
| | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % | Positivos | % |
| Post ducha (n=68) | 11 | 16,1 | 0 | 0 | 4 | 5,8 | 0 | 0 |
| Post frío (n=68) | 5 | 7,3 | 0 | 0 | 2 | 2,9 | 0 | 0 |
| Total faenadora (n=136) | 16 | 11,7 | 0 | 0 | 6 | 4,4 | 0 | 0 |

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 16. Canales de bovinos positivas a *Campylobacter jejuni* según fase de la cadena productiva.

| Muestra | Pruebas Bioquímicas | | PCR | |
|-----------------------|---------------------|------|-----------|---|
| | Positivos | % | Positivos | % |
| Post ducha (n=136) | 15 | 11,0 | 0 | 0 |
| Post frío (n=136) | 7 | 5,1 | 0 | 0 |
| Total (n= 272) | 22 | 8,0 | 0 | 0 |

Fuente: Elaboración propia.

Se analizaron 544 muestras provenientes de 272 canales obtenidas a partir de las 2 faenadoras. Se logró aislar 22 cepas positivas por medio de determinación microbiológica y bioquímica (4%). Al mismo tiempo fueron 22 canales las que resultaron positivas a *C. jejuni* (8%) por determinación tradicional microbiológica y bioquímica, ya que de estas se logró aislar cepas positivas en la muestra de cuello o de pecho, pero no en ambas. No hubo muestras que amplificaran frente al gen *mapA* a partir de un PCR tradicional.

Amplificaciones PCR

Las siguientes imágenes poseen las amplificaciones en los geles de agarosa al 1%, de los 2 PCR Multiplex realizados (para la amplificación de los genes *fliC* y *rfbE* y para los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*).

Cada banda del marcador de peso molecular indica 100 pares de base.

Los tamaños de los genes amplificados son los siguientes: *fliC* 247pb, *rfbE* 327pb, *stx1* 338pb, *stx2* 115pb y *eaeA* 248 pb.

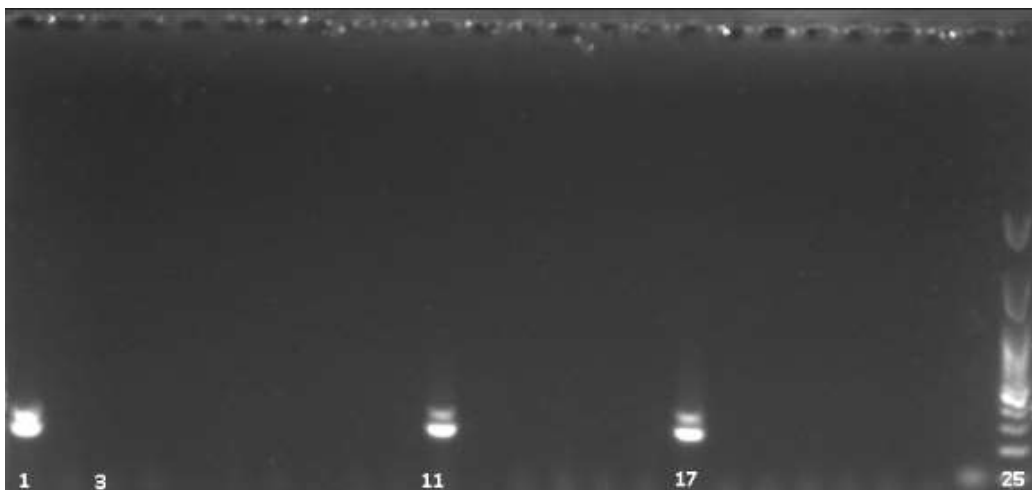


Figura 1. Gel de agarosa de 25 carriles al 1% correspondiente al PCR Multiplex para los genes *fliC* y *rfbE*. 1. Control positivos. 3. Muestra negativa. 11 y 17. Muestras positivas, con amplificación de 2 bandas correspondientes a los genes *fliC* y *rfbE*. 25. Marcador de peso molecular. Fuente: Elaboración propia.

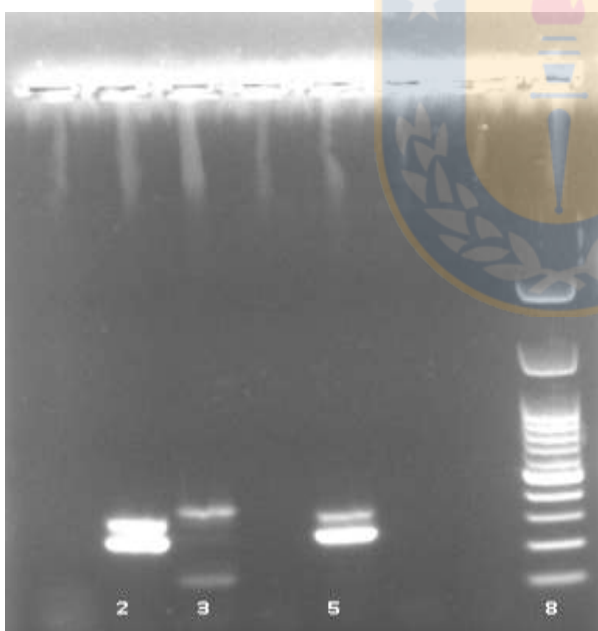


Figura 2. Gel de agarosa al 1% de 8 carriles correspondiente a PCR Multiplex para los 5 genes a detectar. 2. Control positivo para los genes *fliC* y *rfbE*. 3. Muestra positiva para los genes *stx 1*, *stx2* y *eaeA*, hay amplificación de 3 bandas. 5. Muestra positiva para los genes *fliC* y *rfbE*. 8. Marcador de peso molecular. Fuente: Elaboración propia.

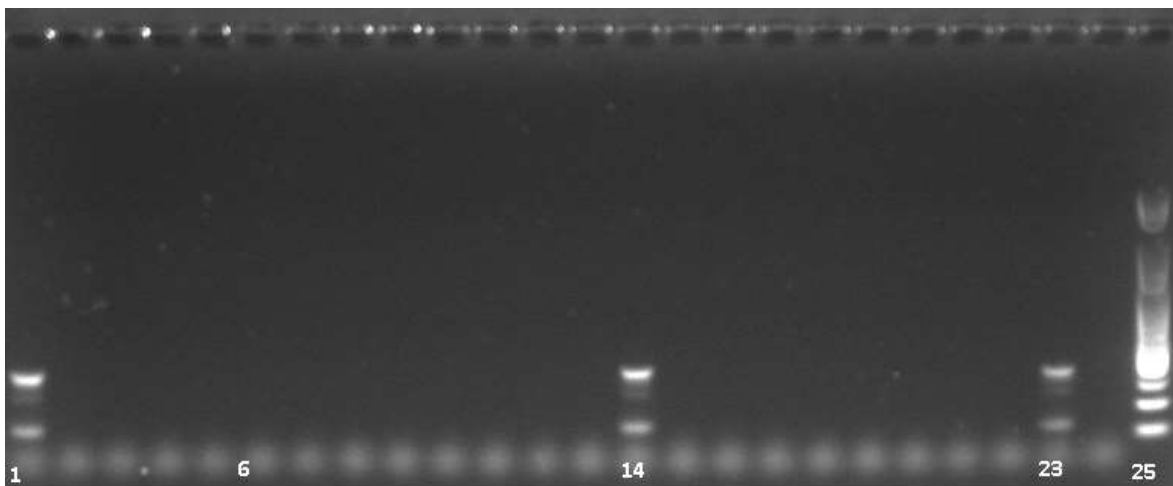


Figura 3. Gel de agarosa al 1% de 25 carriles, para PCR Multiplex de los genes *stx1*, *stx2* y *eaeA*. 1. Control positivo. 6. Muestra negativa. 14 y 23. Muestras positivas con amplificación de las 3 bandas correspondientes a los 3 genes a detectar. 25. Marcador de peso molecular. Fuente: Elaboración propia.

Análisis estadístico

Se realizaron tablas de contingencia para los resultados obtenidos a partir del análisis tradicional microbiológico y molecular. Donde en cada una se analizó Chi cuadrado (si $p < 0,05$ el resultado es significativo), el coeficiente de contingencia V de Cramer, para determinar si hay una relación significativa entre los resultados obtenidos (un valor menor a 0,10 el grado de relación es despreciable y 1 es el máximo), por último también se analizó el índice de concordancia *kappa* de Cohen para determinar si la concordancia obtenida se puede atribuir al azar o no, los valores obtenidos para esto son el acuerdo observado, que indica la concordancia de los resultados comparados sin quitar el azar y el valor *kappa*, además se obtendrá el *kappa* mínimo y máximo. Al obtener un *kappa* igual o mayor a 0,40 ya se habla de un acuerdo aceptable.

El nivel de confianza utilizado es del 95%.

Las variables a analizar son los resultados positivos por fase de la línea productiva, comparación entre las dos faenadoras, y los resultados obtenidos por zona de muestreo.

Los datos fueron analizados por los softwares de estadística Infoestat versión 2008 y Epidat 4.2.

Tabla 17. Canales positivas a *E. coli* por determinación microbiológica en las distintas faenadoras.

| Resultados canales | | | |
|--------------------|-----------|-----------|-------|
| Faenadoras | Positivos | Negativos | Total |
| Faenadora A | 61 | 75 | 136 |
| Faenadora B | 30 | 106 | 136 |
| Total | 91 | 181 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,0001; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,17. El acuerdo observado es de 0,61. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = 0,22 [-0,2392, 0,3214]$.

Tabla 18. Canales positivas a *E.coli* O157:H7 por determinación molecular según Faenadora.

| Resultados canales | | | |
|--------------------|-----------|-----------|-------|
| Faenadoras | Positivos | Negativos | Total |
| Faenadora A | 8 | 128 | 136 |
| Faenadora B | 3 | 133 | 136 |
| Total | 11 | 261 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,1238; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,07. El acuerdo observado es de 0,51. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = 0,03 [-0,3172, 0,2181]$.

Tabla 19. Canales positivas a *E. coli* por determinación microbiológica en las distintas fases de la cadena productiva.

| Etapa Faena | Resultados canales | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | Total |
| Post ducha | 56 | 80 | 136 |
| Post frío | 35 | 101 | 136 |
| Total | 91 | 181 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,0070; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,12. El acuerdo observado es de 0,57. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = 0,15 [-0,2681 - 0,2826]$.

Tabla 20. Canales positivas a *E.coli* O157:H7 por determinación molecular en las distintas fases de la cadena productiva.

| Etapa Faena | Resultados canales | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | Total |
| Post ducha | 7 | 129 | 136 |
| Post frío | 4 | 132 | 136 |
| Total | 11 | 261 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,3558; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,04. El acuerdo observado es de 0,51. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = 0,022 [-0,3236, 0,2108]$.

Tabla 21. Canales positivas a *E.coli* por determinación microbiológica según zona de muestreo.

| Tipo de muestra | Resultados canales | | Total |
|-----------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | |
| Cuello | 71 | 65 | 136 |
| Pecho | 85 | 51 | 136 |
| Total | 156 | 116 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,0861; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,07. El acuerdo observado es de 0,44. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = -0,10 [-0,3807, 0,1543]$.

Tabla 22. Canales positivas a *E.coli* O157:H7 por determinación molecular según zona de muestreo.

| Tipo de muestra | Resultados canales | | Total |
|-----------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | |
| Cuello | 5 | 131 | 136 |
| Pecho | 6 | 130 | 136 |
| Total | 11 | 261 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,7582; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,01. El acuerdo observado es de 0,49. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = -0,0074 [-0,3366, 0,1965]$.

Tabla 23. Canales positivas a *Campylobacter jejuni* por determinación microbiológica en las distintas faenadoras.

| Faenadoras | Resultados canales | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | Total |
| Faenadora A | 16 | 120 | 136 |
| Faenadora B | 6 | 130 | 136 |
| Total | 22 | 250 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,0262; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,10. El acuerdo observado es de 0,53. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = 0,07 [-0,3014, 0,2372]$.

Tabla 24. Canales positivas a *Campylobacter jejuni* por determinación microbiológica en las distintas fases de la cadena productiva.

| Etapa faena | Resultados canales | | |
|-------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | Total |
| Post ducha | 15 | 121 | 136 |
| Post frío | 7 | 129 | 136 |
| Total | 22 | 250 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,0752; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,08. El acuerdo observado es de 0,52. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = 0,05 [-0,3077, 0,2295]$.

Tabla 25. Canales positivas a *Campylobacter jejuni* por determinación microbiológica en las distintas zonas de muestreo.

| Tipo de muestra | Resultados canales | | |
|-----------------|--------------------|-----------|-------|
| | Positivos | Negativos | Total |
| Cuello | 10 | 126 | 136 |
| Pecho | 12 | 124 | 136 |
| Total | 22 | 250 | 272 |

Fuente: Elaboración propia.

Chi Cuadrado Pearson 0,6565; Coeficiente de contingencia V de Cramer 0,02. El acuerdo observado es de 0,49. El índice *kappa* de Cohen que se obtiene de esta comparación es: $k = -0,01 [-0,3399, 0,1930]$.



V. DISCUSIÓN

Se decidió realizar el muestreo en canales de bovinos porque, los rumiantes domésticos son portadores asintomáticos de *E. coli* O157:H7, ya que las toxinas no causan lesión vascular, ni enfermedad en los rumiantes, catalogándolos como portadores sanos, siendo el principal reservorio para infecciones en humanos (Mainil, 2013). Al mismo tiempo se escogió como muestra las canales para la detección, debido a que las carnes son fácilmente alterables, sobre todo si están procesadas, pues tienen un pH entre 5,1 y 5,6, adecuado para el desarrollo de la mayoría de los microorganismos, y un potencial de reducción que permite el crecimiento de los anaerobios en profundidad y los aerobios en la superficie, y su actividad de agua 0,99 aw (Jeantet *et al.*, 2006).

Con respecto a los resultados obtenidos en las distintas fases de la línea productiva, donde se obtuvieron mayores porcentajes de positividad de las cepas aisladas fue en el momento de la post ducha (n=272), en el caso de *E. coli*, 97 cepas (35,6%) fueron positivas por métodos tradicionales, y 7 (2,5%) por PCR, en comparación de los resultados obtenidos al momento del post cámara de frío (n=272), donde 59 cepas (21,6%) fueron detectadas por métodos tradicionales y 4 (1,4%) positivas por PCR. Con respecto a las cepas positivas a los genes de patogenicidad 4 (1,4%) fueron obtenidas en la post ducha y 2 (0,7%) post cámara de frío. Esto indica mayores porcentajes de positividad en muestras posteriores a la ducha de las canales, en comparación de las obtenidas al momento de la salida de la cámara de frío. Con respecto a la zona de muestreo, las muestras obtenidas del pecho para ambas fases de la cadena productiva fueron las que obtuvieron mayores porcentajes de positividad (31,2%) en comparación con las muestras de cuello (26,1%) para cepas positivas a *E. coli* por métodos tradicionales, al igual que los resultados obtenidos por PCR, ya que se detectó un mayor porcentaje de positividad en las muestras provenientes del pecho (2,2%), en comparación con las muestras de cuello (1,8%).

Por último, al comparar resultados de canales positivas por identificación bioquímica entre la faenadora A y la faenadora B, la primera entregó mayor cantidad de canales positivas 61 (22,4%), en comparación con la B que obtuvo 30

(11,0 %), lo mismo ocurrió con los resultados obtenidos por PCR, ya que en la faenadora A se detectaron 8 canales positivas y en la B 3 canales positivas.

Los resultados obtenidos anteriormente descritos podrían explicarse por distintas razones, por ejemplo, el tratamiento con frío que se realiza en las canales al estar la cámara de frío, ya que la rápida reducción de la temperatura en la superficie de la carcasa puede evitar el crecimiento microbiano y extender la vida útil del producto (Nychas *et al.*,2008), al mismo tiempo la fase más propensa de la línea productiva a que surja una contaminación de las canales, es en el momento de la eliminación de la piel (Visvalingam y Holley,2018) que es lo anterior a la post ducha. Otro factor importante que está implicado en la reducción de microorganismos patógenos sobre las canales es la aplicación de ácido láctico 2% el cual sucede en el momento previo a que las canales entren en la cámara de frío. La aplicación específica de este producto suele reducir las enterobacterias y otros microorganismos patógenos, si se aplican dentro de las dos horas después del servicio, cuando las bacterias Gram negativas todavía no se han fijado a las canales. Se han realizado trabajos que comprueban la eficacia en la reducción de microorganismos patógenos en las canales (Castillo *et al.*,1998, Hardin *et al.*,1997, citados por Valencia y Acero,2013); (Kalchayanadad *et al.*, 2018); (Valencia y Acero,2013). Esos procedimientos que se realizan antes de que la canal pase a la cámara de frío, más el efecto que podría producir mantener la canal a bajas temperaturas, influiría en mayores porcentajes de obtención de cepas positivas a *E. coli* al momento de la toma de muestra posterior a la ducha en comparación al momento posterior a la cámara de frío. En el caso de los resultados obtenidos por faenadora, la A en todos los ítems analizados obtuvo mayores porcentajes de positividad en comparación de la B, puede atribuirse a que la faenadora A mantenían menos días las canales en la cámara de frío antes del despacho a destino (2 días), en comparación de la B (1 a 2 semanas aproximadamente), que la canal pasaba más una mayor cantidad de días en la cámara, al mismo tiempo la A era un establecimiento menos tecnificado en comparación con la faenadora B.

En el caso particular de *C. jejuni*, se detectaron solo 22 canales (8,0%) por métodos tradicionales microbiológicos, y ninguna amplificó al realizar PCR

tradicional para la detección del gen *mapA*, unas de las razones que pudieron contribuir con estos resultados es el tratamiento de la canal con frío al ingresar a la cámara de frío a 4°C, reduciendo la cantidad posible a detectar de este patógeno sobre las canales, dado que *C. jejuni* no tiene mucha tolerancia a las bajas temperaturas. El tiempo que pasaban las canales en la cámara depende de cada faenadora, en la faenadora A estaban 2 días antes de entregar la canal a las carnicerías, se detectaron 16 canales como presuntivas (5,8%), en la B se obtuvieron 6 canales (2,2%), en la cual pasaban 1 a 2 semanas aproximadamente las canales en la cámara de frío antes de ser llevadas a destino. Maziero *et al.*, (2010) en un estudio probó la viabilidad de *C. jejuni* a 4°C y -20°C, al inocularla en canales de aves, comprobándose que pudo sobrevivir en ambas temperaturas, pero con una disminución en el conteo, debido a que comenzó el experimento con una carga en promedio de 3.08 log₁₀ UFC/g y a los 7 días a 4°C 53% de las muestras inoculadas fueron positivas con un promedio fue de 1,19 log₁₀ UFC/g, a -20°C durante 28 días el 36.6% de las muestras fueron positivas con un recuento promedio de 0.75 Log₁₀ UFC/g, esto comprueba que sí se ve afectada por el frío, reduciendo considerablemente la cantidad de microorganismos. Otra característica de *C. jejuni* es la de su forma viable pero no cultivable (VNC), la cual a bajas temperaturas se puede desencadenar, impidiendo su crecimiento en medios selectivos (Singh *et al.*, 2011). Al ser una bacteria frágil se ve afectada por cambios bruscos de temperatura, disminuyendo la posibilidad de poder ser detectada (OIE,2004), como el que sucede al ingresar rápidamente las canales a la cámara de frío desde que sucede el servicio. Muchos factores pueden causar lesiones o la muerte de las células de *C. jejuni*, como la nucleación del hielo, la deshidratación o el estrés oxidativo (Maziero *et al.*,2010). En el estado VNC, si se consume algún producto contaminado con este agente igual podría desencadenar un cuadro clínico, pero al ser sensible al Ph gástrico se debe ingerirse un inoculo de 10⁴ para que se produzca la infección, sin embargo, en algunos casos es altamente infectante, provocando la infección con dosis del orden de 500 microorganismos (Farace y Viñas,2007).

Las canales como cualquier producto alimenticio fresco poseen una microbiota

inofensiva para el consumidor, existen estudios que indican que un alimento con una carga de 10^5 células/g de microbiota inofensiva son menos propensos a permitir la proliferación de un número bajo de patógenos en una carga de 10^3 células/g (Jay, 1994). Las cuales podrían contribuir al control de microorganismos patógenos, esto podría suceder en el caso de la superficie de las canales muestreadas, contribuyendo a la baja prevalencia detectada. Tshabalala *et al.*, (2012) inoculó en canales de bovinos cepas de *E. coli* O157:H7 y *Lactobacillus plantarum* (microorganismo que se puede detectar en matrices alimentarias como la carne) al mismo tiempo, en cantidades similares y diferentes, hubo un efecto inhibitorio directo sobre la detección de *E. coli* O157:H7 en la carne, disminuyó a la primera semana, y a la tercera ya no se pudo recuperar, todo a 4°C, esto sucedió al inocular una cantidad doble de *L. plantarum* en comparación de *E. coli* O157:H7, también se realizó este experimento con *Pseudomonas fluorescens*, esta última no ejerció un efecto inhibitorio directo sobre *E. coli* O157:H7. *L. plantarum* produce plantaricina, una bacteriocina con actividad inhibitoria hacia las bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluidos los patógenos de los alimentos, pudiendo afectar la detección de *E. coli* O157:H7. El efecto principalmente de diferentes tipos de *Lactobacillus spp.*, como controladores de patógenos, en este caso de la carne, ha sido estudiado, comprobando que tienen un efecto directo al evitar que se desarrollen y crezcan exponencialmente microorganismos patógenos en la carne (Franz *et al.*, 2007); (Poppi *et al.*, 2015); (Tshabalala *et al.*, 2012). Al mismo tiempo está documentado que los *Lactobacillus spp.*, tienen un efecto sobre el crecimiento de *C. jejuni* (Poppi *et al.*, 2015).

En la actualidad se han descrito distintos factores que pueden determinar la susceptibilidad del ganado bovino a la colonización, el crecimiento y/o la supervivencia de microorganismos patógenos, en este caso más específicamente de *E. coli* O157:H7. Un factor sería la edad del bovino, en estudios en los que se hizo una distinción entre terneros pre y pos destete, los animales pre destete albergaron cepas STEC con menos frecuencia que los animales en todas las otras clases de edad, mientras que los animales pos destete presentaron la mayor prevalencia de cepas STEC (Baltasar *et al.*, 2014). La dieta de los bovinos también

influiría, Franz *et al.*, (2007), estudio la prevalencia y permanencia de *E. coli* O157:H7 en los estiércoles de bovinos, llegando a la conclusión de que principalmente el pH y el contenido de fibra del estiércol fueron los principales determinantes de la supervivencia más larga de la bacteria en los cuales tenían un pH más bajo, con un menor contenido de fibra. Esto es debido a que *E. coli* O157:H7 posee varios sistemas para poder sobrevivir a la exposición a pH bajo. Además, el nitrógeno orgánico podría convertirse a amoníaco a un pH más alto. Se ha demostrado que el amoníaco puede ser tóxico para *E. coli* O157:H7 y puede causar una reducción significativa en el número (Himathongkham *et al.*,1999). Otra variable que podría estar involucrada, pero anterior al servicio es el transporte y manejo anterior del animal, ya que la eliminación de la bacteria podría incrementar en animales estresados y cansados, aspecto que se ha podido evidenciar durante períodos de transporte prolongados (Romero *et al.*,2010). Además, un estudio descubrió que existen bovinos que poseen una mayor carga y al mismo tiempo eliminan una gran cantidad por medio de sus heces de *E. coli* O157:H7, la cual era $> 10^4$ UFC/g, siendo catalogados como “superdotados”, estos podrían alcanzar el 9% de los bovinos, considerándose como la principal fuente de contaminación (Paquette *et al.*,2018).

La técnica, y los protocolos utilizados para la detección de *E. coli* O157:H7 y *C. jejuni* en este estudio, también podrían ser factores que influyeron en las bajas prevalencias detectadas. Por ejemplo, para la detección de *E. coli* se siguió el Instructivo técnico para recuentos de *Escherichia coli* mediante método tradicional de cultivo AOAC Official metoh 96624, donde se utilizó caldo EC como medio de enriquecimiento. Amagliani *et al.*, (2018) realizaron un estudio donde evaluaban diversos medios de cultivos, para determinar cuál entregaba las mejores condiciones para la multiplicación de cepas STEC a partir de muestras de carnes inoculadas con las cepas control. Las mejores condiciones para el crecimiento y posterior determinación fueron proporcionadas por mBPWp + ACV (Agua peptonada modificada con piruvato y acriflavina), siendo esto un aliciente para poder utilizar este medio de enriquecimiento en futuros trabajos, pudiendo quizás detectar una mayor cantidad de este tipo de cepas, al estar comprobado que sería

el medio de enriquecimiento ideal para lograr una mejor detección en matrices alimentarias, principalmente en la carne. Con respecto al protocolo instaurado para la técnica PCR, para la extracción del ADN se utilizó la técnica de la lisis térmica y no algún kit comercial para la obtención del ADN, pudiendo no obtener en algunos casos cantidades, o calidades mínimas para lograr una amplificación ideal o algún tipo de amplificación de algún gen. Además de una buena calidad y cantidad de ADN, al utilizar un PCR Múltiplex, los cebadores deben tener temperaturas similares de alineamiento, si esto no fuera así, puede lograr una amplificación desigual, logrando productos apenas visibles (Wang *et al.*,2002), esto podría haber sucedido con la amplificación del gen *eaeA*, el cual no es visible fácilmente en los geles de electroforesis a diferencia de los genes *stx1* y *stx2* que amplificaron bandas totalmente visibles. Una solución podría ser cambiar proporciones de los cebadores utilizados en el mix de PCR, aumentando la concentración de cebadores para los loci "débiles" y una disminución en la concentración de cebador para los loci "fuertes" (Wang *et al.*,2002). Como fue mencionado anteriormente, hay una cantidad mínima ideal de ADN para lograr amplificaciones satisfactorias, la cual sería de 20ng (Bolivar *et al.*,2014), el cual no fue alcanzado en algunas muestras presuntamente positivas a *C. jejuni*, esto podría atribuirse a la fragilidad de la bacteria para sobrevivir a bajas temperaturas al momento de la toma de muestra, y también al almacenamiento de esta antes de iniciar la extracción del ADN, en algunos casos pasaron meses para realizar el PCR (estuvieron a -20°C en un caldo de enriquecimiento con glicerol).

Se detectaron 11 canales positivas (4,0%) para los genes *fliC* y *rfbE* de las 272 canales analizadas, y sólo 6 fueron positivas para los 3 genes de patogenicidad que se quisieron detectar, *stx1*, *stx2* y *eaeA* (2,2%). La no amplificación de los genes relacionados con la patogenicidad podría asociarse a que los genes que codifican los factores de virulencia provienen de bacteriófagos y plásmidos, los cuales pueden estar o no presentes, adquirirse o perderse (Méndez *et al.*,2013). Específicamente los genes *stx1* y *stx2* que codifican para las verotoxinas 1 y 2 se encuentran en un bacteriófago integrado al cromosoma bacteriano y están asociados al desarrollo del SHU, particularmente *stx2* (Gallegos *et al.*,2009).

También está descrito que las producciones de las toxinas, principalmente se repriman por altas concentraciones de hierro y por bajas temperaturas, específicamente la transcripción del gen *stx1* está modulada por hierro (Calderwood *et al.*,1987, citado por García,2004), en el caso de la *stx2* no se ha observado esta regulación (Mühldorfer *et al.*,1996, citado por García, 2004). La mayoría de las veces, la infección de cepas por estos bacteriófagos tiene como resultado el establecimiento de la lisogenia, desencadenándose en muy pocos casos la lisis (García,2004).

La situación nacional con respecto a la detección de *E. coli* O157:H7, tanto de muestras clínicas como a partir de alimentos es escasa, durante el período de los años 2007 – 2013 se detectaron un total de 2.425 cepas para confirmación de STEC provenientes de pacientes enfermos con signos clínicos presuntivos, de las cuales el 24,7% fue confirmada como positiva (599 cepas). En ese período en la Región del Bío Bío se analizaron 173 cepas, confirmando 31, con un porcentaje 17.9%, 4 fueron O157:H7. Durante el año 2013 en la Región del Biobío, se notificaron un total de 164 brotes de ETAs, el 1% se confirmó como el agente causante a *E. coli*, pero el 88% fue determinada como una intoxicación alimentaria bacteriana no especificada. 19% de los casos fue la carne el agente causante o productos donde su preparación llevaba carne, un 3% no especificado. Según el sitio donde surgió el brote el 65% fue en el hogar (Minsal, 2014). Estudio de detecciones de cepas EHEC en Chile en plantas faenadoras son pocos, en 1997 en la Región Metropolitana se analizaron canales de bovinos y cerdos, donde de 136 muestras de canales de bovinos 39 (28.7%) fueron positivas, y en relación a las canales de cerdos 82 (68.3%) de 120 fueron positivas, y en el 2008, hubo 0 muestras de canales positivas de 123 muestras analizadas (Hormazabal,2011). En el país no hay un plan de detección obligatorio de productos cárnicos para la detección en específico de *E. coli* O157:H7, pero sí en los cuales tienen destino de exportación a los siguientes países: Estados Unidos, Israel, Canadá y/o Costa Rica, a fin de dar respaldo al sistema de certificación de exportaciones y asegurar un nivel de protección adecuado de los consumidores en el destino. (SAG, 2008).

La situación sobre la detección de *C. jejuni* en el país en canales de bovinos es

inexistente. Fernández y Hitschfeld (2009), estableció la prevalencia de *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli* y sus biotipos en bovinos de carne y leche, del sur de Chile, estadísticamente fue más prevalente el ganado de carne (35.9%) sobre el ganado lechero (21.3%), siendo *C. jejuni* la especie más frecuentemente aislada de 300 muestras de frotis fecales, con 85 muestras positivas y 11 positivas a *C. coli*, la técnica utilizada fue API.

La detección y control de estos patógenos principalmente *E. coli* O157:H7 es un problema que afecta a todo el mundo, la prevalencia y medidas preventivas varía según el país. Se ha estimado que cepas STEC causan 2,801,000 enfermedades agudas anualmente en todo el mundo, lo que lleva a 3890 casos de SHU y 230 muertes (Majowicz *et al.*, 2014). En Estados Unidos, las cepas STEC causan un estimado de 265,000 enfermedades humanas cada año. El serogrupo más prevalente es O157:H7 (Baltazar *et al.*, 2014) y el Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos ejerció la política de tolerancia cero para *E. coli* O157:H7 en productos de carne (Amagliani *et al.*, 2018). Se han realizado gran cantidad de trabajos que buscan determinar la prevalencia de *E. coli* O157:H7 en productos cárneos, donde la máxima es que las prevalencias son bajas. Algunos autores han hecho revisiones de la situación en el continente, por ejemplo, Méndez *et al.* (2013), informa que en Argentina en los años 2006 y 2007 se han hecho estudios de detección en carne picada fresca y en carne molida, con un 2,7% y 1,2% de prevalencia, en Uruguay en el 2008 también se realizó un estudio en carne picada fresca con un 1,8% de muestras positivas, en Colombia el 2001 hubo una mayor prevalencia en carne molida con un 10% y en Venezuela el 2013 se detectó un 1,94% de positividad en carne molida. Jure *et al.* (2015), realizó un trabajo donde pesquisó durante 10 años muestras de carne picada en diferentes carnicerías, y obtuvo en el año 2004 un 1,9% de positividad y en el año 2009 un 13,3%(2015), además reporta que en Perú el año 2007 en un estudio de 102 muestras de carne de bovino molida, se detectó un 22,55 % positivo, además sobre otro estudio en Argentina el año 2013 se detectó en carne picada un 12,2% de muestras positivas a *E. coli* O157:H7. Masana *et.al.*, (2010), realizó un estudio similar a este, donde se obtuvieron

muestras provenientes de la superficie de canales de bovinos después de su paso por la cámara de frío. Analizó 811 muestras, y obtuvo un 2,6% de positividad en canales, las cuales podrían codificar los genes de patogenicidad (utilizó un PCR Multiplex con genes similar al realizado). Hubo una mayor prevalencia que la detectada en este trabajo, un factor importante que podría explicar es que explicar Argentina es uno de los países que tiene una mayor prevalencia a nivel mundial de este patógeno, siendo más probable una detección de porcentajes mayores a los encontrados en Chile. En México Varela *et.al.*, (2007) ya había realizado otro estudio en similares condiciones y técnicas de detección y confirmación para *E. coli* O157:H7, donde de un total de 258 canales de bovinos analizadas, 7 muestras (2,7%), fueron positivas, pero en solo 2 (0,8%), se detectaron los genes de patogenicidad, este estudio tubo similares resultados a los obtenidos en esta investigación. Por último, Gallegos *et.al.*, (2009) nuevamente en México, en su estudio de detección en canales de bovinos en dos faenadoras, logró detectar muestra positiva (1,1 %).

Para el caso de *C. jejuni* no se encontraron estudios en condiciones similares al propuesto, donde el objetivo fuese la detección de este patógeno en superficies o en trozos de canales en las distintas etapas de la línea productiva en faenadoras. Existen estudios de muestras fecales, pero al no ser una muestra similar al estudiada en este caso, no se incluyeron en la discusión.

Con respecto a los resultados del análisis estadístico para el caso de *E. coli*, en solo dos comparaciones se pudo obtener resultados estadísticamente significativos. Primero fue el caso de canales positivas a *E.coli* detectadas por técnicas tradicionales microbiológicas según la faenadora, con una relación de efecto pequeño y con un grado de concordancia insignificante, donde en la faenadora A se detectó mayor cantidad de canales positivas (61 canales) a *E.coli* en comparación de la B (30 canales), indicando que es más probable detectar canales contaminadas en la faenadora A que en la B. Segundo fueron los resultados obtenidos de canales positivas según la fase de la línea productiva con una relación de grado pequeño y un grado de acuerdo insignificante, en los cuales indicaban que se obtuvieron mayor cantidad de canales positivas a *E. coli* en el

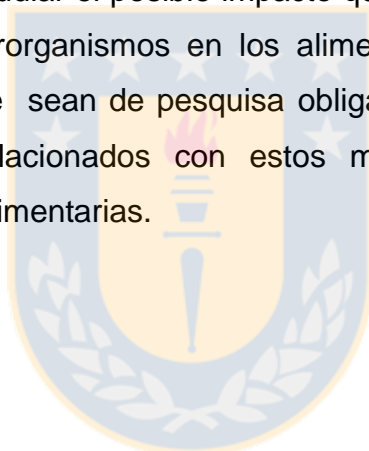
momento de la post ducha (56 canales) al comparar con el momento post cámara de frío (35 canales), indicando que es más probable detectar canales contaminadas con *E. coli* en aquel momento de la faena productiva. En el caso de las demás comparaciones, los resultados no fueron estadísticamente significativos, por la baja cantidad de canales positivas (11 canales) en comparación con el n muestreado, ya que sólo hubo pocas canales en número contaminadas con el serotipo O157:H7, pero para el caso de esta investigación, sí fue de significativo por la importancia de la detección de este serotipo en canales con destino de consumo.

Para el caso del análisis de los resultados para la detección de *C. jejuni*, hubo solo un resultado que fue estadísticamente significativo, el de canales positivas a *C. jejuni* por faenadora con un grado pequeño de relación y un acuerdo insignificante, el cual indicaba que en la faenadora A (16 canales positivas) nuevamente se detectó una mayor cantidad de canales positivas en comparación de la B (6 canales positivas).

A partir de estos resultados sería más probable detectar canales contaminadas tanto en el proceso de la post ducha como en la faenadora A, en comparación con el momento post cámara de frío y la faenadora B.

Los resultados obtenidos por confirmación fueron prevalencias bajas tanto para *E.coli* O157:H7 como para *C. jejuni*. Hay muchas variables que están relacionadas con la obtención de estos resultados, desde la dieta, el manejo y su ambiente anterior del bovino al servicio, las características tanto moleculares propias de las bacterias, como también para poder sobrevivir y multiplicarse en diferentes condiciones, como por ejemplo a temperaturas de 4°C y -20°C. Otro factor podrían ser las competencias que surgen entre los mismos microorganismos, en este caso los patógenos con los saprófitos que generalmente se encuentran en las canales de bovinos, este suceso tiene un rol importante al momento de lograr la detección del patógeno, por la acción directa que pueden generar en el desarrollo de estas bacterias sobre las canales. Sin dejar de lado al tratamiento, y manejo que se realizan en cada faenadora con el fin de disminuir la carga de posibles contaminantes patógenos del producto, y por último la ejecución y tipo de

protocolos de detección utilizados pueden tener relación con los resultados obtenidos. Entonces es de suma importancia para evitar posibles brotes o casos, un correcto manejo desde el servicio del animal, hasta que se consume el producto final, sabiendo que las dosis para lograr una infección son bajas, y esta vez se pudo confirmar la detección de muestras positivas a *E. coli* O157:H7 que podían codificar sus genes de patogenicidad. A partir de estos antecedentes y los resultados obtenidos en este estudio, en el cual se detectó la presencia de *E.coli* O157: H7 tanto en ambas fases de la línea productiva como en las faenadoras, pero no se pudo confirmar la detección de *C. jejuni*, aunque este último resultado no descarta el potencial patógeno de *C. jejuni* en canales de bovinos, además de las medidas que han adoptado países que importan canales provenientes de Chile, lo ideal sería reestudiar el posible impacto que pueden generar la presencia específica de estos microorganismos en los alimentos de consumo diario, para evaluar si es posible que sean de pesquisa obligatoria y además realizar mayor cantidad de estudio relacionados con estos microorganismos en diferentes condiciones y matrices alimentarias.



VI. CONCLUSIONES

1. Se detectó un 28,6% de muestras presuntivas a *Escherichia coli* obtenidas provenientes de canales de dos faenadoras de la Región de Bío Bío, en los momentos de la post ducha y post cámara de frío a partir de técnicas microbiológicas tradicionales.
2. La confirmación de muestras positivas a *E. coli* O157:H7, obtuvo 11 canales positivas (4,0%), de las cuales 6 (2,2%), fue posible detectar los genes de patogenicidad, por PCR Multiplex.
3. Se detectó un 8,0% de canales presuntivas a *Campylobacter jejuni* a partir de técnicas microbiológicas tradicionales.
4. No se logró confirmar la presencia de *C. jejuni* por técnica molecular PCR, ya que no hubo muestras positivas a la amplificación del gen *mapA*.



VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Amagliani, G., L. Rotundoa, E. Carlonia, E. Omicciolic, M. Magnania, G. Brandia y P. Fratamico. 2018. Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in ground beef and bean sprouts: Evaluation of culture enrichment conditions. *Food Research International*. 103 (2018) 398–405.
2. Arcos-Ávila, E., L. Mora-Cardona, L. Fandiño-de Rubio, I. Rondón-Barragán. 2013. Prevalencia de *Salmonella* spp. en carne porcina, plantas de beneficio y expendios del Tolima. Meta. Colombia. 17(1):59-68.
3. Baltasar, P., S. Milton, W. Swecker, F. Elvinger y M. Ponder. 2014. Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Distribution and Characterization in a Pasture-Based Cow-Calf Production System. *J Food Prot*. 77(5):722-731.
4. Biberstein, E., Y. Chung Zee. 1994. Tratado de microbiología Veterinaria. Acribia. Zaragoza, España.
5. Bolivar, A., A. Rojas y P. García-Lugo. 2014. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avan Biomed*. 3(1): 25-33.
6. Botkin, D., Galli. L, Sankarapani. V, Soler. M, Rivas. M y Torres. A. 2012. Development of a multiplex PCR assay for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *E. coli*, and enteropathogenic *E.coli* strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2(8): 1-10.
7. Chandra, M., P. Cheng, G. Rondeau, S. Porwollick y M. McClelland. 2013. A single step multiplex PCR for identification of six diarrheagenic *E. coli* pathotypes and *Salmonella*. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(4):210-216.
8. Day, W., J. Sajecki, T. Pitts y L. Joens. 2000. Role of Catalase in *Campylobacter jejuni* Intracellular Survival. *Infection and Immunity*. 68(11):6337-6345.
9. Fagan, P., M. Hornitzky. K. Bettelheim y S. Djordjevic. 1998. Detection of Shiga-Like Toxin (*stx1* and *stx*), Intimin (*eaeA*), and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) Hemolysin (EHEC *hlyA*) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol*. 65(2):868-872.
10. Farace, M., M. Viñas. 2007. Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de *Campylobacter* spp. pp:7. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” Centro Regional de Referencia del

WHO Global Salm Surv.

11. Fernández, H y M. Hitschfeld. 2009. Occurrence of *campylobacter jejuni* and *campylobacter coli* and their biotypes in beef and dairy cattle from the south of Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(3):450-454.
12. Franz, E., M. Klerks, J. O. De Vos, J. Termorshuizen y A. Van Bruggen. 2007. Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* *stx1*, *stx2*, *eaeA*, and *rfbE* Genes and Survival of *E. coli* O157:H7 in Manure from Organic and Low-Input Conventional Dairy Farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(7): 2180–2190.
13. Gallegos, M., A. Morales, G. Álvarez, J. Vásquez, L. Morales, I. Martínez y J. Maldonado. 2009. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de bovinos y porcinos mediante PCR. *Rev. Cient. (Maracaibo)*.19(2):139-146.
14. García, C. 2004. Detección del gen *stx2* en muestras ambientales y evaluación de su variabilidad. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. Departamento de Microbiología Facultad de Biología. Barcelona, España.
15. González-Hein, G., N. Cordero, G. Patricia y G. Figueroa. 2013. Análisis molecular de la resistencia a fluoroquinolonas y macrólidos en aislados de *Campylobacter jejuni* de humanos, bovinos y carne de ave. *Rev Chilena Infectol.* 30(2):135-139.
16. Hormazabal, J. 2011. *Escherichia coli* Productora de Tóxina Shiga Escenario en Chile. pp:20. ISP. Santiago, Chile.
17. Himathongkham, S., S. Bahari, H. Riemann, y D. Cliver. 1999. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in cow manure and cow manure slurry. *FEMS Microbiol. Lett.* (178):251–257.
18. Huang, D., A. Mohanty, H. Dupont, P. Okhuysen y T. Chiang. 2006. A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 55(10):1303-1311.
19. Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2014 a. Vigilancia de laboratorio de *Campylobacter spp.* Chile, 2005 – 2013. *Boletín ISP.* 4(1): 1-17.
20. Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.

- 2014 b. Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de toxina Shiga. Chile, 2007 – 2013. Boletín ISP. 4(2): 1-17.
21. Instituto de Salud Pública de Chile, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2015. Inocuidad Alimentaria. [en línea]. ISP. <http://www.ispch.cl/inocuidad-alimentaria>. [Consulta: 02 mayo 2015].
22. Instituto Nacional de Normalización. 2002. Canales de Bovino- Definiciones y tipificación. NCh1306.Of2002. Santiago, Chile.
23. International Organization for Standardization. 2017. Microbiology of the food chain – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter spp* - .ISO 10272-1:2017(E). Ginebra, Suiza.
24. Jay, J. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. Ed Acribia. Zaragoza, España.
25. Jeantet, R., T. Croguennec, P. Schuck, G. Brulé. 2006. Ciencia de los alimentos Bioquímica, Microbiología, Procesos, Productos. Volumen 1 Estabilización biológica y fisicoquímica. Ed Acribia. Zaragoza, España.
26. Jonas, R., G. Kittl, G. Overesch y P. Kuhnert. 2014. Genotypes and antibiotic resistance of bovine *Campylobacter* and their contribution to human campylobacteriosis. Epidemiol. Infect. 16(1):1-8.
27. Jure, M., M. Condorí, G. Pérez, M. Catalán, Al. López, G. Zolezzie, I. Chinene, M. Rivase y M. Castillo. 2015. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157 en productos cárnicos bovinos y medias reses en la provincia de Tucumán. Rev Argent Microbiol. 47(2):125-131.
28. Kalchayanand, N., T. Arthur, J. Bosilevac, J. Schmidt, S. Shackelford, T. Brown y T. Wheeler. 2018. Surface pH of Fresh Beef as a Parameter To Validate Effectiveness of Lactic Acid Treatment against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella spp.*. J Food Prot. 81(7):1126-1133.
29. Kaper, J., J. Nataro y H. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2(2): 123-140.
30. Mainil, J. 2013. *Escherichia coli* virulence factors. Veterinary Immunology and Immunopathology. 152(2): 2-12.
31. Majowicz, S., E. Scallan, E. Jones-Bitton, A. Sargeant, J. Stapleton, J. Angulo y

- F. Kirk. 2014. Global incidence of human Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections and deaths: A systematic review and knowledge synthesis. *Foodborne Pathog Dis.* 11(6): 447–455.
32. Margal, N., A. Domínguez, G. Prats y Ll. Salleras. 1997. *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Rev Esp Salud Pública.* 71(5):437-443.
33. Mazana, M., G. Leotta, I. Del castillo, B. D'astek, P. Palladino, I. Galli, E. Vilacoba, C. Carbonari, H. Rodriguez y M. Rivas. 2010. Prevalence, Characterization, and Genotypic Analysis of *Escherichia coli* O157:H7/NM from Selected Beef Exporting Abattoirs of Argentina. *J. Food Prot.* 73(4):649-659.
34. Maziero, M., T. Cristina y R. de Oliveira. 2010. Effect of refrigeration and frozen storage on the *Campylobacter jejuni* recovery from naturally contaminated broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology.* 41(2):501-505.
35. Mazurier S, van de Giessen A, Heuvelman K, Wernars K. 1992. RAPD analysis of *Campylobacter* isolates: DNA fingerprinting without the need to purify DNA. *Lett Appl Microbiol.* 14(6): 260-262.
36. Méndez, C., G. Vergaray, H. Morante, P. Flores y R. Gamboa. 2013. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú. *Rev. Peru. Biol.* 20(2):159-164.
37. Ministerio de Salud, República de Chile, División jurídica. 2011. Reglamento sanitario de los alimentos. DTO. N°977/96. Santiago, Chile.
38. Ministerio de Salud, República de Chile, SEREMI Región del Bío-Bío. 2014. Enfermedades transmitidas por alimentos. pp:56-58.
39. Moreno García, B. 2006. Higiene e inspección de carnes 1. Ed Díaz de Santos. Madrid, España.
40. Mühldorfer, I., J. Hacker, G. Keusch, D. Acheson, H. Tschäpe, A. Kane, A. Ritter, T. Olschlager y A. Donohue-Rolfe. 1996. Regulation of the Shiga-like toxin II operon in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 64(2):495-502.
41. Nychas, G., P. Skandamis, C. Tassou y K. Koutsoumanis. 2008. Meat spoilage during distribution. *Meat Science.* 78(2):77-89.
42. Olea, A. 2007. Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos: un fenómeno frecuente de magnitud real desconocida. *El vigía* 25. 10(25):1150-1160.

43. Organización Mundial de la salud Animal. 2004. *Campylobacter jejuni* y *Campylobacter coli*. pp:1150-1160.
44. Paquette, S., K. Stanford, J. Thomas y T. Reuter. 2018. Quantitative surveillance of shiga toxins 1 and 2, *Escherichia coli* O178 and O157 in feces of western-Canadian slaughter cattle enumerated by droplet digital PCR with a focus on seasonality and slaughterhouse location. Plos One. 13(4):1-13.
45. Poppi, L., J. Rivaldi, T. Coutinho, C. Astolfi-Ferreira, A. Piantino Ferreira y I. Mancilha. 2015. Effect of *Lactobacillus* sp. isolates supernatant on *Escherichia coli* O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. Pesq. Vet. Bras. 35(4):353-359.
46. Quinn, P.J., B.K. Markey, M.E. Carter, W.J. Donnelly y F.C Leonard. 2002. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Acribia. Zaragoza, España.
47. Quinn, P.J., B.K. Markey. 2010. Elementos de microbiología veterinaria. Acribia. Zaragoza, España.
48. Roberts, D., Hobbs, B. 1997. Higiene y toxicología de los alimentos. Ed Acribia. Zaragoza, España.
49. Rodríguez-Angeles, G. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Publica Mex. 44(5):464-475.
50. Romero, M., L. Uribe y J. Sánchez. 2010. El transporte terrestre de bovinos y sus implicaciones en el bienestar animal: revisión. Biosalud. 9(2):67-82.
51. Servicio Agrícola y Ganadero, Departamento de Protección Pecuaria, República de Chile. 1999. Manual Genérico Sistemas de Aseguramiento de Calidad. Subdepto, Industria y Tecnología Pecuaria Proyecto N°322. Santiago, Chile.
52. Servicio Agrícola y Ganadero, 2004. Muestreo microbiológico de canales y carcasas en plantas faenadoras de exportación. D-CER-VPE-PP-003 -versión 01. Santiago, Chile.
53. Servicio Agrícola y Ganadero. 2008. Verificación oficial y del autocontrol de *E. coli* O157:H7 y STEC no-O157 en carne molida, trimming y sus precursores, carne tenderizada, carne marinada y hamburguesas de bovino para exportación a los Estados Unidos, Israel, Canadá y Costa Rica. D-CER-VPE-PP-004-versión 01.

Santiago, Chile.

54. Singh, H., R.S Rathore, S. Singh y P. Singh. 2011. Comparative analysis of cultural isolation and PCR based assay for detection of *Campylobacter Jejuni* in food and faecal samples. Brazilian Journal of Microbiology. 42(1): 181-186.

55. Stevens, M., N. Ashbolt, D. Cunliffe. 2003. Recommendations to change the use of coliforms as microbial indicators of drinking water quality. pp:3-10. Informe técnico. National Health and Medical Research Council. Sidney, Australia.

56. Stanchi, O. 2007. Microbiología Veterinaria. Inter-médica. Buenos Aires, Argentina.

57. Tshabalala, P., L. de Koch y M. Buys. 2012. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 co-cultured with different levels of *Pseudomonas fluorescens* and *Lactobacillus plantarum* on fresh beef. Brazilian Journal of Microbiology. 43(4):1406-1413.

58. Vadillo, S., P. Durán, M. Yanes y Emilio, M. 2002. Manual de microbiología veterinaria. Ed McGraw-Hill: Interamericana. Madrid, España.

59. Valencia, V., Acero, V. 2013. Comparación de ácido láctico, ácido peroxiacético e hipoclorito de sodio en la desinfección de canales bovinas en un frigorífico de Bogotá, Colombia. Rev. Med. Vet. ISSN 0122-9354 (26):13-23.

60. Varela, J., E. Cabrera, M. Cardona, L. Ibarra, H. Rangel, A. Castillo, M. Torres y A. Ramírez. 2007. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 from beef carcasses at a slaughter plant in Mexico. Int J Food Microbiol. 113(2):237-41.

61. Vidal, R. 2011. Brote de SHU en Alemania se debió a variante poco reportada de *Escherichia coli*. [en línea]. Med.UChile. <http://www.med.uchile.cl/2011/junio/6256-brote-de-shu-en-alemania-se-debio-a-variante-poco-reportada-de-escherichia-coli.html>. [Consulta: 30 Julio 2015].

62. Visvalingam, J., Holley, R. 2018. Evaluation of chlorine dioxide, acidified sodium chlorite and peroxyacetic acid for control of *Escherichia coli* O157:H7 in beef patties from treated beef trim. Food Research International 103(2018):295–300.

63. Wang, G., C. Clark y F. Rodgers. 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. *J. Clin. Microbiol.* 40(10): 3613–3619.

64. Zumbado, L., A. Arévalo, M. Donado y J. Romero. 2014. Diagnóstico molecular de *Campylobacter jejuni* en la cadena avícola destinada para consumo humano en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 25(2): 357-363.



DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Declaro que el trabajo presentado es personal e inédito, que cada uno de las citas bibliográficas son correctas y están debidamente reconocidas, que no contiene copias totales ni parciales de otras investigaciones excepto citas aceptadas como trabajos científicos, que no afectan los derechos de autor y que se mantiene dentro del marco ético de trabajos científicos de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción.

Felipe Ignacio Faúndez Retamal

