

# **E. Coli productora de toxinas (STEC)**

Detección por PCR en  
alimentos

Por Mariana Motter, Vet.



# E. Coli O157 H7

- ◆ Primer serotipo asociado a diarreas hemorrágicas
- ◆ Agente causal de síndrome urémico hemolítico
- ◆ Su presencia en alimentos constituye un riesgo para la salud de grupos vulnerables (niños y pacientes inmunosuprimidos)

# Otras E. coli no O157 productoras de toxinas

También están asociadas a  
diarreas hemorrágicas

# FACTORES DE VIRULENCIA

- ◆ FACTORES DE ADHERENCIA INTESTINAL
- ◆ CITOTOXINAS
- ◆ PLÁSMIDO DE 60 MDa O157: H7

# CITOTOXINAS

- ◆ Shiga toxinas 1 y 2 pueden estar solas o en combinación
- ◆ Están codificadas por bacteriófagos
- ◆ Stx 2 es mucho mas patógena que la Stx 1
- ◆ Entre las toxinas hay distintos subtipos que producen enfermedad en distintas especies.

# PLASMIDO

- ◆ Esta presente en todas las cepas de O157:H7
- ◆ Contiene genes que codifican para factores de virulencia:
  - ◆ Serina proteasa
  - ◆ Catalasa-peroxidasa
  - ◆ Enterohemolisina
  - ◆ Sistema de secreción tipo II
  - ◆ Fimbria involucrada en la colonización del enterocito

# SEROPATOTIPOS Y FACTORES DE VIRULENCIA

SEROTIPO	STX 1	STX 2	EAE	HLYa	ESP p	KATp
O 157:H7	+	+	+	+	+	+
O 26:H11	+	-	+	+	+	+
O 103:H2	+	-	+	+	-	+
O 111:NM	+	-	+	+	-	-
O 113:H21	-	+	-	-	+	-
O 117: H7	+	-	-	-	-	-
O 174: H8	+	+	-	-	-	-

# PATOGÉNESIS

- ◆ Stec alcanza el intestino y se adhiere a la célula intestinal
- ◆ Desorganización de microvellosidades
- ◆ Acumulación de actina en el citoplasma
- ◆ Disminución de la superficie absorbente
- ◆ DIARREA SIN SANGRE



- ◆ La toxina shiga liberada se une a la célula intestinal por interacción con el receptor GB3.
- ◆ Es clivada en el aparato de golgi liberando un fragmento que se une a la subunidad 60 s inhibiendo la síntesis proteica.
- ◆ Daño de las células endoteliales de los vasos sanguíneos
- ◆ Inducción de IL8 acumulación de leucocitos.

DIARREA CON SANGRE

# Progresión hacia la lesión renal

- ◆ La toxina llega a los órganos con células endoteliales tengan receptores GB3
- ◆ En el riñón los receptores GB3 se encuentran en cantidad en la región cortical
- ◆ Células endoteliales se hinchan y desprenden a nivel del glomérulo
- ◆ Depósito de fibrina
- ◆ Oclusión de los capilares, reducción de flujo sanguíneo
- ◆ Insuficiencia renal y ruptura de glóbulos rojos

# SINDROME URÉMICO HEMOLÍTICO



# EPIDEMIOLOGÍA

- ◆ En nuestro país los serotipos mas aislados en el ganado bovino sano poseen toxina 2 en un 40 %.
- ◆ Mayor predisposición en los animales alimentados en feedlot
- ◆ Mayor excreción en animales jóvenes (2 a 24 meses)

- ◆ La vía de transmisión es fecal-oral
- ◆ Persona – persona
- ◆ Contacto con animales
- ◆ Contaminación cruzada
- ◆ Falta de cocción de productos cárnicos
- ◆ Falta de esterilización en jugos naturales (la bacteria sobrevive a Ph ácidos)

# AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE STEC

- ◆ O157:H7
- ◆ Medio Ec con novobiocina
- ◆ 42 C 6 horas
- ◆ Separación inmunomagnética
- ◆ Colonias sospechosas
- ◆ Otras stec
- ◆ Ec 37 C 24 Hs
- ◆ Se transfiere 1 ml a caldo MacConkey
- ◆ Aislamiento en Levine
- ◆ Colonias sospechosas

# PCR MULTIPLEX

- ◆ de las colonias sospechosas se toman como mínimo 5 y se les agrega 150 microlitros de buffer de lisis, se homogeiniza
- ◆ Se hierven durante 15 minutos
- ◆ Centrifuga 10000 rpm 5 minutos
- ◆ Se toman 2 microlitros del sobrenadante como templado para la PCR

# DETECCIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA

- ◆ 5µl de buffer de pcr 10 x
- ◆ Cl<sub>2</sub>Mg 1,5 mM
- ◆ Dnts 0,1 mM
- ◆ Primers para stx1 2pmol/µl
- ◆ Primers para stx2 0,4pmol/µl
- ◆ Primers para O157 0,4pmol/µl
- ◆ Taq 0,02 U/ µl
- ◆ Volumen final 50 µl

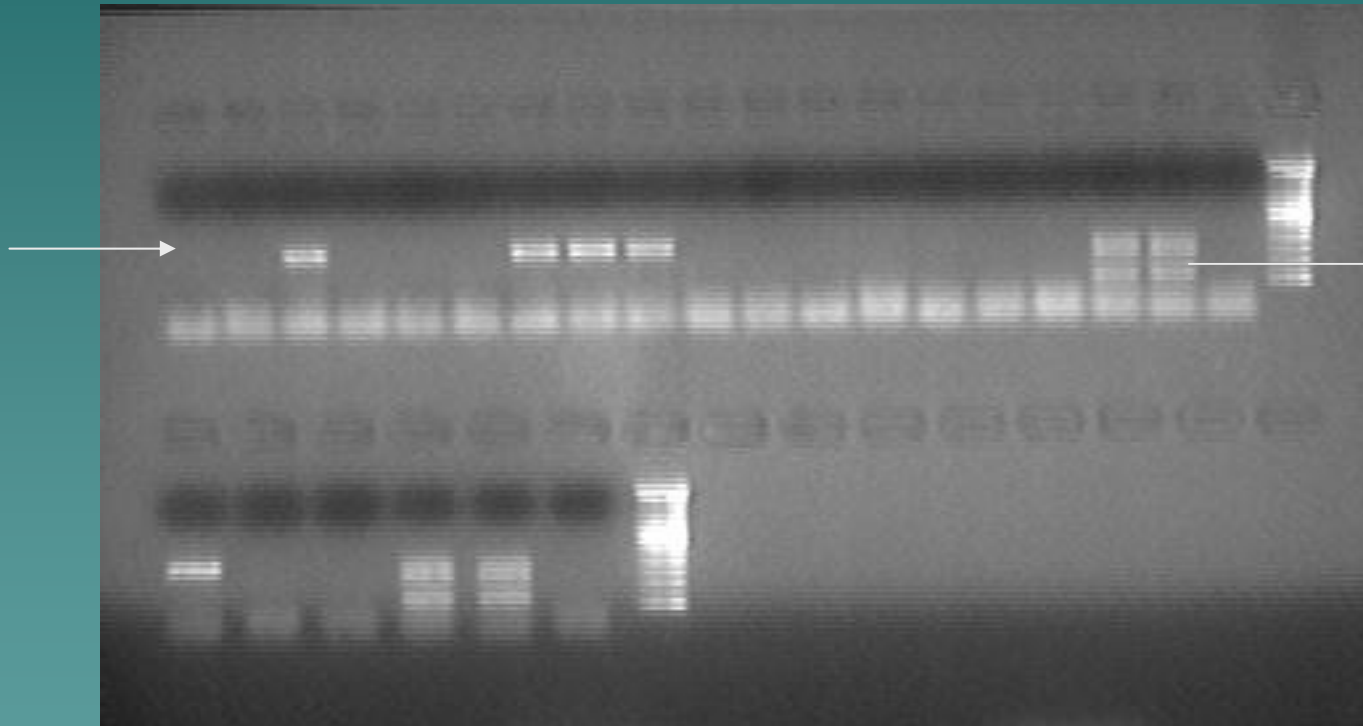


# RESULTADOS DE LA AMPLIFICACIÓN

- ◆ Fragmento correspondiente a toxina 1 = 130 Pb
- ◆ Fragmento correspondiente a toxina 2 = 346 Pb
- ◆ Fragmento correspondiente a O 157 = 259 Pb

# Gel de agarosa para una muestra de carne picada

346pb  
STx2



259  
02  
57

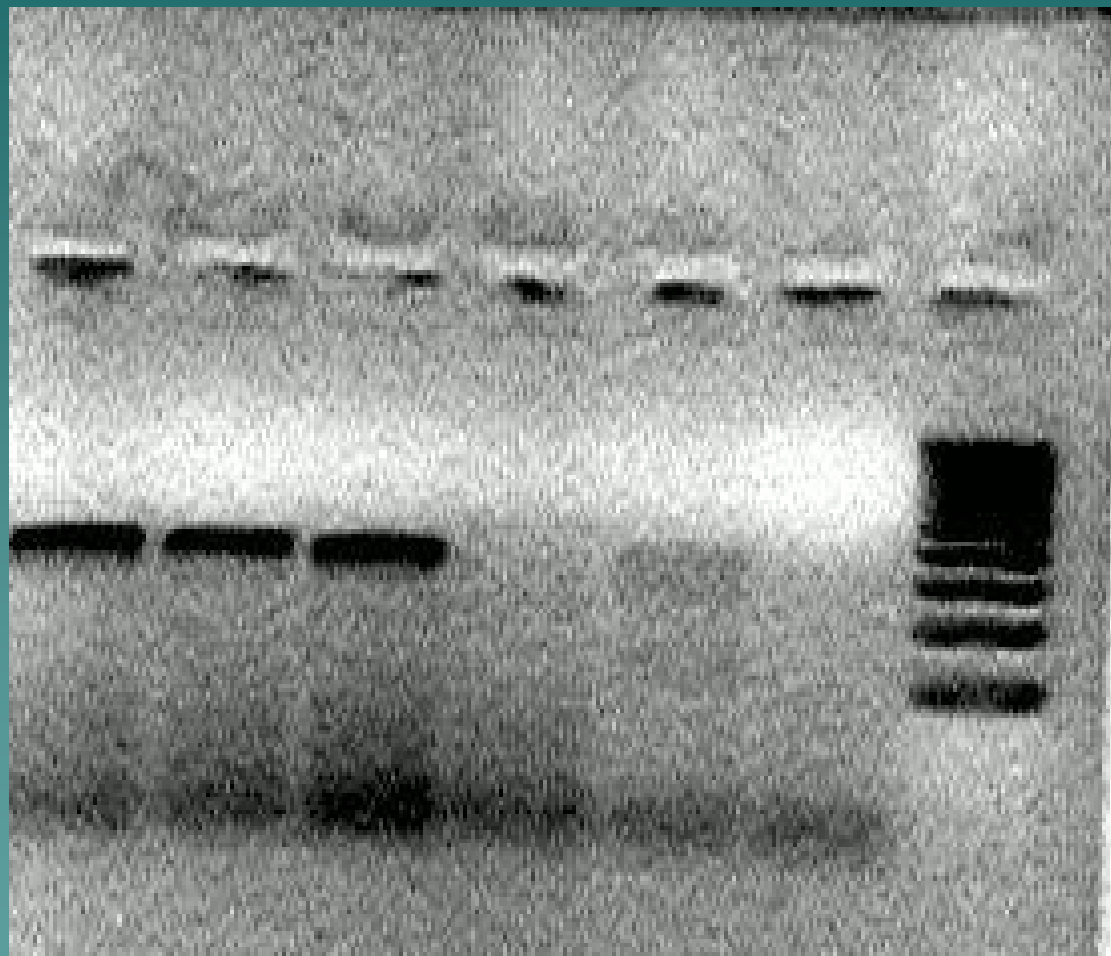
# GEL DE AGAROSA PARA UNA MUESTRA DE HAMBURGUESAS



STx2

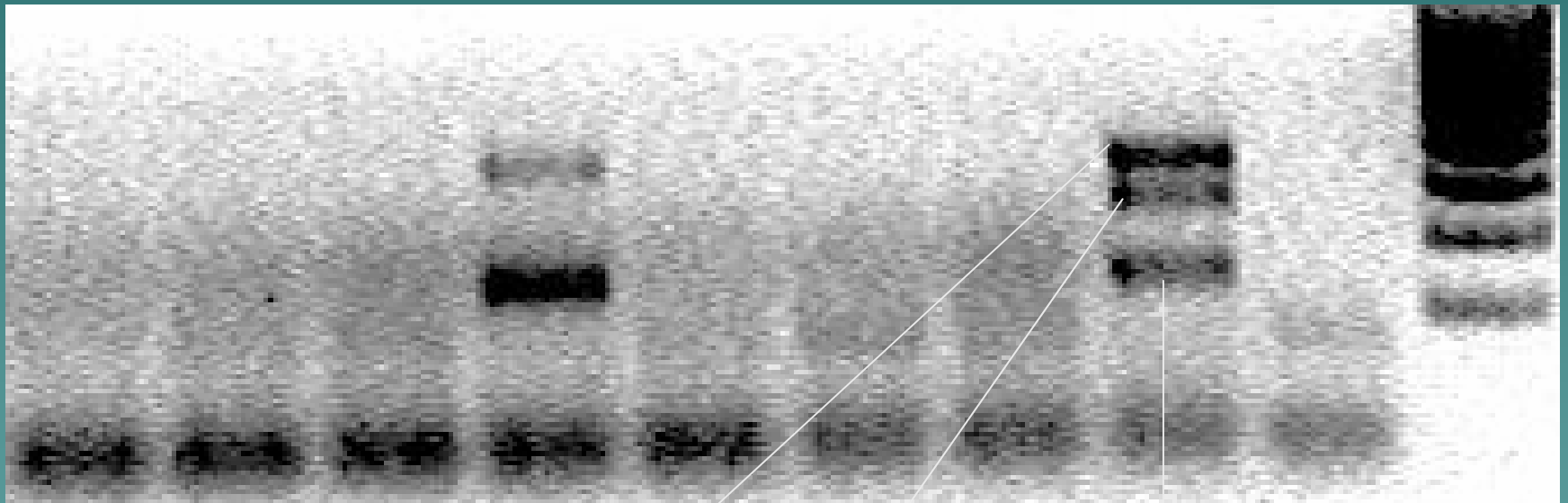
346pb

GEL DE AGAROSA PARA UNA MUESTRA DE MEDALLONES DE CARNE "BARFY" O 111 : H 11se puede observar la banda correspondiente a toxina 2



346  
Stx →

# MEDALLONES DE CARNE SUPERCONGELADOS es serotipificada por el Instituto Malbrán como O20:H19 Stx 1 Stx 2 Hly



Stx 2

Factor  
Virulencia  
HLY de la  
O20

Stx 1 130pb

- ◆ En nuestro país se producen 300 casos de síndrome urémico hemolítico por año
- ◆ Letalidad es del 2,4 %
- ◆ Es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes
- ◆ No existe tratamiento específico
- ◆ Por lo tanto la prevención y el control constituyen las mejores herramientas contra este patógeno emergente.

# MUCHAS GRACIAS

Gracias a Mariana Motter  
por la facilitación de esta  
información