



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE NICARGUA,
MANAGUA
UNAN - MANAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

“Luis Felipe Moncada”

MONOGRAFÍA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

Licenciatura en Microbiología

Tema:

Determinación de *Escherichia coli* O157, en carne molida de res que se expenden en los supermercados del municipio de Managua en el periodo comprendido de marzo-abril 2020.

AUTORES:

Br. Aníbal José López Aburto.

Br. Mayling Azucena Mejía Silva.

Br. Valioska Guadalupe Berrios Brizuela.

TUTORES

Ing. Benita Magaly Jiménez
Especialista en laboratorio de salud
Departamento de microbiología de alimentos CNDR.

MSc. Francisco Enrique Romero Oviedo
Docente POLISAL-UNAN-MANAGUA.

ASESOR METODOLÓGICO

Msc. Oscar Arbizú Medina.
Docente POLISAL-UNAN-MANAGUA.

Managua, 17 de diciembre del 2020.

Glosario

Actina: Es una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos.

Anaerobio: que es capaz de vivir o desarrollarse en un medio sin oxígeno.

Antígeno: sustancia que al introducirse al organismo induce en este una respuesta inmunitaria, provocando la formación de anticuerpos.

Antisuero: suero que contiene anticuerpos, obtenido mediante inmunización de un animal.

Asintomático: que no presenta síntomas de enfermedad.

Autolimitante: se refiere a aquellos procesos o enfermedades que suelen terminar sin tratamiento.

Biotipo: Que son aquellas cepas que tienen características bioquímicas y fisiológicas especiales.

Cepas: en microbiología, variante fenotípica de una especie, o incluso, de un taxón inferior, usualmente propagada clonalmente debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias.

Citoesqueleto: entramado tridimensional de proteínas que proveen soporte interno en las células, organiza las estructuras internas e interviene en los fenómenos de transporte, tráfico y división celular.

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) es el único Centro de Recursos Microbianos público en España, que actúa como depositario y proveedor de bacterias, arqueas, levaduras y hongos filamentosos. Es una Autoridad Internacional de Depósito de Microorganismos para Fines de Patentes, según el tratado de Budapest.

Coagulación: es la transformación de un fluido en una sustancia pastosa y densa.

Colitis: inflamación del colon.

Cromógeno: Que produce color. Aplicase a las bacterias que producen materias colorantes u originan coloraciones.

Desinfección: proceso físico o químico que mata o inactiva agentes patógenos, impidiendo el crecimiento de microorganismos patógenos en fase vegetativa que se encuentren en objetos inertes.

EHEC: *Escherichia coli* enterohemorrágica.

ETAS: Las enfermedades transmitidas por alimentos.

Enterobacteria: son bacterias Gram negativas que pueden tener morfología de cocos o bacilos.

Esfacelamiento: Producir gangrena en un tejido.

Facultativo: bacterias que pueden desarrollarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno, por lo que también se les llama anaerobias facultativas o aerobias facultativas.

Faenado: Matanza, sacrificio de ganado o faena es el acto de matar el ganado para el consumo humano.

Féculas: Sustancia blanca o blanquecina, suave al tacto, insoluble en el agua fría, en el alcohol, en el éter y en los aceites grasos.

Flagelo: apéndice móvil con forma de látigo presente en muchos organismos unicelulares y en algunas células de organismos pluricelulares.

Genoma: conjunto de genes y disposición de los mismos en una célula.

Huésped: organismo que alberga a otro en su interior o que lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de parasitismo, comensalismo o mutualismo.

Inocuidad: se refiere a las condiciones y prácticas que preserva la calidad de los alimentos para prevenir la contaminación y las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos.

Intimina: proteína presente en la bacteria *Escherichia coli*.

Liofilización: proceso que tiene como objetivo separar el agua u otro solvente de una disolución mediante congelación y posterior sublimación del hielo a presión reducida.

Lípido: son un grupo de compuestos biológicos que se clasifican conjuntamente por su estructura, son poco solubles en agua y están formados principalmente por ácidos grasos.

Locus: lugar específico del cromosoma donde está localizado un gen u otra secuencia de ADN, como su dirección genética.

Microvellosidades: repliegue de la membrana de las células del epitelio que recubre el lumen del intestino; tiene forma de dedo y permite aumentar la superficie de contacto del epitelio con el lumen del intestino, por lo tanto, incrementa la capacidad de absorción de los nutrientes.

Mucinas: Las mucinas son una familia de proteínas de alto peso molecular y altamente glicosiladas producidas por las células de los tejidos epiteliales de la mayoría de los metazoos.

Necrosis: muerte de las células y los tejidos de una zona determinada de un organismo vivo.

Plásmido: Son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico.

Patógeno: elemento capaz de producir algún tipo de enfermedad.

Peptona: termino químicamente indefinido, usado para describir productos solubles en agua, obtenidos después del hidrolisis de proteínas.

Perecedero: Que tiene duración limitada, está destinado a perecer, perder su utilidad o validez, o estropearse en un determinado plazo de tiempo.

Polimerasa: enzima capaz de transcribir o replicar ácidos nucleicos.

Polimorfismo: unos solos nucleótidos se presentan cuando un solo nucleótido (elemento fundamental del ADN) es reemplazado por otro.

Serotipo: tipo de microorganismo infeccioso clasificado según los antígenos que presenta en su superficie celular.

Sorbitol: es un polialcohol (alcohol de azúcar) que se utiliza como edulcorante de carga en diversos productos alimentarios.

STEC: *Escherichia coli* productora de toxina shiga.

Termolábil: Que se destruye al alcanzar una temperatura más o menos elevada.

Toxiinfección: Enfermedad provocada por un alimento contaminado debido a las toxinas que fabrican ciertos microorganismos.

Trombocitopenia: cualquier situación de disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo por debajo de los niveles normales.

TABLA DE CONTENIDO

I.	Introducción.....	1
II.	Antecedentes.....	2
III.	Planteamiento del problema.....	4
	3.1 Caracterización del problema.....	4
	3.2 Delimitación del problema.....	4
	3.3 Formulación del problema.....	4
IV.	Justificación.....	5
V.	Preguntas directrices.....	6
VI.	Objetivos.....	7
	6.1 Objetivo general.....	7
	6.2 Objetivo específico.....	7
VII.	Marco teórico.....	8
	7.1 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	8
	7.2 Factores de virulencia.....	10
	7.2.1 Factores de adherencia intestinal.....	11
	7.3 Patología.....	12
	7.4 Transmisión.....	12
	7.5 Prevención.....	13
	7.6 Método de cuantificación de <i>Escherichia coli</i>	14
	7.7 Métodos de detección de <i>Escherichia coli</i> O157.....	14
	7.7.1 Métodos de aislamiento.....	15
	7.7.2 Medios de identificación.....	16
	7.7.3 Métodos de confirmación.....	17
VIII.	Diseño metodológico.....	20
IX.	Operacionalización de las variables.....	28

X.	Análisis y discusión de los resultados.....	29
XI.	Conclusiones.....	38
XII.	Recomendaciones	39
XIII.	Referencia bibliográfica.....	40
XIII.	Anexos.....	44

Dedicatoria

Mayling Azucena Mejía Silva

Primordialmente, a Dios quien ha estado a mi lado en cada proceso dándome el entendimiento y la plena confianza que de su mano llegaríamos a culminar esta meta, así mismo abriéndonos camino con las personas y medios necesarios para el desarrollo de cada proceso de la monografía y su culminación, a mis padres porque estuvieron siempre animándome a seguir adelante en cada parte de este proyecto y a cada una de las personas que nos brindaron de su apoyo para llevar a cabo este estudio.

Aníbal José López Aburto

Primeramente, a Dios por darme la oportunidad de llegar hasta este momento con vida y salud, por la fortaleza que me dio para lograr esta meta importante, a mis padres por haberme apoyado incondicionalmente en la parte emocional y económica, alentándome a seguir mis sueños, por la educación que me dieron en casa donde me inculcaron sus valores y a mis amigos por estar en esos momentos difíciles en los cuales pude contar con ellos.

Valioska Guadalupe Berrios Brizuela

En primera persona a Dios por brindarnos sabiduría y salud para poder llevar a cabo nuestros sueños y poder concluir todos los procesos de la monografía con pocos inconvenientes, a mis padres por apoyarme emocionalmente y no dejar que me rindiera en los momentos más difíciles que pasaron en el transcurso de estos años de estudio, al sacrificio económico que hicieron para poder culminar mi carrera y a mis compañeros por alentarnos a seguir nuestros sueños y saber que con un poco de fe y perseverancia se puede cumplir toda meta.

Agradecimiento

A **nuestro padre celestial** por darnos la oportunidad de llegar a concluir de manera exitosa una de las metas más importante en la vida de cada uno de nosotros como lo es nuestra carrera; por haber sido nuestro principal guía en este largo recorrido y por llenarnos de su luz y de fuerza.

A **nuestros padres** por siempre ser grandes pilares y motivación de seguir adelante hasta lograr esta meta con su apoyo en cada uno de los procesos que vivimos durante el transcurso de esta carrera y por siempre llevarnos en sus oraciones.

A cada **docente** de la Universidad y de las áreas de rotación en centros de salud y hospitales que nos guiaron y brindaron de sus conocimientos para ayudarnos en nuestra formación como profesionales.

A **nuestro Tutor** Msc. Francisco Romero Oviedo MSc. Microbiología Médica UNAN-Managua y **nuestra Tutora** Ing. Benita Magaly Jiménez encargada del Departamento de microbiología del agua y alimentos CNDR, por habernos dado oportunidad de trabajar junto a ellos por enseñarnos mediante sus conocimientos como llevar a cabo cada etapa en este proceso y apoyarnos hasta el final de la realización de monografía.

A **nuestro asesor** metodológico Msc. Oscar Arbizú Medina Msc. Microbiología Médica. Por compartir sus conocimientos y habilidades para poder culminar la monografía.

Al **CNDR-MINSA** por apoyarnos con cada uno de los recursos que se requerían para lograr llevar a cabo la monografía.

Resumen

El presente estudio es de tipo Descriptivo, de corte transversal con el objetivo principal de determinar *Escherichia coli* O157, en carne molida de res expandida en los supermercados del municipio de Managua en el periodo comprendido marzo-abril 2020. El universo estuvo conformado por 46 supermercados, distribuidos en 5 cadenas (A, B, C, D y E), de los cuales se seleccionaron aleatoriamente 10 supermercados; las muestras estuvieron compuestas por 2 lotes (un lote de carne molida económica y un lote de carne molida súper) con 50 submuestras de carne económica y 50 submuestras de carne súper para un equivalente de 100 muestras en total. Los resultados obtenidos de la cuantificación de *Escherichia coli*, fueron de un 46% de muestras que presentaron colonias características de esta bacteria en el agar TBX. Con respecto a la detección por el método de PCR en tiempo real, se obtuvieron amplificaciones tardías en 99 muestras; que pudo haberse dado por la presencia de *E. coli* o a la presencia de otras enterobacterias que también pueden poseer el gen *uidA*, tomando los resultados según BAM/FDA como falsos positivos, evidenciándose también mediante el aislamiento por BAM/FDA la ausencia de *Escherichia coli* O157. Con este estudio se comprobó al obtener la presencia de *E. coli* y microbiota acompañante la posible existencia de contaminación fecal o cruzada.

I. Introducción.

Los productos cárnicos ocupan el segundo lugar como el producto alimentario con mayor demanda en los mercados y supermercados de la capital. Entre estos productos cárnicos se encuentra la carne molida de res, que se considerada altamente perecedera por sus características y elaboración, aumentando así la probabilidad de contaminación cruzada y facilitando el crecimiento microbiano (Madero, 2018). Debido a esto, una de las preocupaciones que se tiene acerca de este producto se basa en la frescura que debe prestar a los aspectos sanitario, ya que según informes del Ministerio de la Salud (MINSA) son los más vinculado a enfermedades transmitida por los alimentos (ETAS) (Gutiérrez, 2009).

Escherichia coli O157, es quizás el patógeno emergente, transmitido por alimentos, más importante de las últimas tres décadas. En donde amplias variedades de alimentos han sido involucradas como vehículos de este patógeno (Rojas, y otros, 2009). La mayoría de los brotes provocados por *Escherichia coli O157*, han sido atribuidos al consumo de productos de carne bovina mal cocida; por lo que la carne molida de res es uno de los principales reservorios de estos patógenos (Varela, y otros, 2008).

Por lo planteado anteriormente es de gran relevancia la detección de este agente por el impacto que puede causar en la población que consumen productos cárnicos. Para la detección de *Escherichia coli O157*, se tomó los parámetros según el Capítulo 4^a la normativa del BAM-FDA, a partir de muestras de alimentos (BAM/FDA, 2017).

II. Antecedentes.

Jure, Condori, Leotta, Chinen, Allori y Castillo (2010), En un estudio realizado de ***Detección, aislamiento y caracterización de Escherichia coli productor de toxina Shiga a partir de carne molida fresca proveniente de carnicerías de Concepción en la provincia de Tucumán*** se recolectaron 53 muestras de carne molida por triplicado en carnicerías de la ciudad de Concepción y fueron procesadas por triplicado. Para la detección, el aislamiento y la caracterización de STEC O157 se utilizaron dos técnicas de PCR; donde se demostró que siete muestras fueron positivas para el gen *stx2*, de las cuales 4 también fueron positivas para el gen *rfbO157*. Sin embargo, solo se aisló una cepa de *E. coli O157* biotipo C, portadora de los genes *eae*, *stx2* y *ehxA*.

Méndez, Vergaray, Morante, Flores y Gamboa (2013), publicaron un estudio “***Aislamiento y caracterización de Escherichia coli O157:H7 a partir de carne molida de bovino en Lima-Perú***” donde se analizaron 195 muestras de carne fresca molida de ganado bovino colectadas en 65 puestos de venta elegidos al azar, ubicados en 33 mercados de abastos, localizados en 17 distritos de Lima metropolitana entre junio del 2009 y enero 2011 con el objetivo de determinar la presencia de cepas de *E. coli O157:H7* en muestras de carne fresca molida de ganado bovino que se expende en diferentes distritos de Lima Metropolitana y determinar la presencia de factores de virulencia. Para el aislamiento y enumeración de *E. coli* se utilizó la técnica del número más probable mediante tubos múltiples; para el aislamiento y caracterización de *E. coli O157:H7* el enriquecimiento selectivo y el análisis bioquímico, las colonias características se confirmaron mediante pruebas serológicas. Para determinar la presencia de shiga toxina (*stx1*, *stx2*) e intimina (*eae A*) se empleó la técnica de PCR multiplex en tiempo real y para enterohemolisina la prueba de hemólisis. El 87.18% de las muestras fue positivo para *E. coli* y el 77.95% presentó un recuento igual o superior a 50 NMP/g. Se obtuvieron 3 (1.54%) cepas de *E. coli O157:H7*, una *stx1 +/ stx2 +/ eaeA -* y enterohemolisina -, una *stx1 +/ stx2 -/ eaeA +* y enterohemolisina - y la otra *stx1 -/ stx2 -/ eaeA -* y enterohemolisina +. También se obtuvieron 4 cepas (2.05%) de *E. coli O157* no H7, ninguna presentó factores de virulencia. El estudio reveló el riesgo potencial de que *E. coli O157:H7* afecte a la población de Lima.

Berrios Obando y Navarro Suarez (2016), realizaron un estudio “***Diagnóstico Molecular y Convencional de Escherichia coli O157 en carne molida de res comercializada en el Mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua***” se analizó por medio del Método Estándar

Internacional FDA-BAM, un total de 2 lotes (10 muestras) de carne molida de res del Mercado Iván Montenegro, de las cuales se aislaron 5 muestras (50%) con las características propias de *Escherichia coli* 0157 comparadas con la cepa control CECT 5947 no Toxigénica. Por otro lado, la técnica de PCR convencional obtuvo un 50% de muestras positivas con genes de virulencia (*stx1/2*, *eaeA*, *uidA* y *ehxA*) considerados como característicos de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

Riveras Rojas en Santiago, Chile en 2018 publicó un estudio “*Caracterización de Escherichia coli productora de toxina Shiga aislada desde carne molida en la ciudad de Santiago de Chile*” con el objetivo de determinar la prevalencia de STEC en carne molida de vacuno y caracterización de los aislados obtenidos. Se recolectaron 430 muestras de carne molida de vacuno desde carnicerías y supermercados de la ciudad entre los meses de marzo del 2016 a enero de 2017, dividiendo en 4 zonas geográficas a la ciudad. Las muestras fueron sometidas a un tamizaje a través de PCR para los genes *stx1* y *stx2* y desde las muestras positivas se aislaron colonias sospechosas a *E. coli*. La confirmación de los aislados se realizó mediante PCR para los genes *stx1* y *stx2* y pruebas bioquímicas para *E. coli*, además de un PCR para *E. coli*. Los aislados se caracterizaron para la presencia de los factores de virulencia de la intimina (*eae*) y hemolisina (*hlyA*), junto a la determinación de serotipos O157 y Big Six (O26, O45, O103, O111, O121, O145). Teniendo un resultado de 9,3% (40/430) de las muestras resultaron positivas a STEC; con 10,2% provenientes (22/215) de carnicerías y 8,4% (18/215) de supermercados. No se detectaron diferencias significativas entre las prevalencias de cada área de la ciudad. Desde las 40 muestras positivas se recuperaron 47 aislados de STEC, de las cuales 12,8% (6/47) contenía el gen *stx1*, 74,5% (35/47) *stx2* y 12,8% (6/47) tenía ambos genes de virulencia. Ninguna de los aislados contenía el gen de la intimina (*eae*), y un 40% fue positivo al factor de virulencia *hlyA*. Ninguno de los aislados fue de los serogrupos de STEC O157 o “Big Six”. El autor llegó a la conclusión de que la carne molida ofrecida en Santiago es un vector de STEC, sin embargo, requiere de más estudios para determinar el potencial patogénico de las cepas y el riesgo que representa esta carne molida para la población.

III. Planteamiento del problema.

3.1 Caracterización del problema.

La carne molida, tiene una preparación de objetivos culinarios variados, siendo un producto con una buena fuente de proteínas y otros nutrientes esenciales que pueden ser parte de un menú equilibrado y sano (United States Department of Agriculture, 2013). Según estudios del 2016 realizados por el Ministerio de Fomento, Industria y Comercio (MIFIC), la carne de res es uno de los productos más comprado por la población con un promedio de compra de dos veces por semana; en donde los supermercados constituyen uno de los puntos de compra y venta de carne de res.

La carne molida de res debe cumplir con estándares de inocuidad aplicados a los alimentos; empleando medidas sanitarias que provea y asegure un alto nivel de protección contra los riesgos asociados a las enfermedades transmitidas por los alimentos (Zapata, 2006). El consumo de carne de bovino contaminada que no sea sometida a un proceso eficiente de cocción puede ser vehículo para transmitir patógenos gastrointestinales como *Salmonella spp.* y *E. coli O157:H7*, indicándose en los datos de la OMS que *E. coli* productora de toxina Shiga, particularmente O157 es de preocupación internacional, con prevalencia en carne de bovino; siendo de gran relevancia el cuidado de la inocuidad de este producto debido a que cuando la carne es manipulada, se expone a la contaminación de microorganismos dañinos.

3.2 Delimitación del problema.

Todos los grupos de la población de diferentes edades pueden ser afectados por *E. coli O157*, microorganismo que vive en el intestino de animales como el ganado vacuno, por lo cual productos alimenticios derivados de este pueden presentar una contaminación durante el procesamiento de la materia prima y transmitirse al ingerir alimentos contaminados cuando no se dio un tratamiento térmico correcto, siendo el grupo poblacional más afectados el de los ancianos y las personas con sistemas inmunológicos deprimidos quienes suelen verse con afectaciones más graves.

3.3 Formulación del problema

¿Estarán las carnes molidas de res expandidas en los supermercados del municipio de Managua contaminadas con *E. coli O157* y con altos niveles de *Escherichia coli* Beta-glucuronidasa en el periodo comprendido de marzo-abril 2020?

IV. Justificación.

Una forma de incidencias de infecciones gastrointestinales e intoxicaciones alimentarias suceden como consecuencia de la falta de higiene en la manipulación, proceso y distribución de los alimentos. Según el Ministerio de la Salud (MINSa) los alimentos de origen cárnico, son productos sensibles a la contaminación por bacterias principalmente por *Escherichia coli O157:H7* y relacionados con enfermedades transmitidas por alimentos; constituyendo un factor de riesgo para el consumidor (Narváez y col., 2005; Marzocca y col., 2006; Kasnowski y col., 2008; Jure y col., 2010).

Debido a la importancia clínica de este microorganismo como causante de enfermedades entéricas que pueden ser de gravedad para los consumidores al ser una bacteria productora de toxina provocando que se dé un aumento de toxiinfecciones en los consumidores y también debido a las pocas investigaciones publicadas en Nicaragua acerca de este agente bacteriano presente en alimentos y que puede afectar a la población se decidió llevar a cabo la presente investigación por medio del análisis requerido del producto para la identificación de *Escherichia coli O157*, en carne molida de res que se expenden en las diferentes cadenas de supermercados del municipio de Managua y poder así contribuir con las autoridades sanitarias en la estandarización de nuevos métodos microbiológicos para la detección de *Escherichia coli O157* según BAM/FDA (BAM/FDA,2017)

V. Preguntas directrices.

¿Qué nivel de contaminación, se obtendrá en el proceso de cuantificación de *Escherichia coli* Beta-glucuronidasa positiva en muestras de carne molida de res expandidas en los supermercados del municipio de Managua?

¿Será el método de PCR en tiempo real una herramienta apropiada para el tamizaje en la detección de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res expandidas en los súper mercados del municipio de Managua?

¿Cuáles serían los parámetros a seguir para aislar *Escherichia coli* O157 en carne molida de res expandidas en los supermercados del municipio de Managua según el Manual Analítico Bacteriológico/Food & Drug Administración (BAM-FDA)?

VI. Objetivos.

6.1 Objetivo general.

Determinar la presencia de *Escherichia coli* O157, en carne molida de res que se expenden en los supermercados del municipio de Managua en el periodo comprendido de marzo-abril 2020.

6.2 Objetivo específico.

1. Cuantificar la cantidad de *Escherichia coli* Beta-glucuronidasa positiva en muestras de carne molida de res expendidas en los súper mercados del municipio de Managua.
2. Detectar la presencia de *Escherichia coli* O157, en carne molida de res expendidas en los supermercados del municipio de Managua mediante la técnica de PCR tiempo real.
3. Aislar *Escherichia coli* O157, en las muestras de carne molida de res expendidas en los supermercados del municipio de Managua según la técnica del Manual Analítico Bacteriológico/Food & Drug Administración (BAM-FDA).

VII. Marco teórico.

7.1 Generalidades de *Escherichia coli*.

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, aerobio y considerado anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, sus cepas forman la mayor parte de la microbiota comensal del tubo digestivo de animales y humanos, eliminando por las heces al exterior. La Organización Mundial de la Salud (2018) afirma que *E. coli* productora de toxina Shiga puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37°C. Algunas pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una actividad de agua (aW) mínima de 0,95 (Organización Mundial de la Salud, 2018).

La importancia de *Escherichia coli* verocitotoxigénicos (VTEC) como agentes causales de toxiinfecciones alimentarias está aumentando en el mundo en general. Entre los VTEC, el serotipo más frecuentemente implicado es el O157; causante de diarrea que puede cursar con heces sanguinolentas, pudiendo ser considerados como la causa más importante de colitis hemorrágica en los humanos (Blanco et al).

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos:

- ***E. coli* Enterotoxigénica (ETEC):** Las ETEC colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA. Su principal mecanismo de patogenicidad son la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST). Sus genes están en un plásmido. La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30% (Rodríguez-Angeles, 2002).
- ***E. coli* Enterohemorrágica EHEC:** Riley describe y relaciona a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre. La capacidad toxigénica de las cepas es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica y diarrea con sangre, ya que la citotoxina STX es el principal mecanismo de patogenicidad de EHEC (Rodríguez-Angeles, 2002).
- ***E. coli* Enteroinvasiva (EIEC):** El mecanismo de patogenicidad de EIEC es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por

endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la EIEC dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes (Rodríguez-Angeles, 2002).

- ***E. coli* enteropatógena (EPEC):** EPEC fue el primer grupo identificado serológicamente; puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad siendo los principales afectados los niños. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/ E) (Rodríguez-Angeles, 2002).
- ***E. coli* Enteroagregativa (EAEC):** Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no corresponden al grupo EPEC. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, las bacterias se adhieren a la superficie de las células y a la superficie del cubreobjetos. En el mecanismo de patogenicidad de EAEC están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se auto aglutinan en una fina película en el epitelio intestinal (Rodríguez-Angeles, 2002).
- ***E. coli* de adherencia difusa (DAEC):** Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad, pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa. El grupo DAEC se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos (Rodríguez-Angeles, 2002).
- ***Escherichia coli* O157:** Pertenece al grupo de *Escherichia coli* enterohemorrágica y una causa de intoxicación alimentaria debido a la producción de verotoxina. En la actualidad hay varios alimentos implicados en la transmisión de STEC O157, aunque inicialmente se relacionó con la carne de vacuno. Griffin y Tauxe establecieron que aproximadamente el 52% de los brotes alimentarios producidos por *E. coli* O157:H7 se relacionan con

productos de origen bovino. Los productos involucrados con gran frecuencia son hamburguesas y carne picada poco cocinada (Navarro, Moreira y Martinez 2017) En 1982 fue reconocido por primera vez como patógeno humano responsable de dos brotes de diarrea sanguinolenta severa que afectaron a 47 personas en EE.UU. (Martínez Mazariego & Platero Reyes, 2007).

7.2 Factores de virulencia.

El subgrupo *E. coli* enterohemorrágico (ECEH) es el serotipo más agresivo para el humano, una cepa STEC para ser considerada EHEC deberá producir intimina y enterohemolisina; existen más de 150 serotipos, el más frecuente a nivel mundial es *E. coli* O157:H7 (Blanco et al. 2003).

Citotoxinas: Las toxinas Shiga (Stx) codificadas por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano. La subunidad A (33 KDa) es la parte biológicamente activa y la B (7,5 KDa), presente en cinco copias, es la que se une al receptor celular específico globotriaosilceramida (Gb3). Las Stxs se clasifican en dos tipos, Stx1 y Stx2, según la neutralización del efecto citotóxico en células Vero o HeLa con anticuerpos específicos, o por la detección de los genes Stx mediante técnicas de biología molecular.

Stx1 es una citotoxina similar a la producida por *Shigella dysenteriae* serotipo 1, pero antigénicamente distinta (O'Brien y Holmes, 1987). La citotoxina *Stx2* tiene poca similitud con *Stx1* y la toxina Shiga (*Stx*) de *S. dysenteriae* tipo 1. Además, *Stx2* no puede ser reconocido y neutralizado por los anticuerpos contra las dos últimas citotoxinas (Scheutz et al., 2012). *Stx1* y *Stx2* también se conocen como verotoxinas (VT).

Plásmido pO157: La catalasa periplásmica está codificada en este plásmido. Se piensa que está relacionada con la virulencia al dar protección oxidativa adicional cuando ocurre la infección del huésped. Es un plásmido de 90 Kb, encontrándose en EHEC O157 y conteniendo diversos genes que codifican para los siguientes factores de virulencia: esp P (serina proteasa extracelular), kat P (catalasa-peroxidasa), hly A (enterohemolisina), etp (sistema de secreción tipo II) y para una fimbria que se podría involucrar en la colonización inicial de los enterocitos. En algunos serotipos de STEC no-O157 se da la identificación de plásmidos con una secuencia similar al pO157.

7.2.1 Factores de adherencia intestinal.

E. coli O157:H7 se mueve a través de la mucosa intestinal usando un flagelo rotatorio comenzando su adhesión cuando detecta señales ambientales con unos pelos como fibras que tienen en su superficie el genoma O157 contiene islas de ADN integrado que codifica factores de virulencia; una de esas islas de ADN es conocida como Locus Enterocyte effacement o LEE.

Codificados en la región LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement) del cromosoma. En la misma se encuentra el gen *eae*, el cual codifica una proteína denominada intimina responsable de la unión de la bacteria a los enterocitos y de la desorganización de las microvellosidades con producción de la lesión AE (del inglés, attaching and effacing). La región LEE codifica además reguladores transcripcionales, chaperonas, el sistema de secreción de tipo III (TTSS) empleado en el transporte de las proteínas efectoras hacia la célula huésped, translocadores, y proteínas efectoras incluyendo al receptor translocado de la intimina denominado Tir (del inglés, translocated intimin receptor). Se considera que ciertos serotipos de ECEH –LEE positivos (O157, O26:H11, O111: NM y O145: NM) son altamente virulentos y asociados a brotes esporádicos de enfermedad severa en humanos (Farfán-García, Ariza-Rojas, Vargas-Cárdenas, & Vargas-Remolina, 2016).

ECEH O157:H7 forma una asociación fuerte con la célula huésped por la interacción de la proteína llamada Tir unida a la intimina (proteína de la membrana externa de la bacteria), la bacteria ingresa la proteína Tir (receptor) que facilita la adherencia a la intimina bacteriana y es indispensable para la formación del pedestal y la lesión intestinal. Una vez dentro de la célula hospedera, la cabeza de Tir se proyecta a la superficie de la membrana del enterocito, donde actúa como receptor para la intimina y para la transmisión de señales después de la interacción en donde la unión causa la atracción de otras proteínas al sitio, la unión Tir-Intimina finalmente provoca la reorganización de la actina, alterando la morfología y formando las lesiones de adhesión y borrado (A/E); las microvellosidades son eliminadas y las bacterias se incrustan parcialmente en la membrana celular de las células huésped denominado lesión de unión y borrado, promoviendo la persistencia de la bacteria en el intestino (Farfán-García, Ariza-Rojas, Vargas-Cárdenas, & Vargas-Remolina, 2016).

Un alto número de bacterias colonizando, de esta manera impide el normal funcionamiento del epitelio intestinal provocando diarreas; en el caso de *ECEH* O157:H7 la liberación de toxinas puede provocar diarreas sanguinolentas y culminando en daño renal (RENAPRA, 2014).

7.3 Patología.

El periodo de incubación de la enfermedad causada por la *ECEH* O157 varía de 1 a 16 días. La mayoría de las infecciones se manifiestan después de 3 a 4 días; sin embargo, el periodo medio de incubación es de 8 días. La dosis infecciosa de esta bacteria podría ser menos de 10 células de *E. coli* O157 pueden ser suficientes para causar la enfermedad en humanos. Entre los síntomas de la enfermedad causada por *E. coli* productora de toxina Shiga destacan los calambres abdominales y la diarrea, que puede progresar en algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica). También puede haber fiebre y vómitos (Organización Mundial de la Salud, 2018).

La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de diez días, pero en un pequeño porcentaje de los casos (especialmente niños pequeños y ancianos) la infección puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). El SHU se caracteriza por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia. Se estima que hasta un 10% de los pacientes con infección por *E. coli* productora de toxina Shiga pueden desarrollar el síndrome hemolítico urémico, con una tasa de letalidad de 3%-5% globalmente. Pueden aparecer también complicaciones neurológicas (como convulsiones, accidente cerebrovascular y coma) en el 25% de los pacientes con SHU, así como secuelas renales crónicas, generalmente leves, en aproximadamente un 50% de los supervivientes (Organización Mundial de la Salud, 2018).

7.4 Transmisión.

Las bacterias *E. coli* verotoxigénicas pueden transmitirse al hombre a través de los alimentos por varias vías:

1. En origen: en las explotaciones ganaderas por una inadecuada falta de higiene:
 - A través del contacto directo con animales o canales infectadas con *E. coli*.
 - Indirectamente a través de los alimentos de origen animal y del agua contaminada debida a contaminación de origen fecal.

- La fuente más frecuente es la carne de vacuno y los productos cárnicos de vacuno que hayan sido poco cocinados.
2. En proceso por falta de higiene e inadecuada manipulación de los alimentos:
- Contaminación cruzada en los mataderos y en las fases posteriores de transformación de los alimentos, en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
 - Los manipuladores de alimentos pueden ser portadoras de *E. coli*, de forma que, al manipular los alimentos, debido a deficiencias de higiene, contaminan los alimentos.
 - El agua de riego puede estar contaminada con *E. coli* debido al estiércol, diseminándose a las frutas y verduras frescas regadas con dicha agua. También es muy importante la transmisión secundaria de persona a persona, sobre todo en el ámbito familiar, escolar y de centros de atención de personas mayores (Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria, 2013).

7.5 Prevención.

Para que el consumidor final tenga un correcto acceso a carne inocua, es importante asegurarse de que, durante el sacrificio, faenado, almacenamiento, transporte y distribución de este producto se sigan estrictas medidas de control con el fin de evitar la contaminación y proliferación de microorganismos patógenos. Es necesario que estas prácticas se extiendan a todo el proceso desde el productor primario hasta la oferta del producto en el punto de venta. Las medidas de prevención de la infección por *E. coli* O157 son similares a las recomendadas para otras enfermedades transmitidas por los alimentos. Descritas en cinco claves para la inocuidad de los alimentos, pueden prevenir la transmisión de los agentes patógenos como *E. coli* productora de toxina Shiga (Organización Mundial de la Salud, 2018).

- Medidas educacionales y preventivas por los servicios de salud pública.
- Asegurar una correcta y homogénea cocción de la carne.
- Utilizar distintos utensilios de cocina para trozar la carne cruda y para cortarla antes de ser ingerida. Evitar el contacto de las carnes crudas con otros alimentos.
- La implementación de las Buenas Prácticas Ganaderas, adecuado con las normas higiénicas debidas y el agua de bebida de los animales debe provenir de sitios limpios, en caso de emplear agua reciclada, ésta debe sufrir un tratamiento de purificación para asegurar que

esté libre de *E. coli*, y los pozos de agua deben estar cubiertos para evitar la contaminación con heces.

- Incluir en los programas de capacitación y sensibilización del personal operativo, aspectos asociados a las patologías por *E. coli* ETEC y VTEC.

7.6 Método de cuantificación de *Escherichia coli*

Agar TBX Cromogénico.

Agar TBX Cromogénico (Tryptona Bilis X-Glucurónido) se basa en el medio Agar Tryptona Sales Biliares, utilizado para detectar y enumerar *E. coli* en alimentos, con la adición de un agente cromogénico, α - β -D-Glucurónido, para detectar la presencia de la enzima glucuronidasa, que es altamente específico para *E. coli* (Condalab, 2019).

El cromóforo liberado en TBX Agar está coloreado y las colonias diana se identifican fácilmente. *E. coli* absorbe el agente cromogénico α - β -D-glucurónido, y la actividad de la enzima glucuronidasa intracelular rompe el enlace entre el cromóforo y el glucurónido. El cromóforo liberado se colorea y se acumula dentro de las células, lo que hace que las colonias de *E. coli* sean de color azul verdoso. La peptona de caseína proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento (Condalab, 2019).

Las sales biliares son inhibidores de otros organismos Gram-positivos y suprimen las bacterias coliformes. El agar bacteriológico es el agente solidificante. ISO 16649 especifica un método horizontal para la enumeración de *E. coli* β -glucuronidasa positiva en productos destinados al consumo humano o para la alimentación de animales (Condalab, 2019).

7.7 Métodos de detección de *Escherichia coli* O157.

Métodos de Enriquecimiento.

Agua de peptona tamponada modificada con piruvato (mBPWp):

El agua de peptona tamponada modificada con piruvato (mBPWp) se utiliza para el aislamiento de *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) en un entorno de laboratorio. El agua de peptona tamponada modificada con piruvato (mBPWp) no está destinada a ser utilizada en el diagnóstico de enfermedades u otras condiciones en humanos (NEOGEN, 2019).

El agua de peptona tamponada modificada con piruvato se recomienda en la preparación de muestras para el método de cribado según el protocolo de la FDA/BAM para *E. coli*

enterohemorrágica (ECEH). Después de que la muestra se incubó durante cinco horas en el agua de peptona tamponada modificada con piruvato, se añaden varios agentes antimicrobianos, seguido por un periodo de incubación adicional. Estos suplementos antimicrobianos suprimen eficazmente la flora normal, mientras permiten el crecimiento de las células viables de O157:H7 (incluyendo STEC), y son capaces de detectar <1 UFC/g en alimentos. Se consiguió una recuperación mejorada de *E. coli* patógena de productos difíciles con el enriquecimiento de agua de peptona tamponada modificada con piruvato (NEOGEN, 2019).

7.7.1 Métodos de aislamiento.

7.7.1.1 Medios de cultivos.

Varias especies bacterianas pueden ser tan semejantes morfológicamente que no sería posible su diferenciación únicamente con la utilización de un microscopio. En estos casos, para la identificación de una bacteria en especial, se deberán estudiar sus características bioquímicas sembrándolas en medios de cultivos especiales.

Agar MacConkey con sorbitol + antibióticos

El Sorbitol MacConkey Agar (SMAC) es un medio de diferenciación parcialmente selectivo para el aislamiento de *E. coli* O157:H7. Habitualmente, las cepas O157 son diferentes de las cepas normales de *E. coli* por dar resultado negativo a sorbitol y beta-glucuronidasa (β -gluc). El agar MacConkey con sorbitol es una modificación de la fórmula proporcionada por Rappaport y Henig para aislar los serotipos 011 y 055 de *Escherichia coli* enteropatógena. Este medio emplea sorbitol y no lactosa para aislar y diferenciar los serotipos enteropatógenos de *E. coli* que tienden a dar resultados negativos a sorbitol. Se puede utilizar para el análisis de muestras clínicas y alimentos (BD Diagnostic Systems, 2003).

En **BD MacConkey Agar con Sorbitol**, las peptonas son fuentes de nitrógeno. D-Sorbitol es un carbohidrato fermentable. La mayoría de las cepas hemorrágicas de *E. coli* no fermentan D-sorbitol y producen colonias incoloras en agar MacConkey Sorbitol. Las sales biliares y el cristal violeta son agentes selectivos que inhiben el crecimiento de organismos gram positivos. El rojo neutro es un indicador del pH (BD Diagnostic Systems, 2003).

La adición de Cefixime y Telurito reduce significativamente el número de no fermentadores de sorbitol que deben analizarse durante el intento de aislamiento de *E. coli* O157: H7. La Cefixime

inhibe *Proteus* spp. y el Telurito inhibe a las *E. coli* distintas a la *E. coli* O157 y a otros organismos, mejorando así la selectividad del medio.

7.7.2 Medios de identificación.

7.7.2.1 Pruebas bioquímicas.

Se debe confirmar bioquímicamente que las colonias sospechosas que crecen sobre los medios sólidos son de *E. coli* 0157.

- **Prueba de Rojo de Metilo (RM):** Esta prueba permite diferenciar 2 vías metabólicas para la utilización de la glucosa: ácido mixto y butanodiólica. Las bacterias RM positivas producen grandes cantidades de ácidos, capaces de disminuir el pH < 4.4. Las bacterias RM negativas continúan metabolizando los ácidos hasta productos neutrales que causan una reversión del pH inicial hasta 6.0 Este comportamiento diferencial se pone en evidencia al agregar un indicador de pH (Rojo de Metilo) que vira de color al rojo si el pH del medio es menor de 4.4 no varía de color si el pH está por encima de ese valor o es amarillo si el pH es > 6.2 (CNDR, 2004).
- **Voges Proskauer (VP):** Evalúa la utilización de la glucosa por una vía alterna a la del ácido pirúvico. El producto terminal es el acetyl-methyl-carbinol (acetoína, 3-hidroxi-2-butanona), Acetyl-methyl-carbinol (acetoína) es un intermediario en la producción de glicol de butileno a partir de la fermentación de la glucosa. En la producción de acetoína se detecta después de la adición de los reactivos VP después de la incubación. La presencia de acetoína es indicado por el desarrollo de un color rojo dentro de 5 a 20 min. (BD Diagnostic Systems, BD Diagnostic Systems Europe, 2007).
- **Agar Citrato Simmons:** Esta prueba detecta aquellos organismos que son capaces de utilizar el citrato, en forma de sal de sodio, como única fuente de carbono. Los organismos capaces de utilizar el citrato producen metabolitos alcalinos que cambian en el color del indicador de verde (ácido) a azul profundo (alcalino). Cualquier grado de azul debe considerarse positivo. Ciertos microorganismos no siempre producirán el "fuerte" ideal cambio de color positivo. Los tonos más claros

del mismo color básico también deberían ser considerado positivo. (BD Diagnostic Systems, BD Diagnostic Systems Europe, 2007).

- **MIO (Movilidad, Indol y Ornitina):** Es un medio que se utiliza para determinar la presencia de flagelos. Detecta la producción de indol a partir del metabolismo de triptófano por la enzima bacteriana triptofanasa es detectado por el desarrollo de un color de rosa a rojo después de la adición del indolente de Kovacs que se añade después de 18 a 24 horas de incubación del tubo. La descarboxilación de la ornitina, que da lugar a la formación del producto final alcalino putrescina, se indica por un cambio en el color del indicador en el medio de amarillo pálido (ácido) a púrpura (alcalino). El medio permanece amarillo si no se produce la descarboxilación de la ornitina. (BD Diagnostic Systems, BD Diagnostic Systems Europe, 2007).

7.7.3 Métodos de confirmación.

7.7.3.1 Reacción en la cadena de polimerasa (PCR).

Es una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia, donde se produce una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos en los que la secuencia blanca es amplificada tal cual. Por ello, es importante la actividad que realiza la enzima ADN polimerasa, la cual posee la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. En la reacción, si usamos como sustrato ADN genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR (Varela, y otros, 2008).

Frente a las limitaciones que se han indicado de métodos convencionales las técnicas moleculares son un método en el que se pueden detectar de forma sensible y específica la bacteria objetivo; debido a la tecnología que utiliza el PCR en Tiempo Real se reconoce como una valiosa herramienta en el análisis de muestras de alimentos. El empleo de métodos como el PCR en Tiempo Real es el que sirve de base para muchas técnicas de detección de patógenos entre las que se encuentran la detección de STEC incluyendo *E. coli* enterohemorrágica. (David Tomas, 2011).

El método PCR configurado para la plataforma SmartCycler II, es específico para la detección de los genes *stx1* y *stx2* (toxina Shiga) y el polimorfismo de un solo nucleótido +93 en el gen *uidA* que codifica la β -D-glucuronidasa (Jinneman, Yoshitomi, & Weagant, 2003) Una mutación puntual altamente conservada en la posición 93 del gen *uidA* (β -glucuronidasa) se produce en

O157:H7 y cepas no móviles de O157, incluyendo atípico O157:H7. La detección de los genes *stx1* y *stx2* y el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en la posición 93 son la base de un ensayo de mutación de amplificación de desajuste múltiple y pruebas de hibridación de sonda de oligonucleótidos (Jinneman, Yoshitomi, & Weagant, 2003).

Principio.

- **Desnaturalización:** Al ser el ADN una molécula compleja de doble cadena, es necesario que se encuentra como simple cadena para poder empezar la reacción, por ello el material genético se lleva a calor controlado unos minutos para poder romper los enlaces que mantienen unidos estas cadenas. Se realiza a aproximadamente 95°C (Rivas, Miliwebsky, & deza, 2007).
- **Hibridación:** Una vez que el material genético ha sido desnaturalizado se mantiene la temperatura a un rango determinado (entre 40 – 60°C) para que cada “primer” se una a la región específica dentro de la cadena de ADN. Mantener la temperatura adecuada va a depender del tipo de “primer” con el que se trabaje, ya que, si la temperatura no llega a ser la adecuada la unión del “primer” será inespecífica o incompleta (Rivas, Miliwebsky, & deza, 2007).
- **Extensión:** Es la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la enzima, tomando como molde la cadena de ADN previamente 29 desnaturalizada. La temperatura a la que la polimerasa alcanza su máxima actividad suele ser de 72°C (Rivas, Miliwebsky, & deza, 2007).

7.7.3.2 PCR en tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real es la capacidad de controlar el progreso de la PCR a medida que ocurre (es decir, en tiempo real). Por lo tanto, los datos se recopilan durante todo el proceso de PCR, en lugar de al final de la PCR. Esto revoluciona completamente la forma en que uno aborda la cuantificación basada en PCR de ADN y ARN. En la PCR en tiempo real las reacciones se caracterizan por el punto en el tiempo durante el ciclo cuando se detecta por primera vez la amplificación de un objetivo en lugar de la cantidad de objetivo acumulada después de un número fijo de ciclos. Cuanto mayor es el número de copias iniciales de la diana de ácido nucleico, antes se observa un aumento significativo en la

fluorescencia. Por el contrario, un ensayo de punto final (también llamado "ensayo de lectura de placa") mide la cantidad de producto de PCR acumulado al final del ciclo de PCR (Scientific, s.f.).

7.7.3.3 Antisuero de *E. coli* 0157.

Estos antisueros se utilizan para confirmar la presencia de *E. coli* O157:H7 después del aislamiento selectivo (Becton, Dickinson and Company, 2016).

La técnica serológica se basa en la reacción de un antisuero específico con su antígeno homólogo. Mientras que la especificidad de los métodos serológicos no es absoluta, la determinación de serotipos de *E. coli*, junto con las características bioquímicas, puede proporcionar una identificación exacta del agente etiológico (Becton, Dickinson and Company, 2016).

VIII. Diseño metodológico.

Tipo de estudio.

Descriptivo, transversal

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal con el propósito de determinar *Escherichia coli* O157 en carne molida de res expendida de los supermercados del municipio de Managua en el periodo comprendido marzo-abril 2020.

Área de estudio.

Supermercados del municipio de Managua que expenden carne molida de res de los dos tipos económica y súper.

Universo.

El universo estuvo comprendido por los 46 supermercados existentes del municipio de Managua entre los cuales están distribuidas en: Cadena A, Cadena B, Cadena C, Cadena D y Cadena E.

Muestra.

La muestra estuvo constituida por 2 lotes (1 lote de carne económica y un lote de carne súper) de cada supermercado, de los cuales se obtuvieron 5 submuestras por cada lote, por lo tanto, al ser 10 supermercados muestreados, se obtuvieron 50 submuestras de carne económica y 50 submuestras de carne súper, equivalente a un total de 100 submuestras de carne molida analizadas de todos los supermercados.

Muestreo.

El tipo de muestreo utilizado fue probabilístico aleatorio estratificado, se seleccionaron 10 de los 46 supermercados del universo, donde se utilizó el programa Microsoft Excel 2010, para conocer la cantidad exacta en las distintas cadenas de supermercados a muestrear de forma aleatorio. (Ver anexo 2. Tabla. N°1, distribución de supermercados del universo y Tabla. N°2, distribución aleatoria de supermercados a muestrear por cadenas).

Tipo de muestreo.

Muestreo Probabilístico aleatorio estratificado.

Criterios de inclusión.

- Que los productos fueran de los supermercados seleccionados.
- Que el producto fueran carne molida fresca.
- Que el producto fuera expedido a granel.

Criterios de exclusión.

- Que los productos fueran de otros supermercados no seleccionados.
- Productos empacados.
- Productos congelados

Consideraciones éticas.

Se realizó una carta solicitando el permiso del procesamiento de las muestras dirigida a la dirección del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) y se envió el protocolo de trabajo a la dirección de regulación de alimentos del Ministerio de Salud y al Dr. Carlos Sáenz Torres, para poder obtener la aprobación del tema y así ser llevado a cabo. Por motivos de ética las marcas de los productos y los nombres de las cadenas de supermercados donde se realizó el muestreo de las carnes molidas de res se manejaron de manera confidencial; solo fueron del conocimiento de los autores, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) y dirección de regulación de alimentos del Ministerio de Salud para el respectivo seguimiento y control.

Métodos, técnicas e instrumentos para recolectar la información.

- **Instrumento.**

Fichas de recolección de datos.

Una ficha es un instrumento en los cuales se hace un acopio o evidencia por escrito de información importante que hemos encontrado en nuestros procesos de búsqueda de información y que deseamos tener al alcance de nuestras manos en cualquier momento (Merida, 2006).

- **Muestreo y Transporte de la muestra.**

Para la obtención de la muestra nos dirigimos a los distintos supermercados seleccionados aleatoriamente; muestreo que se llevó a cabo en compañía del personal del Ministerio de Fomento Industria y Comercio (MIFIC) y del departamento de regulación de alimentos del MINSA, quienes nos facilitaron el permiso de las recolecciones de muestras sin ningún costo, proporcionando los medios adecuados para el transporte de las carnes molida; en el proceso del muestreo se hizo uso de fichas para la recolección de datos concernientes al producto de la investigación. Se recolecto ½ libra de carne molida de res por cada submuestra en las condiciones normales de venta al público, luego se trasladó al laboratorio de Centro de diagnóstico y Referencia (CNDR), donde se nos facilitaron las áreas analíticas, los reactivos y materiales para llevar a cabo el procesamiento de las muestras y su análisis para detectar la presencia de *Escherichia coli* 0157.

Materiales e Instrumentos a utilizar:

- Stomacher 400 circulator.
- Balanza analítica.
- Campana de seguridad tipo
- Centrifugadora 5424 – Eppendorf.
- Pipetas automáticas.
- Step One Plus Applied Biosystems.
- Vortex 8. Incubadora.
- Thermo Mixer confort – Eppendorf.
- Pipetas (volumen de 1 a 10 ml)
- Puntas de pipeta (volumen de 0.2 a 1000 µl)
- Incubadoras: 36 ° C ± 1 ° C y 42 ° C ± 1 ° C
- Viales
- Guantes
- Gradillas
- Tijeras
- Pinzas
- Mecheros

- Bolsas stomacher
- Platos Petri 20 × 150 mm.
- Espátulas
- Medios de cultivos
- Antibióticos

Procesamiento y análisis de las muestras.

Cuantificación de *E. coli* β-glucoronidasa positiva:

Preparación de la muestra

- Pesar 11 gramo de la muestra de carne molida de res en una bolsa stomacher en la balanza
- Agregar a las bolsas 99 ml de Agua Bufferada estéril en una relación 1:1 (1g/ml).
- Todo el contenido de la bolsa se homogeniza en el agitador orbital o Stomacher, dependiendo del volumen de la muestra, por 30 segundos.
- Realizar diluciones de 10¹ hasta 10³ en tubos con agua bufferada y sembrar por esparcimiento en Agar TBX
- Incubar a 44,5 °C por 18-24 horas.
- Características de colonias en agar TBX: colonias de color verde-azulado

Aislamiento de *Escherichia coli* O157 según el BAM-FDA

Enriquecimiento.

- Pesar 25 gramos de la muestra.
- Agregar a la bolsa 225 ml de Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPWp).
- Mezclar.
- Incubar a 37°C durante 5 horas, agregar al Agua Peptonada Bufferada modificada con piruvato los suplementos Acriflavin – Cefsulodin – Vancomicina (ACV).
- Incubar a 42 °C durante 24 horas.

Preparación de la plantilla de ADN:

- Transfiera 500 µl de enriquecimiento nocturno a un tubo de microcentrífuga.
- Centrifugue 12,000 × g durante 3 min.

- Eliminar el sobrenadante y resuspender completamente el sedimento en 500 µl de NaCl al 0,85%.
- Centrifugar 12,000 × g durante 3 min.
- Eliminar el sobrenadante y resuspender completamente el sedimento en 500µl de agua estéril.
- Colocar en baño de agua o bloque de calor capaz de mantener 100 ° C durante 10 min.
- Centrifugue 12,000 × g durante 1 minuto. Retire y guarde el sobrenadante como plantilla de ADN (esto puede congelarse, mínimo -20 ° C, para futuras pruebas de PCR).
- Haga una dilución 1:10 de esta plantilla y use 1 µl para la prueba por PCR en tiempo real.

Para cultivos puros (incluyendo cultivos de control), se puede preparar 500 µl de cultivo de caldo o crecimiento de colonias a partir de placa de agar suspendida en solución salina al 0,85% como en los pasos a-g anterior. Las plantillas pueden congelarse a un mínimo de -20 ° C para uso futuro.

Controles de PCR:

Para un control positivo de PCR, se utilizó una cepa de referencia *Escherichia coli* CECT 4783 Cepa Toxigénica.

PCR en Tiempo Real:

El PCR en Tiempo Real se realizó siguiendo las recomendaciones de los autores con unas pequeñas variantes, se usó el equipo StepOne Plus de Applied Biosystems con un volumen total (mezcla de reacción) de 10 µl. La amplificación se realizó mediante las siguientes condiciones de termociclado que fueron: paso de activación inicial 1 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 10 segundos a 94° C y 40 segundos a 63 °C, la Sonda UidAP266 fueron leídas por el canal FAM (530 nm), el control interno fue leído en el canal VIC (554 nm), debido a que el laboratorio no cuenta con la capacidad para crear un fragmento de ADN artificial que sirva como control interno se usó un control interno TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents VIC Probe de la casa comercial Applied Biosystems. (BAM/FDA, 2017)

Reactivo	Concentración
GoTaq® qPCR Master Mix.	1 x
10XExo IPC Mix (Applied Biosystems)	1 x
50XExo IPC Mix (Applied Biosystems)	1 x

UidAF241	AF305917	21	0.25
CAg TCT ggA TCg CgA AAA CTg			
UidAR383	AF305917	22	0.3
ACC AgA CgT TgC CCA CAT AAT T			
UidAP266	AF305917	15	0.3
FAM-ATT gAg CAg CgT Tgg-MGB/NFQ			

Ver anexo. Tabla. 8.2, Protocolo de PCR Tiempo Real

Aislamiento.

- Después de 24 h de incubación en el medio de enriquecimiento APBp + Antibióticos, realizar diluciones con buffer 10^2 hasta 10^4 y sembrar por esparcimiento en Agar MacConkey + sorbitol +Telurito de Potasio 5 mg/L + Cefixime 0.1 mg/L.
- Incubar a 37°C por 18-24 horas.
- Características de colonias en agar SMAC-T: colonias pequeñas y transparentes.
- Las colonias típicas sospechosas, estriar en Agar TSA con disco ColiComplite, este paso fue sustituido por un agar cromogénico, agar TBX, ya que en el momento del estudio no se contaba con dicho agar, incubar a 44.5°C por 18-24 horas para observar si presenta B-glucuronidasa-Negativa

Pruebas confirmatorias:

Rojo de Metilo

- Inclinar el tubo e inocular colonias sospechosas de *Escherichia coli* O157, tocando la superficie interna del tubo, en el ángulo agudo del menisco formado por el caldo.
- Incubar a 35°-37°C durante 18-24 horas.
- Agregar 2 gotas de Rojo de Metilo, leer inmediatamente la reacción.
- Positivo: Presencia de anillo rojo.
- Negativo: Presencia de anillo amarillo.

Voges Proskauer:

- Inclinar el tubo e inocular colonias sospechosas de *Escherichia coli* O157, tocando la superficie interna del tubo, en el ángulo agudo del menisco formado por el caldo.

- Incubar a 35°-37°C durante 18-24 horas.
- Agregar 4 gotas de KOH al 40%.
- Agregar 6 gotas de Alfaftol. Leer la reacción luego de 30 minutos.
- Positivo: Presencia de anillo color Zapote.
- Negativo: Presencia de anillo color amarillo.

Producción de Indol.

- Inocular colonias sospechosas de *Escherichia coli* O157 en MIO e incubar a 37°C por 18-24 horas.
- Luego agregar 3-4 gotas de reactivo de Kovac por la pared interna del tubo.
- Positivo: Presencia de anillo rosado/rojo
- Negativo: Presencia de anillo amarillo.

Prueba de citrato.

- Tomar una colonia aislada sospechosa de ser *Escherichia coli* O157, y se inocula en estría en la superficie del medio (pico de flauta).
- El tubo se incuba a 37°C durante 18-24 horas.
- Positivo: Viraje de color del medio al azul
- Negativo: No hay viraje de color, se mantiene de color verde

Prueba serológica (Antisuero de *E. coli* 0157).

- Coloque dos gotas separadas de solución salina normal (cloruro sódico al 0,85%) en un portaobjetos de vidrio limpio.
- Tome una colonia sospechosa de *Escherichia coli* de la placa de cultivo y mezcle cuidadosamente con ambas gotas de solución salina normal sobre el portaobjetos para obtener una suspensión lisa.
- Añada una gota de antisuero a una de las gotas de suspensión bacteriana en el portaobjetos y al otro (control), añada una gota de solución salina normal.
- Mezcle el antisuero con la suspensión bacteriana usando un palillo de dientes. Luego mezcle la solución salina (control) con un palillo de dientes nuevo.

- Mueva suavemente el portaobjetos hacia delante y atrás durante un minuto y observe si hay aglutinación en condiciones de iluminación normales o usando un objetivo de bajo aumento.

Plan de tabulación y análisis.

Para la elaboración y redacción del documento se utilizó el programa de Microsoft office Word 2010, en el análisis estadístico, la realización de tablas y gráficos se hizo en Microsoft office Excel 2010 y Microsoft office PowerPoint 2010 para elaborar de la presentación de la defensa.

IX. Operacionalización de las variables.

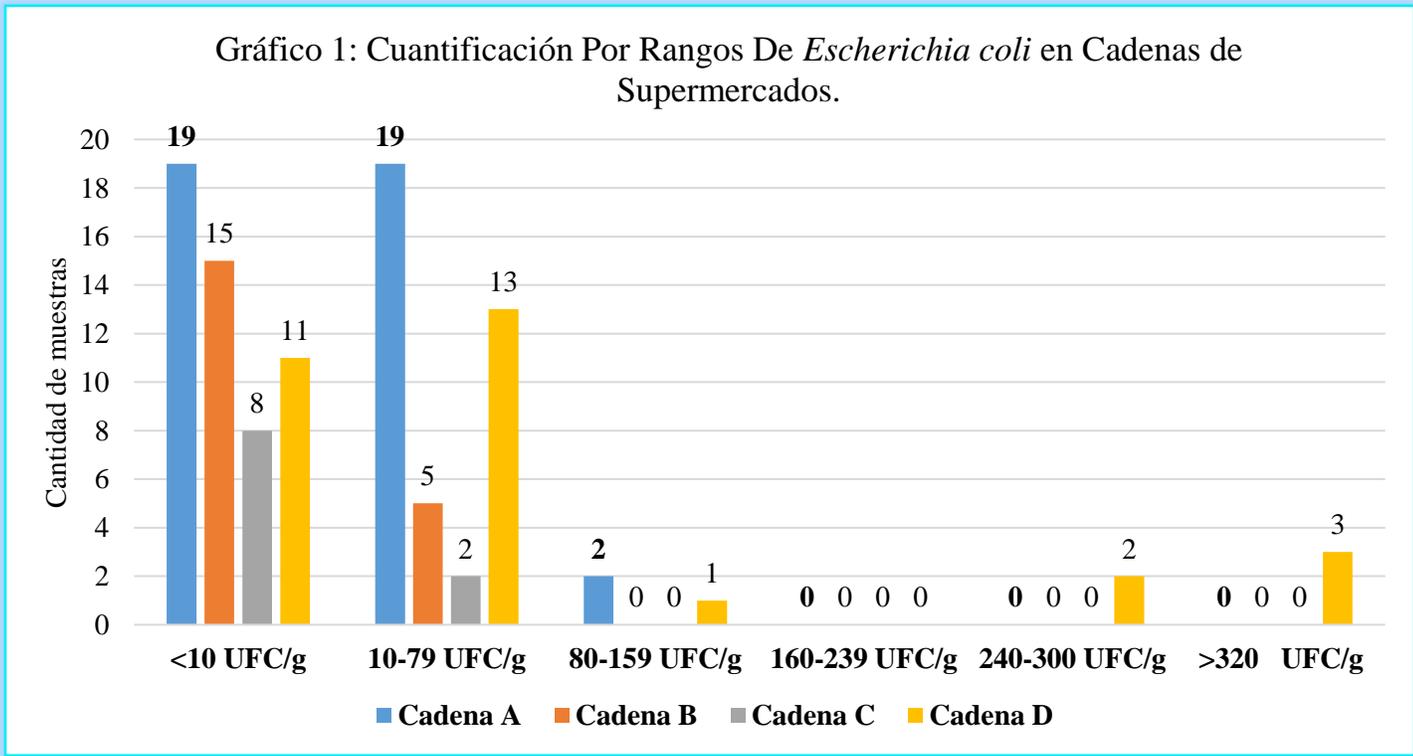
Variable	Subvariable	Indicador	Valor	Criterios
Cuantificación de <i>Escherichia coli</i> en muestras de carnes.		Agar TBX	Conteo de colonias β -glucuronidasa positivas	UFC/g
	Detectar la presencia de <i>Escherichia coli</i> O157	PCR en tiempo real	Ct (Ciclo de umbral)	Positivo
Negativo				
Aislar <i>Escherichia coli</i> O157		Agar MacConkey con sorbitol+antibiótico	Fermenta	Si
			No fermenta	No
		Rojo de Metilo (RM)	Anillo Rojo	Positivo
			Anillo Amarillo	Negativo
		Voges Proskauer (VP)	Anillo Zapote	Positivo
			Anillo Amarillo	Negativo
		Citrato	Azul	Positivo
			Verde	Negativo
		Movilidad	Turbidez	Positivo
			Transparencia	Negativo
		Indol	Anillo rosa/rojo	Positivo
			Anillo amarillo	Negativo
		Ornitina	Intensificación del color violeta	Positivo
			Color violeta normal	Negativo
		Antisuero de <i>E. coli</i> O157	Aglutinación	Reactor
			No aglutinación	No reactor

X. Análisis y discusión de los resultados

Es de gran relevancia encontrar microorganismos que puedan afectar la salud de los consumidores de productos cárnicos; entre estos se encuentran: *Escherichia coli*, que es un indicador de la existencia de una contaminación fecal y *Escherichia coli* productora de toxina shiga, que es uno de los patógenos más comunes, que afectan muchas veces con consecuencias graves o mortales, a las personas que consumen alimentos contaminados con esta bacteria; siendo los productos de carne picada cruda o poco cocinada uno los principales orígenes de los brotes de *E. coli* productora de toxina Shiga (OMS, 2018)

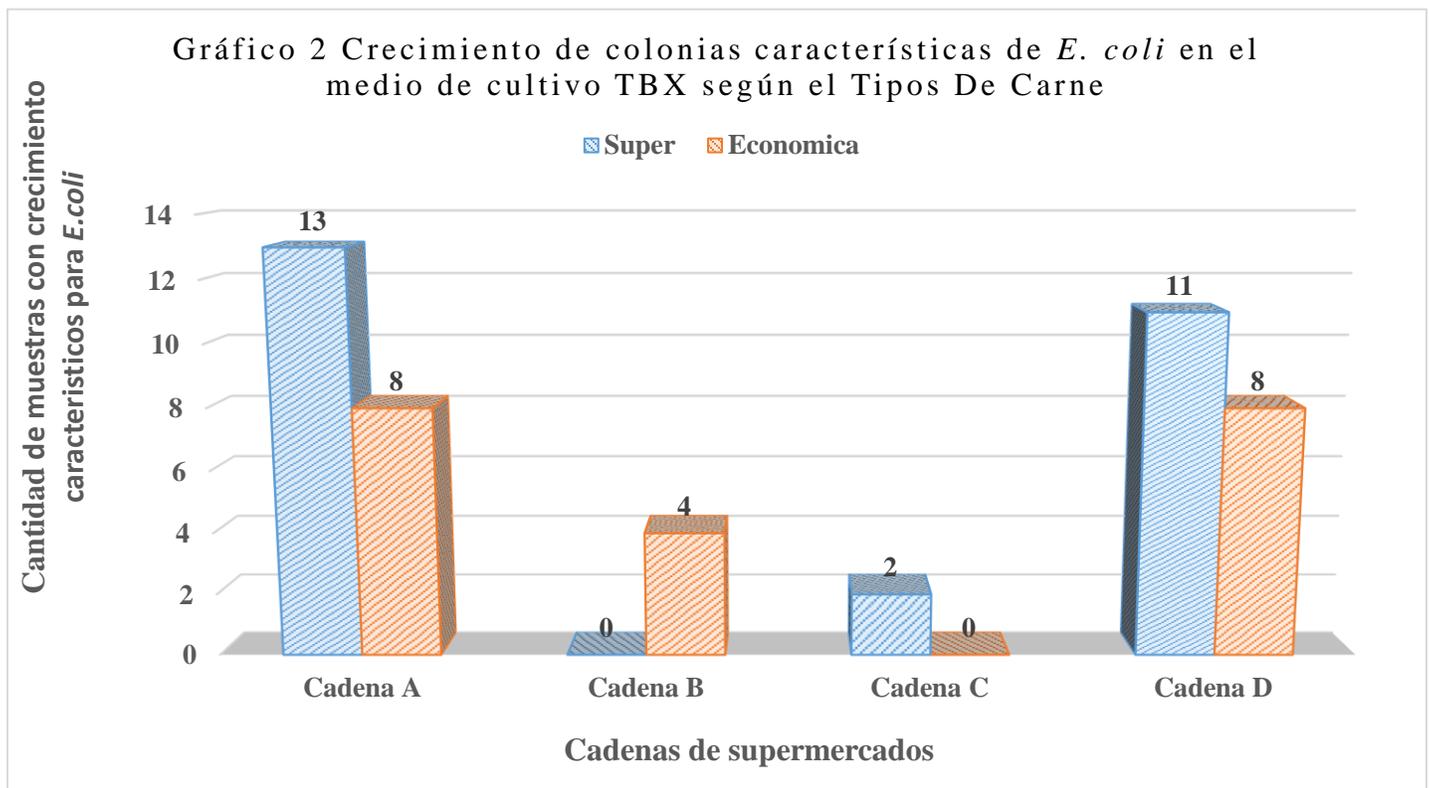
En este estudio se analizaron 100 muestras de carne molida de res que se componen de 2 tipos de carne (Súper y económica) expandidas en 10 supermercados de Managua; seleccionados aleatoriamente del total de 46 supermercados con el objetivo de lograr la Cuantificación de *E. coli* y el aislamiento de *Escherichia coli* O157, en las muestras que cumplieran con los criterios de inclusión planteados.

Cuantificación de *Escherichia coli* en carne molida de res por el método de vertido de agar TBX en placas de medio cromogénico altamente selectivo.



El **gráfico 1** nos refleja los resultados de la Cuantificación por rangos de *Escherichia coli*, según las cadenas de supermercado. En la Cadena A evidenciamos 19 muestras <10 UFC/g donde no encontró crecimiento de *Escherichia coli*, 19 muestras con rangos de 10-79 UFC/g y 2 muestras entre 80-159 UFC/g. En la Cadena B obtuvimos 15 muestras <10 UFC/g sin crecimiento de *E. coli* y 5 muestras entre 10-79 UFC/g. En la Cadena C se encontró 8 muestras <10UFC/g donde no se presencié crecimiento de *E. coli* y 2 muestras en los rangos 10-79 UFC/g. Finalmente en la Cadena D 11 muestras <10 UFC/g, 13 muestras en el rango de 19-79 UFC/g, 1 muestra en el rango 80-159 UFC/g, 2 muestras en el rango de 240-300 UFC/g y 3 muestras en el último rango de >320 UFC/g que evidencia la presencia de *E. coli*.

Cuantificación de *Escherichia coli* por tipos de carne



El **gráfico 2** nos presenta la Cuantificación de *Escherichia coli*, en carne molida de res Super y Económica, prevaleciendo la presencia de *Escherichia coli*, en la carne molida de res Super con 13 muestras en la Cadena A, 2 muestras en la Cadena C y 11 muestras en la Cadena D para un total de 26 muestras con *E. coli*. Mientras que en la carne molida de res Económica se observó la presencia de *E. coli*, en la Cadena A 8 muestras, 4 muestras en la Cadena B y 8 muestras en la Cadena D para un total de 20 muestras con *E. coli*.

Es de gran importancia la cuantificación de *Escherichia coli*, en carne molida de res para determinar la calidad microbiológica que el producto presenta, ya que el hallazgo de esta es un indicador de contaminación de origen fecal. En los resultados del estudio de la cuantificación un 46% de las muestras se demostró presencia de *E. coli* y un 54% no se encontró el crecimiento de este microorganismo.

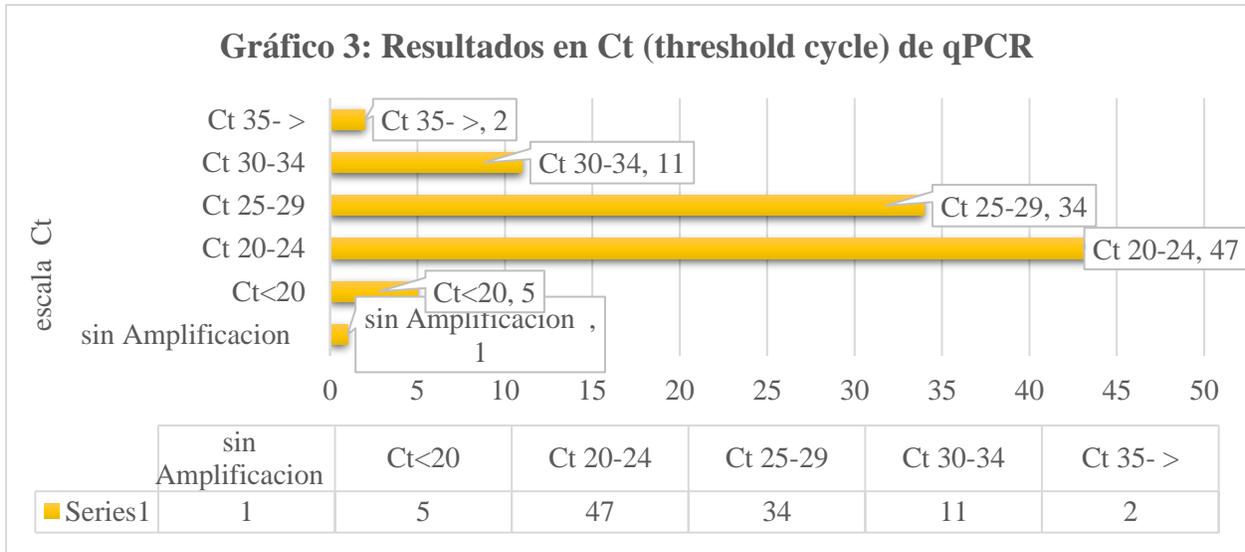
Teniendo los resultados de la cuantificación de *Escherichia coli*, podemos evidenciar la importancia de que exista un límite máximo permitido en productos de carne molida en los criterios microbiológicos de la próxima revisión del reglamento técnico centroamericano (RTCA), teniendo en cuenta que en el actual RTCA se encuentran implementados límites máximos permitidos para *Escherichia coli*, en otros tipos de carnes crudas, exceptuando la carne molida de res, ver anexo, N^o 6. Se ha encontrado la implementación de un límite máximo permitido de *E. coli*, en este tipo de carne en otros reglamentos, como el de la unión europea con un límite mínimo de 50 UFC/g y un límite máximo de 500 UFC/g, siguiendo la referencia de la ISSO 16649-1, puesto que es de importancia que existan un control de *E. coli*, en estos tipos de productos alimenticios; porque entre menos control exista de estos, son más propenso a mayor contaminación.

Presenciándose en este estudio que algunas cantidades de este microorganismo en las muestras de carnes, superaron hasta los límites generales permitidos en los otros tipos de carnes crudas; según la RTCA, donde la mayoría tiene un límite máximo permitido de 10 UFC/g y en la cuantificación obtuvimos conteos hasta de 540 UFC/g; asimismo sobrepasa los límites máximos permitidos del reglamento de la Unión Europea. Este resultado podría deberse a un deficiente manejo de estos productos, siendo posible la existencia de una contaminación fecal que podría proceder de los manipuladores de la carne molida de res o de contaminación cruzada en los mataderos.

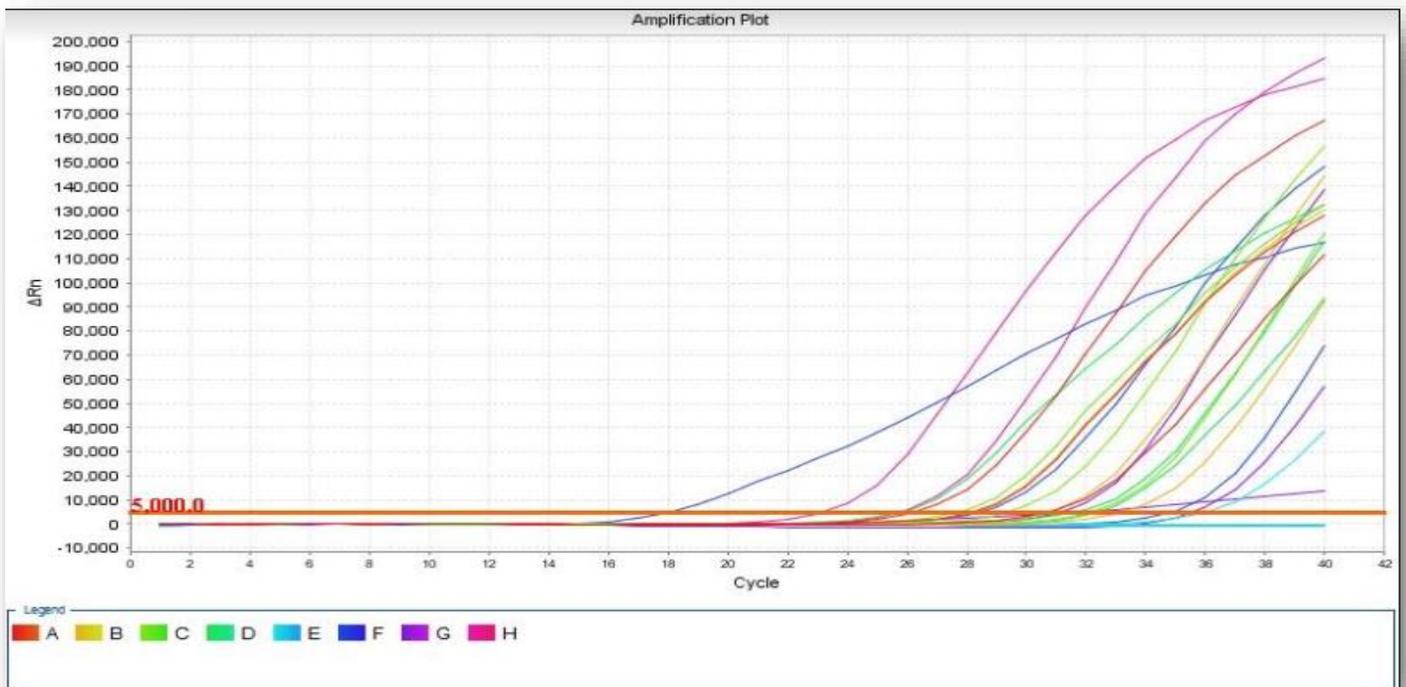
No se encontraron en el país estudios realizados acerca de la cuantificación de *Escherichia coli* en carne molida de res, eso no pretende decir que no existan, tampoco un límite máximo permitido en la RTCA que nos indique si este producto es aceptable o rechazable para el consumo humano.

Determinación de *E. coli* 0157 mediante el método de PCR en tiempo real

Resultados de muestras amplificadas por rangos de CT mediante el método PCR en tiempo real.



En los resultados de Ct obtenidos de las amplificaciones fueron las siguientes: Ct <20 con 5 muestras, Ct 20-24 con 47 muestras, Ct 25-29 con 34 muestras, Ct 30-34 con 11 muestras y Ct 35> con 2 muestras.



Ct (ciclo de umbral) esto hace referencia al número de ciclos en el ensayo; siendo la intersección entre una curva de amplificación y una línea de umbral. Es una medida relativa de la concentración de la diana en la reacción de PCR. Muchos factores afectan el valor absoluto de Ct además de la concentración del objetivo; aumentando el valor de Ct con una cantidad decreciente de plantilla. (Scientific, 2016).

Nuestros hallazgos demuestran la amplificación en 99 muestras con un Ct (threshold cycle o ciclo del umbral) de: mínimo 19.01 hasta un Ct: máximo de 36.02; en 52 de las muestras se encontraron entre los rangos de 20-24 Ct y 47 muestras entre 25-36 Ct, teniendo amplificaciones tardías en la mayoría y dando niveles altos de Ct que indican menor concentración de ADN en las muestras corridas.

El manual analítico bacteriológico (BAM/FDA) advierte que desde la implementación de estos ensayos; se ha notado que el polimorfismo de un solo nucleótido +93 *uidA* no es expresado o se expresan tardíamente; especialmente en muestras que contenían altas concentraciones de *Escherichia coli*; aunque esta no tiene el polimorfismo de un solo nucleótido +93 *uidA*; por lo cual no debería ser detectada por la sonda, pero al contener el gen *uidA* los cebadores se adhieren a esta región amplificando tardíamente la muestra, agotando los reactivos y de esta manera afectando los resultados.

En el estudio se observó un comportamiento similar a lo antes expuesto por la BAM/FDA al obtener amplificaciones tardías, siendo uno de los factores la presencia de *Escherichia coli* en un 46% de las muestras, amplificando de esta forma el gen *uidA* y no el SNP +93*uidA*. Planteándose que los resultados obtenidos de las amplificaciones no se dieron por presencia de *Escherichia coli O157*, sí no a las concentraciones de *E. coli*, como a la presencia de otras enterobacterias que podrían poseer el gen *uidA*, tal fue el caso de una muestra que amplificó tardíamente y con posteriores análisis microbiológicos dio como resultado una cepa de *Enterobacter cloacae*, respaldando así lo antes mencionado.

Nuestros resultados obtenidos mediante el método qPCR aplicado de la BAM/FDA, fueron tomados como falsos positivos. La BAM/FDA ha recomendado actualmente incluir en la técnica de qPCR la utilización de cebadores específicos para la *E. coli O157*, como el gen O157 (*wzy*) más *stx1* y *stx 2* o el gen *uidA +93* más *stx1* y *stx 2*.

Imágenes de resultados de PCR en tiempo real

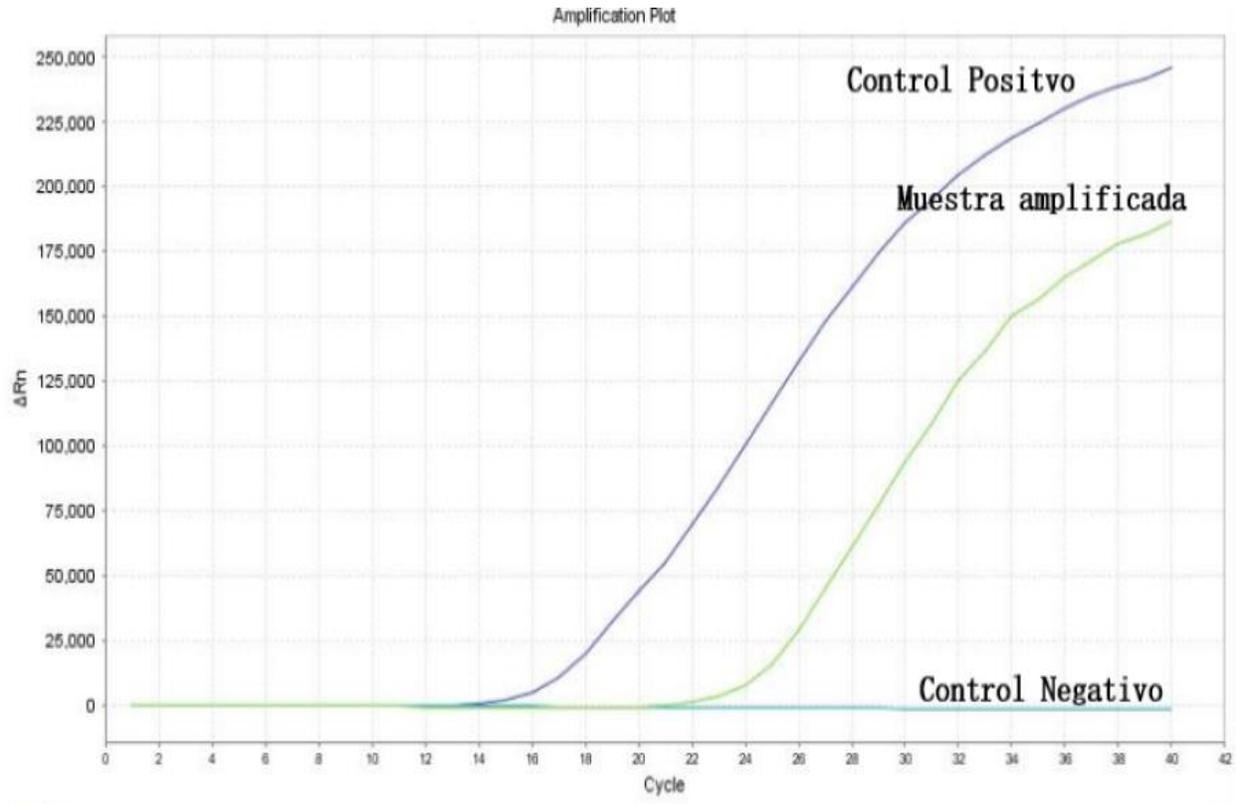
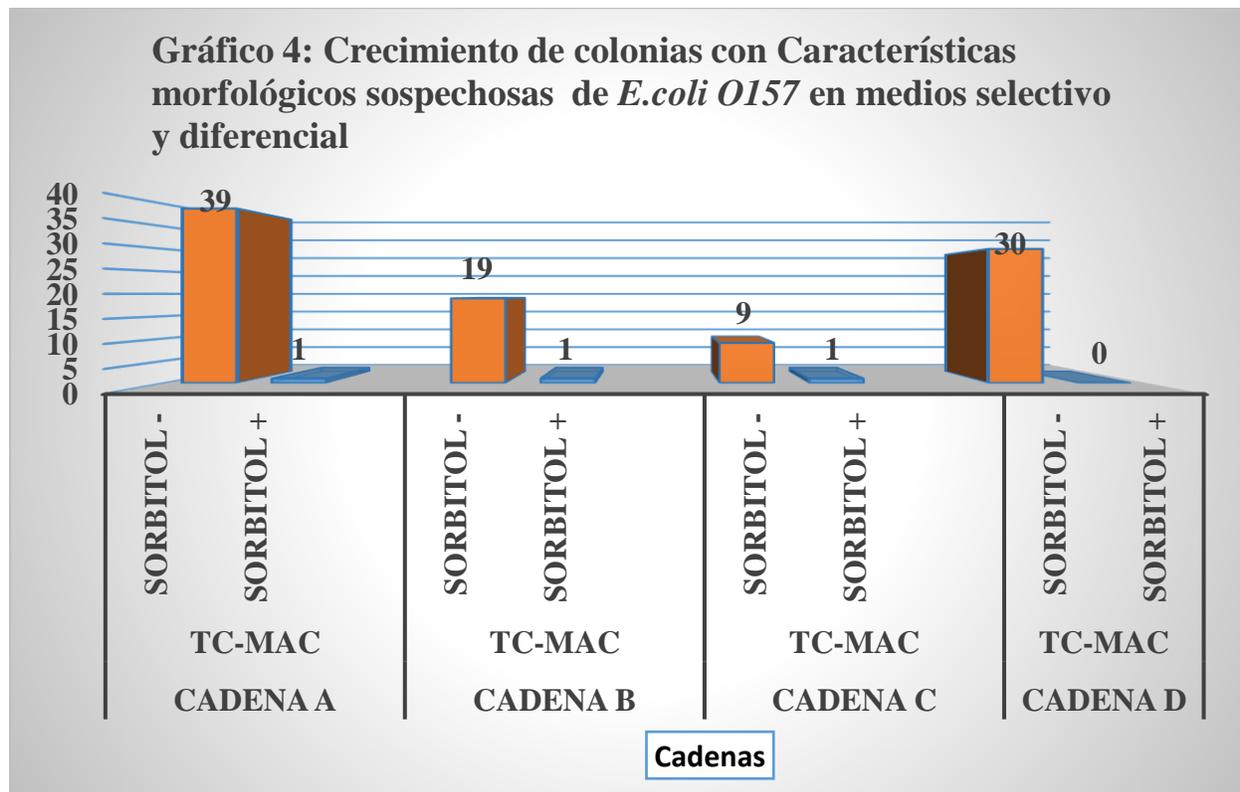


Imagen de qPCR amplificación de la cepa de *Enterobacter cloacae*

Aislamiento de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res según la norma internacional FDA-BAM a través de medios selectivos y diferencial.



El **gráfico 4**, representa los resultados de la utilización del medio de cultivo selectivo y diferencial TC-SMAC para el aislamiento de *Escherichia coli* O157; donde las colonias características de esta bacteria sorbitol negativo son de color beige/transparente. Observándose colonias sospechosas en 97 muestras. Teniendo como resultados en la Cadena **A**: con 39 muestras, Cadena **B**: 19 muestras, Cadena **C**: 9 muestras y la Cadena **D**: 30 muestras; donde posteriormente las muestras sospechosas de *Escherichia coli* O157, se pasaron a una confirmación mediante pruebas bioquímicas y serológicas según los parámetros de la BAM/FDA.

En Nicaragua se encontró un estudio realizado por Berrios y Navarro en 2016, De Diagnóstico Molecular y Convencional de *Escherichia coli* O157, en carne molida de res comercializada en el Mercado Iván Montenegro de la ciudad de Managua; donde se logró aislar 5 de las 10 muestras analizadas para *Escherichia coli* O157, según el método de la BAM/FDA.

El aislamiento realizado en nuestro estudio de *Escherichia coli* O157, no evidencio la presencia de este patógeno en las 100 muestras; pero se logró observar colonias características en los medios de cultivos selectivo y diferencial, así como un comportamiento bioquímico sospechoso para esta bacteria.

En el cual las 97 muestras que presentaron colonias sospechosas de *Escherichia coli* O157, en el agar TC-SMAC y en la prueba complementaria de agar TBX colonias Beta-Glucoronidasa negativa; posteriormente se les realizaron las pruebas bioquímicas, donde solo el 21% de estas muestras reflejaron resultados positivos para *E. coli* en IMVIC (Indol +, RM+, VP-, C-), se realizó finalmente la prueba serológica de Antisero Polivalente para *Escherichia coli* O157; al realizarles esta prueba al 21% de las muestras con IMVIC positivo; ninguna presento aglutinación, tomándose estas muestras como negativas para la presencia de *Escherichia coli* O157.

En un estudio realizado por González, Mazariego, Lemus y Platero Reyes en El Salvador en el 2007, de Determinación de *Escherichia coli* O157:H7, en carne molida de res cruda, comercializada en supermercados del área metropolitana, se obtuvieron resultados similares que en nuestro estudio en los análisis de las muestras, donde se aislaron microorganismos no fermentadores de sorbitol en los medios selectivos-diferenciales; pero en las pruebas bioquímicas en las 20 muestras de carne molida de res cruda no se observaron características propias de *Escherichia coli* O157:H7, al compararse con los resultados obtenidos con la cepa ATCC; la ausencia de características bioquímicas propias de esta bacteria en las cepas aisladas no permitió realizar una confirmación serológica de las cepas de *Escherichia coli* identificadas. Tomándose como negativas el aislamiento para *Escherichia coli* O157:H7; pero si se encontró la presencia de otros microorganismos patógenos incluyendo *Escherichia coli* no serotípica. Y otros tipos de bacterias entéricas predominando *Enterobacter cloacae* en un 25%.

En el estudio que llevamos acabo de igual manera se logró observar en las muestras la presencia de una variedad de microbiota acompañante con características similares a *Escherichia coli* O157; esto podría deberse a posibles contaminaciones a la que puede ser sometida la carne desde el mantenimiento de la res en los campos, mataderos, procesamiento y manipulación hasta llegar al consumidor. La contaminación por estas enterobacterias está relacionada a la flora intestinal de los mamíferos, por lo que no se descarta la contaminación fecal.

Aislamiento de *Escherichia coli* O157 en carne molida de res.

	Cantidad	%
Negativo	100	100%
Positivo	0	0%
Total	100	100%

Se debe tomar en cuenta que este tipo de bacteria STEC tiene características muy diferentes al resto de bacterias del grupo de coliformes y enterobacterias por lo que la mayoría de los métodos convencionales no permiten su detección. Un ejemplo de esto son las normas internacionales para la detección de *Escherichia coli*, en alimento que indican que las cepas de *E. coli* en particular, aquellas que sean Beta-glucoronidasa negativa tales como *E. coli* O157, y otras cepas patogénicas de *E. coli* no se detectan por estos métodos convencionales; por esto se emplean otros parámetros como temperatura e indicadores en los medios de cultivos (ejemplo: Actividad Beta-Glucoronidasa) Además, su baja dosis infectiva que puede sufrir daño subletal y estar unido a la posible presencia de grandes poblaciones de microbiota competitiva y otras cepas de *E. coli*. (David Tomas, 2013)

En un estudio realizado en la UNAN León en el 2016, sobre la identificación de *Escherichia coli* productora de shiga toxina en productos terminados de Bovinos sacrificados en el matadero nuevo CARNIC S.A en el cual no se detectó *Escherichia coli* O157:H7, y otras STEC en muestras de carne bovina faenadas. Según los autores en Nicaragua no existe registro por el ministerio de salud de personas que hayan sido afectadas por estos serotipos de *Escherichia coli*, sin embargo, estudios realizados en el departamento de León, Nicaragua revelaron alta correlación de casos de diarrea en la niñez nicaragüense con los varios serotipos de *Escherichia coli* y algunos casos aislados con EHEC (Reyes, 2010)

XI. Conclusiones.

1. Al realizar la cuantificación para *Escherichia coli*, en carne molida de res mediante agar cromogénico TBX, se pudo evidenciar el crecimiento de colonias características de *E. coli*, en un 46% de las muestras; con la mayor cuantificación de 540 UFC/g; que supera en gran cantidad los límites máximo permitido en los otros tipos de carnes crudas de res según el reglamento técnico centroamericano (RTCA) en el cual tienen un límite máximo permitido 10 UFC/g, siendo respaldado por el reglamento de la Unión Europea el cual tiene un límite máximo permitido de 520 UFC/g, para este tipo de carne.
2. Se obtuvieron amplificaciones en 99 muestras con un Ct (threshold cycle) entre Ct 19.01 hasta un Ct máximo de 36.02; teniendo amplificaciones por la detección del gen *uidA* y no por el polimorfismo de un solo nucleótido +93 *uidA* de *E. coli O157*, resultados que pudieron haberse dado por las concentraciones de *E. coli* obtenidas en el estudio y por otras enterobacterias; ya que estas pueden poseer el gen *uidA*, por lo tanto, será detectada por los cebadores del PCR en tiempo real. Tomando los resultados obtenidos en el estudio por el método aplicado de la BAM/FDA como falsos positivos.
3. En el proceso del aislamiento según la BAM/FDA, para las muestras perteneciente a las 4 cadenas de supermercados, se evidencio la ausencia de *Escherichia coli O157*, al no presentar ninguna muestra que cumpla con todos los parámetros completos del proceso en comparación con la cepa control: *Escherichia coli* CECT 4783 Cepa Toxigénica.

XII. Recomendaciones

A la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua como institución alentadora de la investigación, inste el seguimiento de estudios similares, y que el presente estudio sirva como antecedente a estudiantes del Instituto Politécnico de la Salud POLISAL y profesionales del área de salud; con el fin de dar continuidad y desarrollar más estudios acerca de la Determinación de *Escherichia coli* O157, en productos procesados de carne bovina que se expenden en los supermercados, mercados y carnicerías a nivel nacional, sea con fines académicos o epidemiológicos, esto en coordinación del área de Alimentos y Dirección de Regulación de Alimentos del Centro Nacional de Referencia (CNDR).

A las instituciones de la salud como a otros **laboratorios privados** y **a los futuros investigadores** de *Escherichia coli* O157, en alimento que al momento de la realización del método de PCR en tiempo real incluyan la utilización del gen *wzy* del antígeno O157 combinados con *stx1* y *stx2* como alternativa al gen *uidA* +93 SNP; siendo así recomendado en la última revisión del BAM/FDA para una mejor detección e interpretación en la lectura del qPCR de *Escherichia coli* O157.

XIII. Referencia bibliográfica

- BAM/FDA. (14 de 7 de 2017). *U.S Food&Drug Administration*. Obtenido de U.S Food&Drug Administration: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4a-diarrheagenic-escherichia-coli>
- BD Diagnostic Systems. (2007). *BD Diagnostic Systems Europe*. Obtenido de chrome-extension://ohfaglhttps://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/HB/CE/ETUT/IA-273176.pdf
- Becton, D. a.(Junio de 2003). *BD MacConkey Agar with Sorbitol*. 1-4.Obtenido de <http://www.bd.com>
- CNDR, C. N. (2004). *Manual de Procedimientos de Bacteriología Medica*. Managua, Nicaragua: Litografía Nicaragüense. Obtenido de Ministerio de Salud.
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., & Vargas-Remolina, L. V. (agosto de 2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450. Recuperado el 04 de Noviembre de 2020, de https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000400009
- Feng, L. (1 de Agosto de 1994). Análisis genético de la expresión de uidA en *Escherichia coli* enterohemorrágica serotipo 0157: H7. *Sociedad de Microbiología General*, 1-7.
- Feng, S. D. (2017). *Escherichia coli* diarreagénica. *Manual Analítico Bacteriológico (BAM)*.
- Fundación vasca para la seguridad agroalimentaria. (28 de febrero de 2013). *Elika*. Obtenido de http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento84/3.Ecoli.pdf
- Godambe, L. B. (1 de Junio de 2017). Detección basada en PCR específica de especie de *Escherichia coli* de alimentos indios. *Springer*, 1-5.
- Gutiérrez, G. (2009). *FAO*. Obtenido de <http://www.fao.org/3/i0480s/i0480s00.htm>

- Jinneman, K. C., Yoshitomi, K. J., & Weagant, S. D. (Octubre de 2003). Método de PCR multiplex en tiempo real para identificar genes de toxinas Shiga stx1 y stx2 y Escherichia coli O157:H7 / H - Serotipo. *American Society For Microbiology*, 1-7. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC201207/>
- Madero, J. F. (10 de abril de 2018). Carne molida: altamente perecedera. *El tributo*. Obtenido de <https://www.eltribuno.com/salta/nota/2018-4-10-15-40-0-carne-molida-altamente-perecedera>
- Martínez Mazariego, S. M., & Platero Reyes, L. A. (11 de 2007). *Repositorio Institucional de la Universidad de El Salvador*. Obtenido de <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/4895/>
- Merida, C. R. (2006). *Técnicas y Procesos de Investigación Científica*. Guatemala: Litografía Mercagraf.
- NEOGEN. (13 de 02 de 2019). Obtenido de <https://proficiency.neogen.com/sp/?id=447>
- Organización Mundial de la Salud. (07 de febrero de 2018). *OMS*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
- RENAPRA (Dirección). (2014). *Ciclo de vida de E. coli O157:H7 y su interacción con el intestino* [Película]. Recuperado el 30 de 10 de 2019, de <https://www.youtube.com/watch?v=XQn6J6gDnR0&feature=youtu.be>
- Rivas, M., Miliwebsky, E., & deza, N. (2007). *Scribd*. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/20786570/Manual-de-Procedimientos-Diagnostico-y-caracterizacion-de-Escherichia-coli-O157-productor-de-toxina-Shiga>
- Rodríguez-Angeles, G. (septiembre de 2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de Escherichia coli. *Scielo*, 44(05), 464-475. Recuperado el 02 de 11 de 2020, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&lng=es&tlng=es.
- Scientific, T. F. (2016). *Thermofisher.com*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/ni/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-pcr-understanding-ct.html>

United States Department of Agriculture, U. (18 de septiembre de 2013). *Carne Molida de Res e Inocuidad de Alimentos*. Obtenido de United States Department of Agriculture: <https://www.fsis.usda.gov/wps/portal/informational/en-espanol/hojasinformativas/preparacion-de-las-carnes/enfoque-carne-molida-de-res/carne-molida-res>

Varela, G., Chinen, I., Gadea, P., Miliwebsky, E., Mota, M., González, S., Schelotto, F. (2008). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga a partir de casos clínicos y de alimentos en Uruguay. *Revista Argentina de Microbiología*, 40(2), 93-100. Recuperado el 04 de 11 de 2020.

Zapata, S. S. (2006). *Ministerio de Fomento, Industria y Comercio- MIFIC. Estudio sobre el Mercado de carne bovina y sus condiciones de competencia*,. Managua.

ANEXOS

XIII. Anexos.

Anexo N. ° 1: Ficha de recolección de datos.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, MANAGUA

UNAN- MANAGUA



INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD "LUIS FELIPE MONCADA"

DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO

Ficha N.º: 001

Ficha de recolección de datos.

La siguiente ficha tiene como propósito la recopilación de datos concernientes a las muestras a utilizar en el estudio: **“Determinación *Escherichia coli* O157, en carne molida de res que se expenden en los supermercados en el Departamento de Managua en el periodo comprendido de marzo-abril 2020”**

Remisión de las muestras.

Empresa o institución: _____

Departamento: _____

Resp. Del muestreo: _____

Factura: _____

Dirección: _____

Responsables: _____

Fecha: ____/____/____

N°	N° de entrada	Código de laboratorio	Nombre del producto	N° de lote	Marca	País de origen	Motivo del análisis
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							

Observaciones:

Anexos N°2

promedio	varianza	N	S1	S2	S3	S4	S5	N1	N2	N3	N4	N5	B
5.62	52.12	46	74.72	58.27	40.84	50.93	54.63	19	7	5	13	2	4.36

Tabla n°1 Distribución de supermercados del universo.

Fuente: Datos obtenidos del programa de Microsoft Excel.

Ni= número de unidades muestrales en el estrato. S= varianza muestral para cada cadena. B= límite para el error de estimación.

cadenas de supermercados	Cadena A	Cadena B	Cadena C	Cadena D	Cadena E	Total
cantidad de supermercados en total por cadena	19	7	5	13	2	46
total, de supermercados a muestrear según los porcentajes obtenidos aleatoriamente	4	2	1	3	0	10
porcentajes de muestras por supermercados	41,3 %	15,2 %	10,9%	28,3%	4,3%	100 %

Tabla n°2 Distribución aleatoria de supermercados a muestrear por cadena.

Fuente: Datos obtenidos del programa de Microsoft Excel.

En la tabla número 2 en la primera fila se describe la cantidad de supermercados distribuidos por cadenas A, B, C, D y E, referente a la marca de los supermercados, teniendo como total el universo (46), en la segunda fila se muestra el porcentaje referente a la cantidad de supermercados por cadenas muestreados, reflejando de forma equitativa de las diferentes cadenas del universo, en la última fila se especifica la cantidad final de supermercados a analizados por cada cadena, llegando a un total de 10 supermercados.

En la segunda etapa se utilizó igualmente un muestreo aleatorio, para escoger la cantidad de carne que se analizó en este estudio, realizándose de la siguiente manera, por cada supermercado seleccionado se tomaron 10 unidades de ½ libra de carne molida de res, dividiéndose por consiguiente en: 5 unidades de ½ libra de carne molida económica y 5 unidades de ½ libra de

carne molida súper, según la Norma del reglamento técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:17) de los criterios Microbiológicos para la inocuidad de los alimentos.

Tipo de muestra	N.º de muestras	Cadena
Carne Molida de res Súper y Especial/ Económica	40	Cadena A
	20	Cadena B
	10	Cadena C
	30	Cadena D

Tabla n°3 Cantidades de muestras de Carne molida de res a muestrear por supermercados.

Tabla n°4 Presupuesto

Presupuesto	
Impresiones	C\$2000
Internet	C\$3000
Antisuero Polivalente 0157	\$ 200
Transporte	\$ 5000
Encuadernado	C\$700

Tabla 5. Cuantificación de *Escherichia coli*, en carne molida de res por el método de vertido de agar TBX.

Muestra	Resultado
848-AL20	2,0 x 10 ¹
849-AL20	1,0 x 10 ¹
851-AL20	4,0 x 10 ¹
936-AL20	1,0 x 10 ¹
939-AL20	1,0 x 10 ¹
940-AL20	1,0 x 10 ¹
942-AL20	1,0 x 10 ¹
947-AL20	1,0 x 10 ¹
948-AL20	2,0 x 10 ¹
1119-AL20	2,0 x 10 ¹
1120-AL20	4,0 x 10 ¹
1121-AL20	3,0 x 10 ¹
1122-AL20	1,0 x 10 ¹
1123-AL20	1,2 x 10 ²
1124-AL20	1,0 x 10 ¹
1125-AL20	1,0 x 10 ¹
1126-AL20	3,0 x 10 ¹
1128-AL20	3,0 x 10 ¹
1129-AL20	4,2 x 10 ²
1130-AL20	3,2 x 10 ²
1131-AL20	5,4 x 10 ²
1132-AL20	3,2 x 10 ²
1133-AL20	3,9 x 10 ²
1138-AL20	1,0 x 10 ¹
1257-AL20	1,0 x 10 ¹
1259-AL20	2,0 x 10 ¹
1276-AL20	3,0 x 10 ¹
1277-AL20	2,0 x 10 ¹
1279-AL20	2,0 x 10 ¹
1280-AL20	5,0 x 10 ¹
1541-AL20	4,0 x 10 ¹
1542-AL20	4,0 x 10 ¹
1543-AL20	4,0 x 10 ¹
1544-AL20	2,0 x 10 ¹
1545-AL20	2,0 x 10 ¹
1546-AL20	2,0 x 10 ¹
1547-AL20	2,0 x 10 ¹
1548-AL20	5,0 x 10 ¹
1549-AL20	5,0 x 10 ¹
1552-AL20	1,0 x 10 ¹
1554-AL20	1,0 x 10 ¹
1555-AL20	2,0 x 10 ¹
1556-AL20	5,0 x 10 ¹

Tabla 6. Criterios microbiológicos regidos por el RTCA para la realización de la interpretación de los resultados obtenidos de los diferentes métodos.

REGLAMENTO TÉCNICO CENTROAMERICANO		RTCA 67.04.50:17 1ª Revisión	
congelados en cortes, piezas, picados, molidos, embutidos crudos o formados, incluyendo empanizados y rebozados, marinados, tenderizados. No incluye materias primas, ni productos de aves de corral y caza.			
Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite Permitido
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (carne molida, picada y tortas para hamburguesas, embutidos crudos o formados, carnes marinadas, rebozadas, tenderizadas y empanizadas)	10	A	Ausencia/25 g
<i>Escherichia coli</i> (excepto carne molida, picada y tortas para hamburguesas, embutidos crudos o formados, carnes marinadas, rebozadas,	7		10 UFC/g

ANEXO DE RESOLUCIÓN No. 243-2009

**REGLAMENTO TÉCNICO
CENTROAMERICANO**

RTCA 67.04.50:08

8.1.1 Subgrupo del Alimento: Productos cárnicos crudos diferentes al pollo

Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i> O157:H7/25g (carne molida, picada y tortas para hamburguesas)	10	A	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	5		10 UFC/g

Reglamento (ce) no 2073-2005 Unión Europea

Categoría de alimentos	Microorganismos	Plan de toma de muestras (1)		Límites (2)		Método analítico de referencia (3)	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		n	c	m	M			
2.1.6. Carne picada	Recuento de colonias aerobias (4)	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	ISO 4833	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
	<i>E. coli</i> (5)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas

Tabla 7. Perfil de aislamiento de *Escherichia coli* O157.

Cepa CECT 4783	Agar MacConkey - sorbitol	Prueba confirmatoria de beta- glucuronidasa	IMVIC I RM VP C	Antisuero polivalente 0157
Escherichia coli O157:H7	Negativo	Negativo	+ + - -	Positivo

Los resultados obtenidos con la cepa ATCC de *Escherichia coli* O157, nos indica los siguientes parámetros: -Forman colonias incoloras no fermentadoras de sorbitol en agar MacConkey sorbitol, forman colonias Azules beta-Glucoronidasa negativa en el medio de cultivo TBX, con resultados en IMVIC de: Indol: +, RM: +, VP: -, C: - y aglutinación en la prueba de Antisuero polivalente *E. coli* O157.

Tabla 7.1 Aislamiento de *Escherichia coli* O157 a través de medios selectivos y diferenciales.

Tipo de carne molida de res	Muestreo de la Cadena A						<i>E. coli</i> <i>O.157</i>
	Numero de muestra	PCR Amplificación a partir del APB +piruvato	sorbitol en MacConkey	beta-Glucoronidasa en TBX	IMVIC I RM VP C	Antisuero polivalente 0157	
Económica	854AL20*	CT: 25.84*	Negativas*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausente
Económica	856AL20*	CT:30.79*	Negativa*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausente
Súper	1546AL20*	CT:27.07*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente
Súper	1547AL20*	CT:28.78*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente
Súper	1548AL20*	CT:28.27*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente
Súper	1549AL20*	CT:28.4*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente

Súper	1550AL20 *	CT:28.15*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente
Súper	1559AL20 *	CT:28.83*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente
Súper	1560AL20 *	CT:27.92*	Negativa*	Negativa*	*+ + - -	Negativa*	Ausente

*Amplificación por PCR: Positiva

*Colonias características de *Escherichia coli* O157

*CT-SMAC colonias pequeñas transparentes, Sorbitol (-)

* TBX: colonias transparentes o incoloras.

*IMVIC de *E. coli* : I : (+), RM : (+), VP : (-), C : (+)

IMVIC de *E. coli* Biotipo 2: I: (-), RM: (+), VP: (-), C: (+)

*Antisuero Polivalente para *E. coli* O157: Negativo

Tabla 7.2 Aislamiento a través de medios selectivos y diferenciales.

Muestreo de la Cadena A						
Procedimiento según la BAM/FDA						
Comportamiento de colonia encontrada de <i>Enterobacter cloacae</i>						
Tipo de carne molida de res	Numero de muestra	PCR Amplificación a partir del APB +piruvato	sorbitol en MacConkey	beta-Glucuronidasa en TBX	IMVIC I RM VP C	Resultados de VITEK Positivo
Económica	1543AL20	CT:24.74	Negativo	Negativo	- - + +	<i>Enterobacter cloacae</i>
Bioquímica complementaria						
TSI	LIA	M	I	O	RM	VP Urea Citrato Malonato Sorbitol Trealosa Arginina Trealosa Sacarosa Arabinosa
A/A	K/K	+	+	+	-	+ + + + + + + + + +

Tabla 7.3 Aislamiento de *Escherichia coli* O157 a través de medios selectivos y diferenciales.

Tipo de carne Molida de res	Muestreo de la Cadena B Procedimiento según la BAM/FDA						<i>E. coli</i> O157
	Código de trabajo de la muestra	PCR Amplificación a partir del APB +piruvato	sorbitol en MacConkey	beta-Glucoronidasa en TBX	IMVIC I R M V P C	Antisuero polivalente O157	
Económica	1276-AL20*	CT: 25.61*	Negativas*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausencia
Económica	1277-AL20*	CT:25.72*	Negativa*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausencia
Súper	858-AL20*	CT:32.34*	Negativas*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausencia
Súper	859-AL20*	CT: undete	Negativas*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausencia
Súper	860-AL20*	CT :34.92	Negativas*	Negativa*	- + - -	Negativo*	Ausencia
Económica	862-AL20*	CT :23.24*	Negativas*	Negativa*	*+ + - -	Negativo*	Ausencia
Económica	863-AL20*	CT :28.23*	Negativas*	Negativa*	*+ + - -	Negativo*	Ausencia
Económica	864-AL20*	CT :28.2*	Negativas*	Negativa*	*+ + - -	Negativo*	Ausencia
Económica	865-AL20*	CT :27.79*	Negativas*	Negativa*	*+ + - -	Negativo*	Ausencia
Económica	866-AL20*	CT :25.86*	Negativas*	Negativa*	*+ + - -	Negativo*	Ausencia

*Amplificación por PCR: Positiva

*Colonias características de *Escherichia coli* O157

*CT-SMAC colonias pequeñas transparentes, Sorbitol (-)

* TBX: colonias transparentes o incoloras.

*IMVIC de *E. coli* : I : (+), RM : (+), VP : (-), C : (+)

IMVIC de *E. coli Biotipo 2*: I: (-), RM: (+), VP: (-), C: (+)

*Antisuero Polivalente para *E. coli O157*: Negativo

Tabla 7.4 Aislamiento de *Escherichia coli O157* a través de medios selectivos y diferenciales.

Muestreo de la Cadena E							
Procedimiento según la BAM/FDA							
Tipo de carne molida de res	Código de trabajo de la muestra	PCR Amplificación a partir del APB +piruvato	sorbitol en MacConkey	beta-Glucoronidasa en TBX	IMVIC I RM VP C	Antisuero polivalente 0157	<i>E. coli O157</i>
Súper	1130AL20*	CT: 28.84*	Negativas*	Negativa*	*- + - -	*Negativo	Ausente

*Amplificación por PCR: Positiva

*Colonias características de *Escherichia coli O157*

*CT-SMAC colonias pequeñas transparentes, Sorbitol (-)

* TBX: colonias transparentes o incoloras.

*IMVIC de *E. coli* : I : (+), RM : (+), VP : (-), C : (+)

IMVIC de *E. coli Biotipo 2*: I: (-), RM: (+), VP: (-), C: (+)

*Antisuero Polivalente para *E. coli O157*: Negativo

Tabla 8. Amplificación de las muestras mediante q-PCR a partir de APB+ Piruvato

Según las cadenas de supermercados				
Columna1	cadena A	cadena B	cadena C	cadena D
Amplificadas	38	19	10	30
sin amplificación	1	1	0	0

Según los 2 tipos de carne molida de res		
	Económica	súper
Amplificadas	49	48
Sin amplificación	1	2

Tabla 8.1. Programa de Amplificación.

Etapas	Temperatura ° C	N.º ciclos
Desnaturalización	95	40 ciclos
Anillación	56	
Extensión	72	

Tabla 8.2. Protocolo de PCR Tiempo Real

Corrida PCR-Tiempo Real Master Applied Biosystems			
Volumen Total	40 reacciones		
FDA-UIDA	10	[]	23
FastStar Universal Probe	5	1x	115
10x Exo Internal Pos	1	1x	-
50x Exo IPC DNA	0.2	1x	-
Probe FDA-UIDA 57 10 uM	0.25	0.25	5.75
Pimer 78 FDA-UIDA 57 10 uM	0.3	0.3	6.9

Primers 79 FDA-UIDA 57 10 uM	0.3	0.3	6.9
Agua	1.95		44.85
Template	1		
Total	10		207

Tabla 9. Cepas de referencia

Cepas de referencia	
<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 13883	Negativo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Negativo
<i>Escherichia coli</i> CECT 5947 Cepa no Toxigénica	Positiva
<i>Escherichia coli</i> CECT 4783 Cepa Toxigenica	Positiva

Tabla 10. Preparación de antibióticos según Manual Analítico Bacteriológico

Preparación de antibióticos para MacConkey + Sorbitol		
Antibiótico	Agua	Concentración
Telurito de potasio 0,25 mg	100 ml	2.5 mg/L
Cefixime 5,0 mg	100 ml	0.05 mg/L
Medio MacConkey + Sorbitol + Telurito de Potasio + Cefixime		
Composición	Volumen	Concentración
MacConkey + Sorbitol	1000 ml	

Cefixime	2 ml	0.1 mg/L
Telurito de Potasio	2ml	5 mg/L

Antibióticos Acriflavin-Cefsulodin-Vancomicina (ACV) suplementos para APBp				
Suplemento	Concentración	Etanol	Agua grado molecular	Volumen al APB
Acriflavin	225 mg	100 ml	-	2 ml
Cefsulodin	225 mg	100 ml	-	2 ml
Vancomicina	180 mg	-	100ml	2 ml

Tabla 11. Compuestos de los medios de cultivo

Agar MacConkey Sorbitol	
Peptona	20 gr
Sorbitol	10 gr
Sales biliares	1.5 gr
Cloruro de sodio	5 gr
Rojo neutro	0,03 gr
Cristal violeta	0,001 gr
AD	1000 ml
Agar	15 gr
PH final	25 °C 7,1 ± 0,2
Agar Tryptone Bile X-Glucurónico	
Triptona	20, 0 g
Sales Biliares	1,5 g
X- Glu	0,075 g
Agar - Agar	14,0 g
AD	1000 ml
PH Final	7,2 ± 0,2

Cronograma

Actividades	julio				agosto				septiembre				Octubre				Noviembre				diciembre				enero				febrero				marzo							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
Elaboración de protocolo																																								
Aprobación de protocolo por POLISAL UNAN																																								
Aprobación de protocolo Docencia- Ministerio de Salud																																								
Muestreo																																								

Imagen 1

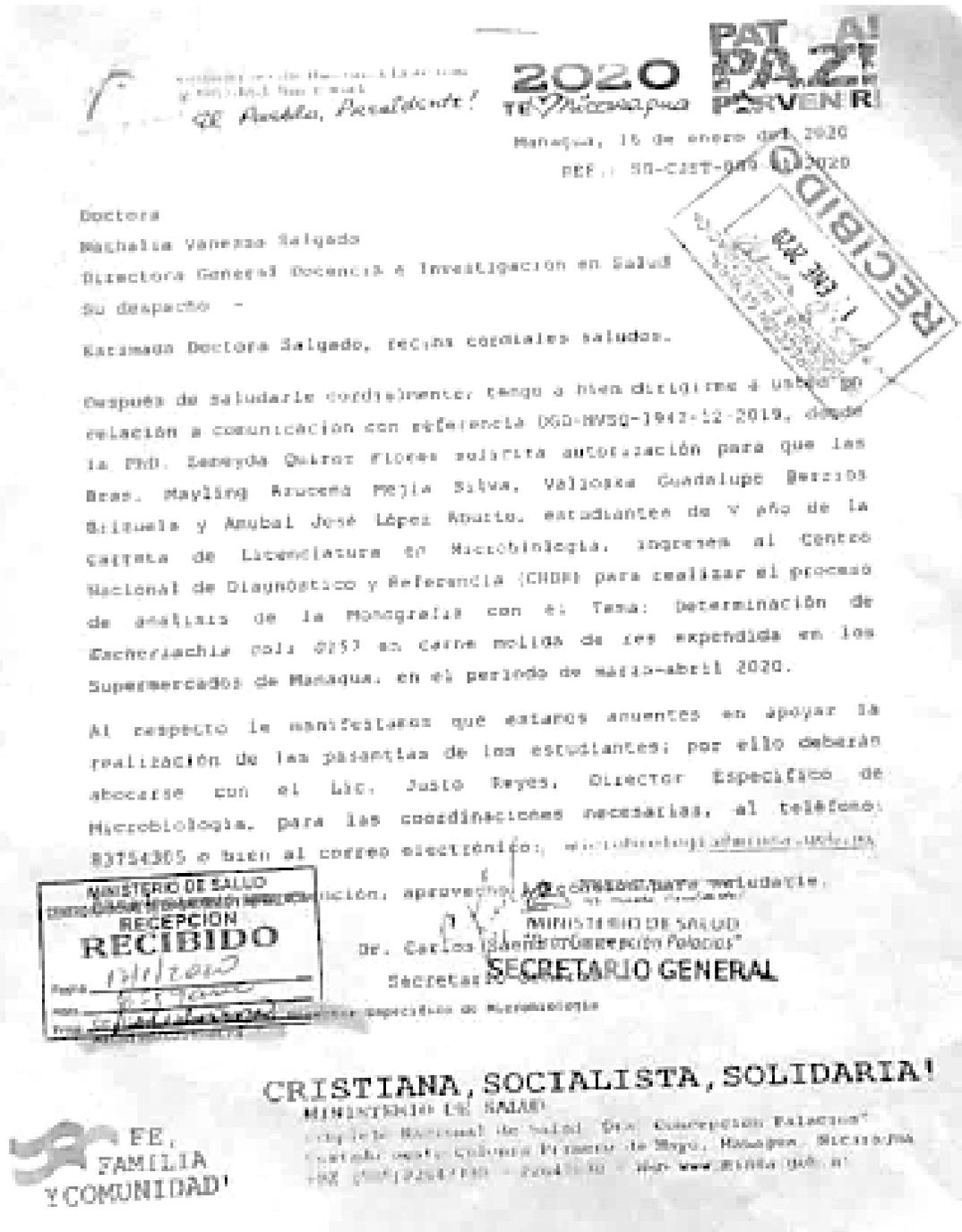
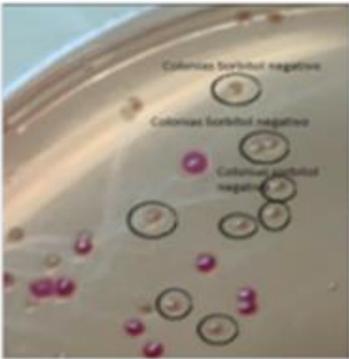


Imagen 2

Cepa encontrada de *Enterobacter Cloacae*



MacConkey+Sorbitol+Telurito
+Cefixime+Acriflavina.
Negativo: colonias incoloras



TBX β-glucuronidasa negativas
Colonias incoloras



IMVIC negativo
I R M V P C
- - + +



Bioquímica complementaria

Imagen 3



MacConkey+Sorbitol+Telurito
+Cefixime+Acriflavina.Negativa.
Colonias Incoloras



TBX Glucoronidasa Negativa
Colonias Incoloras



IMVIC Positivo



Antisuero Polivalente O157

Equipos y Materiales utilizados en el proceso de la investigación



Vortex



Centrifuga 5424



Thermo Mixer



Mechero de bunsen



Pipetas Automaticas



Campana de bioseguridad



Centrifugadora de 35 grados

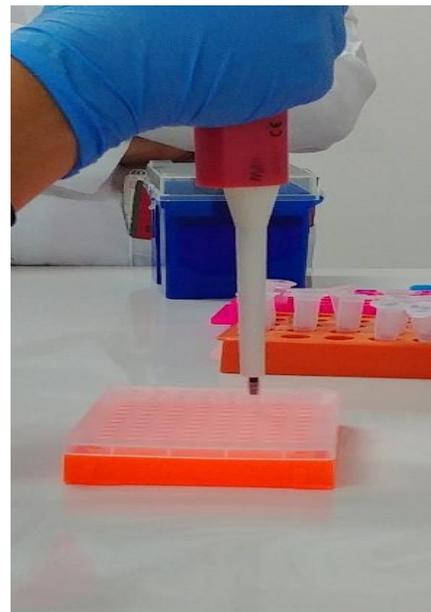
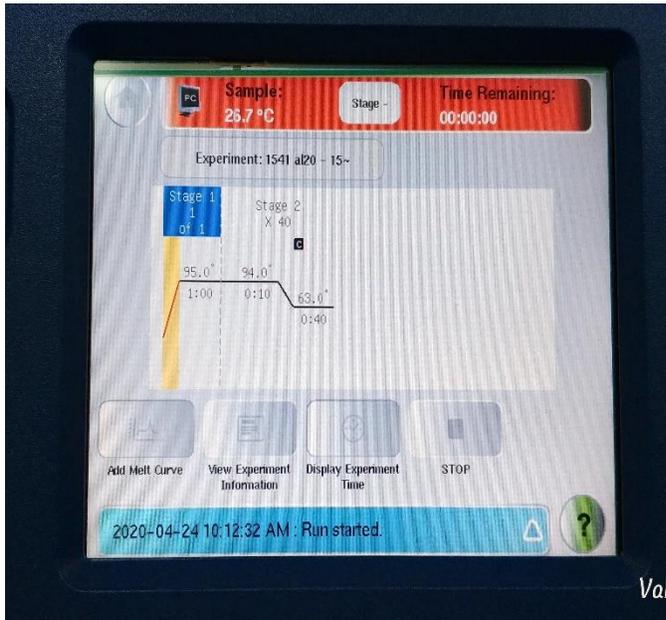


Pipeteador



Puntas

Equipos y Materiales de RT-PCR



Imágenes del proceso del muestreo:

No.	No. DE ENTRADA	CODIGO LABORATORIO	NOMBRE DEL PRODUCTO	No. DE LOTE	MARCA	PAIS DE ORIGEN	MOTIVO DEL ANALISIS
1	01		Carne molida Super	59	ICI	NAC.	Vigilancia
2	07		Carne molida Super	59	ICI	NAC.	Vigilancia
3	03		Carne molida Super	59	ICI	NAC.	Vigilancia
4	04		Carne molida Super	59	ICI	NAC.	Vigilancia
5	05		Carne molida Super	59	ICI	NAC.	Vigilancia
6	06		Carne molida Economica	60	ICI	NAC.	Vigilancia
7	07		Carne molida Economica	60	ICI	NAC.	Vigilancia
8	08		Carne molida Economica	60	ICI	NAC.	Vigilancia
9	09		Carne molida Economica	60	ICI	NAC.	Vigilancia



Imagen del procesamiento de las muestras:



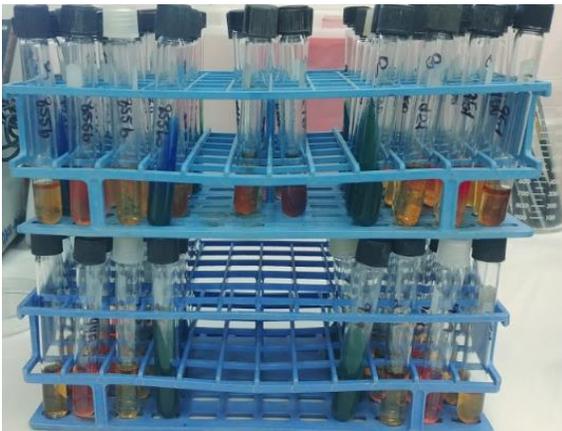
Diluciones



APB+Piruvato



Stomachear



Pruebas bioquímica IMVIC



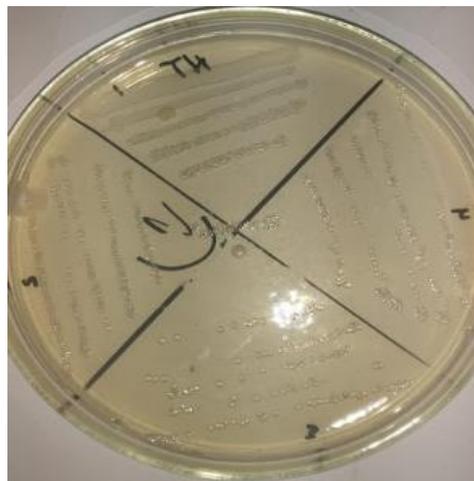
Antisuero Polivalente de E.coli O157



MacConkey+Sorbitol+Antibiotico



Agar TBX



Agar TSA



Proceso de pesado



Esquema de procesos de *Escherichia coli* O157 BAM FDA

1. Pre enriquecimiento.

- Pesar 25 gramos de la muestra de carne molida en una bolsa stomacher.
- Agregar a la bolsa 225 ml de Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPWp).



- Mezclar.

- Incubar a 37°C durante 5 horas, agregar al Agua Peptonada Bufferada modificada con piruvato los suplementos Acriflavin – Cefsulodin – Vancomicina (ACV).



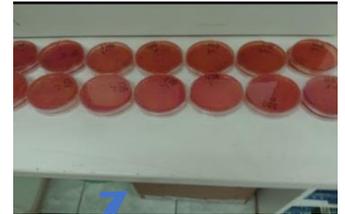
Incubar a 42 °C durante 24 horas

2. Preparación de ADN



3. Aislamiento selectivo.

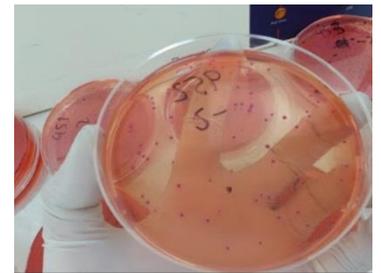
- Después de 24 h de incubación en el medio de enriquecimiento APBp + Antibióticos, realizar diluciones con buffer 10^2 - 10^4 y sembrar en Agar MacConkey + sorbitol +Telurito de Potasio 5 mg/L + Cefixime 0.1 mg/L.
- Incubar a 37°C por 18-24 horas.



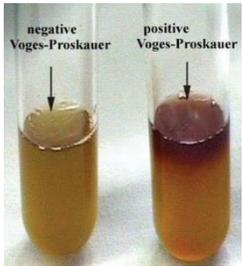
- Características de colonias en agar SMAC-T: colonias pequeñas y transparentes.



- Las colonias típicas sospechosas, estriar en agar TBX para poder observar los resultados de lo enzima Beta-glucoronidasa que es este caso para *E.coli* O157 debe ser negativa es decir presencia de colonias transparente
- incubar a 44.5°C por 18-24 horas

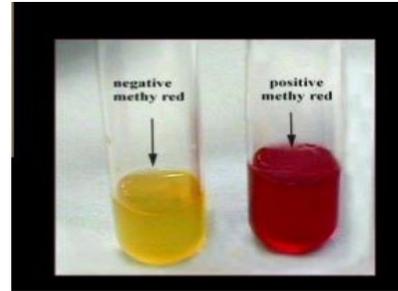


4. Pruebas confirmatorias

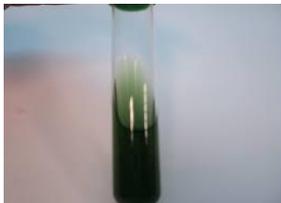


Rojo de Metilo (positivo)

Voges Proskauer (negativo)



MIO: Biotipo 1 motilidad (+), Indol (+), Ornitina (+)
MIO: Biotipo 2 motilidad (+), Indol (-), Ornitina (+)



Prueba de citrato (negativo)

Prueba serológica (Antisuero de *E. coli* 0157).

- Coloque dos gotas separadas de solución salina normal (cloruro sódico al 0,85%) en un portaobjetos de vidrio limpio.



- Tome una colonia sospechosa de *Escherichia coli* de la placa de cultivo y mezcle cuidadosamente con ambas gotas de solución salina normal sobre el portaobjetos para obtener una suspensión lisa.



- Añada una gota de antisuero a una de las gotas de suspensión bacteriana en el portaobjetos y al otro (control), añada una gota de solución salina normal. Mezcle el antisuero con la suspensión bacteriana usando un palillo de dientes. Luego mezcle la solución salina (control) con un palillo de dientes nuevo.



- Mueva suavemente el portaobjetos hacia delante y atrás durante un minuto y observe si hay aglutinación en condiciones de iluminación normales o usando un objetivo de bajo aumento.



Detección de PCR en tiempo real: Preparación de plantilla de ADN.



- Caldo de enriquecimiento



- Transfiera 1 ml de enriquecimiento a un tubo de microcentrífuga y centrifugue $12,000 \times g$ durante 3 min.
- Eliminar el sobrenadante y Re-suspender completamente el sedimento en 1 ml de NaCl al 0,85%.



- Centrifugar $12,000 \times g$ durante 3 min.



- Eliminar el sobrenadante y Re-suspender completamente el sedimento en 1 ml de agua estéril.



- Colocar en baño de agua o bloque de calor capaz de mantener 100°C durante 10 min.



- Centrifugue $12,000 \times g$ durante 1 minuto, retire y guarde el sobrenadante como plantilla de ADN (esto puede congelarse, mínimo -20°C , para futuras pruebas de PCR).



- Haga una dilución 1:10 de esta plantilla y use $1 \mu\text{l}$ para la prueba por PCR en tiempo real.

Preparación de Medios de Cultivos

Medios de cultivos.

- Agua peptona bufferada modificada con piruvato (mBPWp) y Suplemento Acriflavin – Cefsulodin – vancomicina (ACV) a una concentración de 22.5 mg/10 mL.
- Agar MacConkey sorbitol con Cefixime [0.1 mg/L] -Telurito [5 mg/L] (SMAC-CT).
- Agar tripticasa soja con extracto de levadura (TSA YE).

Agar MacConkey con sorbitol.

- Disolver 48.5 gramos en 1 litro de agua bidestilada.
- Calentar, agitando hasta ebullición, para su total disolución. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos sin sobrecalentar.
- Añadir a 44-47 °C, 20 ml de Telurito-Cefixime estéril

Preparación de Antibióticos.

- **Medio MacConkey + Sorbitol + Telurito de Potasio 5 mg/L+ Cefixime 0.1 mg/L.**
- Pesar 0,25 mg de Telurito de Potasio y disolver en 100 ml de agua y esterilizar por filtración de membrana. Concentración de 2.5 mg/L. Guardar el antibiótico a temperatura ambiente por 1 mes.
- Agregar 2 ml a 1000 ml de agar MacConkey para una concentración final de 5 mg/L
- Pesar 5,0 mg de Cefixima y disolver en 100 ml de agua y esterilizar por filtración de membrana. Concentración de 0.05 mg/L. Guardar a 3 °C +/- 2°C por 1 semana.
- Agregar 2 ml a 1000 ml de agar MacConkey para una concentración final de 0.1 mg/L.
 - **Suplemento para Agua Peptonada Bufferada con piruvato APBp Acriflavine-Cefsulodin-Vancomicina (ACV).**
- Pesar 225 mg de Acriflavine y diluir en 100 ml de etanol al 95 %. Esterilizar por filtración de membrana para la cantidad de 50 muestras.
- Agregar 2 ml de este suplemento a cada botella de 450 ml de APBp.
- Pesar 225 mg de Cefsulodin y diluir en 100 ml de etanol al 95 %. Esterilizar por filtración de membrana para la cantidad de 50 muestras.

- Agregar 2 ml de este suplemento a cada botella de 450 ml de APBp
- Pesar 180 mg de Vancomicina y diluir en 100 ml de agua destilada estéril. Esterilizar por filtración de membrana para la cantidad de 50 muestras.
- Agregar 2 ml de este suplemento a cada botella de 450 ml de APBp.