

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 EN CARNE MOLIDA DE RES CRUDA, COMERCIALIZADA EN SUPERMERCADOS DEL ÁREA METROPOLITANA DE SAN SALVADOR, PERÍODO 2007.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR
SOFÍA MARGARITA MARTÍNEZ MAZARIEGO
LUIS ALONSO PLATERO REYES

16 DE FEBRERO
DE 1841

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE DE 2007

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector.

MSc. Rufino Antonio Quezada Sánchez

Secretario.

Lic. Douglas Vladimir Alfaro Chávez

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

Decano.

Lic. Salvador Castillo Arévalo

Secretaria.

Licda. Morena Lizette Martínez de Díaz

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACIÓN

Coordinadora General.

Lic. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo

Asesora de Área de Aprovechamiento de Recursos Naturales.

MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez

Asesora de Área de Microbiología.

MSc. Coralia González de Díaz

Docente Directora.

MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos

AGRADECIMIENTOS

A **Dios todo poderoso** por permitirnos concluir nuestra carrera exitosamente y habernos guiado e iluminado en cada momento.

A **nuestros padres** por brindarnos su apoyo incondicional durante el transcurso de nuestra carrera.

Al **resto de nuestra familia** por acompañarnos con sus oraciones y bendiciones.

Al **comité de trabajo de graduación** Lic. Maria Concepción Odette Rauda Acevedo Coordinadora general, MSc. Sonia Maricela Lemus Martínez, MSc. Coralia González de Díaz Asesoras de Área, MSc. Maria Evelyn Sánchez de Ramos Docente Directora; por su ayuda durante el proceso de graduación, guiarnos y aconsejarnos para culminar nuestra carrera con éxito.

Al **resto de docentes** por compartir con nosotros sus conocimientos, habilidades y ayudarnos en nuestra formación profesional.

Al **personal de laboratorio, administrativo y demás** por brindarnos su colaboración durante el desarrollado de nuestra formación académica.

Sofía y Luís.

DEDICATORIA

A **mi Dios Todo Poderoso** por ser mi fortaleza y ayuda, por brindarme la oportunidad de culminar mi meta académica y por acompañarme y bendecirme en cada etapa de mi vida.

A **mi madre Berta Gloria Mazariego** por apoyarme incondicionalmente en cada etapa de mi vida, por ser un ejemplo y ser el pilar más fuerte e importante para mí.

A **mi padre Raúl Antonio Martínez** por su apoyo en los momentos de dificultad.

A **mi hermano Alejandro** por sus consejos y por compartir conmigo sus conocimientos.

A **mi Abuela Hilda Alicia** por sus oraciones y consejos en todo momento.

Al **resto de mi familia** por creer siempre en mí y por brindarme su apoyo.

A **mi compañero de tesis, amigo y novio Luís Alonso** por su apoyo, paciencia y consejo en cada momento, por ser un impulso de aliento y fuerza.

A **mis amigos** que siempre me han brindado su apoyo incondicional.

Sofía Mazariego

DEDICATORIA

A mi **Dios Padre todo poderoso** por estar conmigo siempre en cada momento difícil y de alegría; por haberme bendecido con sabiduría y fortaleza necesaria para culminar mi carrera.

A **mis padres Maria Concepción Reyes y Miguel Ángel Platero** por todo el sacrificio que ellos han hecho para la formación de mi persona, por el apoyo incondicional, consejos y oraciones que fueron fundamentales para que yo alcanzara esta meta.

A **mis hermanos Miguel y Omar** por brindarme todo su cariño, amistad y aliento para salir adelante, en este logro alcanzado que es también de ellos.

A **resto de mi familia** por su apoyo, oraciones y por estar siempre a mi lado.

A **mi compañera de tesis, amiga y novia Sofía Margarita** por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, brindarme su apoyo y darme las fuerzas para seguir adelante.

A **mis amigos** por su compañía y apoyo incondicional.

Luís Platero

INDICE

Resumen	
Capitulo I	
1.0 Introducción	xvi
Capitulo II	
2.0 Objetivos	
Capitulo III	
3.0 Marco Teórico	19
3.1 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	20
3.2 Acción patógena	20
3.3 Estructura antigena	21
3.3.1 Flagelos	22
3.3.2 Pili	23
3.4 Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	23
3.4.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	25
3.4.2 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica	25
3.4.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasora	28
3.4.4 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa	28
3.4.5 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	29
3.5 <i>Escherichia coli</i> O157:H7	30
3.6 Síndrome Urémico Hemolítico	32
3.7 Patogenia	33
3.8 Mecanismo de acción	35
3.9 Factores y condiciones para el desarrollo de <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	36

3.10 Epidemiología	40
3.11 Carne molida	44
3.11.1 Propiedades importantes de la carne molida	45
3.11.2 Métodos de conservación	48
3.11.3 Microflora inicial	50
3.11.4 Sacrificio	51
3.11.5 Refrigeración	52
4.0 Diseño Metodológico	53
4.1 Tipo de estudio	54
4.1.1 Investigación Bibliografica	54
4.1.2 Investigación de Campo	54
4.2 Diseño y tamaño de la muestra	55
Capitulo V	
5.0 Resultados y Discusión de resultados	60
Capitulo VI	
6.0 Conclusiones	74
Capitulo VII	
7.0 Recomendaciones	78
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°	Pág.
1 Características de los diferentes grupos de <i>Escherichia coli</i> que causan diarrea en seres humanos.	24
2 Composición aproximada de la musculatura de mamíferos adultos después del rigor mortis.	46
3 Estratos, Supermercado, cantidad de supermercados.	55
4 Porcentaje de representatividad de los supermercados.	56
5 Cantidad de supermercados a muestrear por estrato.	57
6 Variedad comercial de la carne por estrato.	57
7 Cantidad de muestras de variedad de carne por estrato.	58
8 Cantidad de muestra a tomar por estrato.	59
9 Listado de supermercado a muestrear.	61
10 Perfil de aislamiento de <i>Escherichia coli O157:H7</i> a través de medios selectivos.	62
11 Aislamiento a través de medios selectivos en Estrato 1.	63
12 Aislamiento a través de medios selectivos en Estrato 2.	63
13 Aislamiento a través de medios selectivos en Estrato 3.	64
14 Aislamiento a través de medios selectivos en Estrato 4.	64
15 Identificación de cepa ATCC de <i>Escherichiacoli O157:H7</i> a través de pruebas bioquímicas.	65

16	Identificación de cepa ATCC de <i>Escherichia coli O157:H7</i> a través de pruebas bioquímicas API 20 E.	65
17	Identificación a través de pruebas bioquímicas en seis muestras de estrato 1.	66
18	Identificación a través de pruebas bioquímicas API 20 E en seis muestras de estrato 1.	66
19	Identificación a través de pruebas bioquímicas en dos muestras de estrato 2.	68
20	Identificación a través de pruebas bioquímicas API 20E en dos muestras de estrato 2.	68
21	Identificación a través de pruebas bioquímicas API 20E en dos muestras de estrato 3.	69
22	Identificación a través de pruebas bioquímicas en dos muestras de estrato 4.	70
23	Proporción de microorganismos presentes en las 20 muestras de carne molida de res.	71
24	Brotos de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico-urémico más relevantes en EEUU por cepa <i>E. coli O157:H7</i>	90

INDICE DE FIGURAS

Figura N°	Pág.
1 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímicas y pruebas bioquímicas API 20E en muestras de estrato 1.	67
2 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímicas y pruebas bioquímicas API 20E en muestras de estrato 2.	68
3 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímicas API 20E en muestras de estrato 3.	69
4 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímicas en muestras de estrato 4.	70
5 Proporción de microorganismos presentes en las 20 muestras de carne de res.	72
6 Mapa de la zona metropolitana de San Salvador	93
7 Aislamiento de Cepa ATCC de <i>Escherichia coli O157:H7</i>	113
8 Identificación de cepa ATCC de <i>Escherichia coli O157:H7</i> a través de pruebas bioquímica API 20E	114

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°	Pág.
1 Infección por <i>Escherichia coli</i> años 2000-2004.	87
2 Brotes de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico (SHU) mas relevantes en los EEUU por cepas de <i>Escherichia coli O157:H7</i> .	90
3 Listado de Supermercados del área metropolitana de San Salvador.	92
4 Mapa de la zona Metropolitana de San Salvador.	93
5 Reactivos, Material y Equipo.	94
6 Procedimiento de aislamiento de <i>Escherichia coli O157:H7</i> .	97
7 Procedimiento de Pruebas bioquímicas.	98
8 Identificación bioquímica con sistema API 20E.	101
9 Procedimiento de técnicas serológicas.	106
10 Carta de Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología.	110
11 Fotografías.	112

RESUMEN

Escherichia coli es una de las principales bacterias causante de enfermedades entéricas en el ser humano por el consumo de alimentos contaminados. Dentro de la diversidad de serotipos de esta bacteria ***Escherichia coli O157:H7*** es un microorganismo emergente que viene provocando brotes. Entre las complicaciones generadas se pueden mencionar: Colitis Hemorrágica (CH), Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) o Púrpura Trombocitopénica (PTT).

El objetivo del estudio fue determinar ***Escherichia coli O157:H7*** en carne molida de res cruda, comercializada en supermercados del área metropolitana de San Salvador, periodo 2007. Se realizó aislamiento selectivo de ***Escherichia coli O157:H7*** utilizando agar MacConkey sorbitol, y otros medios diferenciales como: agar EMB, Cromocult coliforme y Fluorocult E.coli O157:H7; se identificó bioquímicamente mediante técnicas en tubo y pruebas API 20E, siendo comparados los resultados obtenidos con una cepa patrón ATCC de ***Escherichia coli O157:H7***.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los análisis de las muestras, se aislaron microorganismos no fermentadores de sorbitol, pero el resultado en los medios selectivos-diferenciales y pruebas bioquímicas mostraron ausencia de ***Escherichia coli O157:H7***. Por tanto recomendamos realizar otras investigaciones en otros tipos de alimentos como: frutas, vegetales, lácteos, agua y otros tipos de carne, así también realizar investigaciones en personas adultas y niños con enfermedades diarreicas y disfunciones renales en unidades de salud y hospitales.

CAPITULO I
INTRODUCCION

INTRODUCCION

La ***Escherichia coli O157:H7***⁽²¹⁾ es un microorganismo emergente, es decir que viene produciendo enfermedades en humanos a un ritmo creciente en los últimos 20 años y amenaza con aumentar en un futuro. Este microorganismo esta asociado a enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs), desarrollando enfermedad diarreica aguda (EDA), Colitis Hemorrágica (CH), Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) o Púrpura Trombocitopénica (PTT), en seres humanos. La enfermedad es causada por la producción de grandes cantidades de una o dos citoxinas producidas en vivo, causando severos daños intestinales y renales. La mayoría de los brotes provocados por ***Escherichia coli O157:H7*** han sido atribuidos al consumo de productos de carne bovina mal cocida, por lo que la carne molida es uno de los principales reservorios, la presencia de la bacteria no es evidente por alteraciones organolépticas aparentes, dificultando la inmediata toma de medidas sanitarias; incidiendo en pérdidas económicas a las familias por los altos costos de un tratamiento por las enfermedades que produce.

La presente investigación tiene como finalidad determinar la presencia de ***Escherichia coli O157:H7*** en carne molida de res cruda comercializada en 42 supermercados del área metropolitana de San Salvador entre los meses de Junio a Noviembre del año 2007. El estudio comprenderá: Un aislamiento selectivo del microorganismo a partir de las muestras de carne seleccionadas,

utilizando medios enriquecidos y selectivos, posteriormente se realizarán pruebas bioquímicas y serológicas para su identificación y tipificación respectivamente; dichos análisis se realizarán en los Laboratorios de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador. Por lo que se espera que esta investigación sea de un gran aporte y contribuya a futuras investigaciones relacionadas con la problemática en estudio.

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar *Escherichia coli* 0157:H7 en carne molida de res cruda, comercializada en supermercados del área metropolitana de San Salvador, periodo 2007.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Elaborar un plan de muestreo que permita seleccionar la muestra de carne en los supermercados.
- 2.2.2 Aislar la cepa de *Escherichia coli* 0157:H7 a partir de carne molida de res cruda utilizando medios de cultivos enriquecidos y selectivos
- 2.2.3 Identificar la presencia de *Escherichia coli* 0157:H7 a través de pruebas bioquímicas.
- 2.2.4 Comprobar mediante técnicas serológicas la presencia de *Escherichia coli* 0157:H7.
- 2.2.5 Dar a conocer a las autoridades del CONACYT, los resultados obtenidos de la determinación de *Escherichia coli* 0157:H7 en carne molida de res cruda.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un microorganismo gram negativo, aerobio o anaerobio facultativo, sus cepas forman la mayor parte de la flora comensal del tubo digestivo de animales y humanos, eliminándose por las heces al exterior. Por esto, no es infrecuente que se encuentren en el medio ambiente, donde son capaces de sobrevivir durante cierto tiempo en el agua y los alimentos, de manera que su aislamiento constituye un indicador de contaminación fecal.

Los aislados de *Escherichia coli* tienen pocas características que puedan ser usadas para distinguir una cepa de otra; por lo que ha sido necesario implementar investigaciones epidémicas y con este fin una serie de estudios fenotípicos y genotípicos, incluyendo tipificación con bacteriófagos, factores de virulencia, genotipificación de verotoxinas, análisis de plasmidos, electroforesis de enzimas multilocus, ribotipificación, RFLP y electroforesis de campo pulsado (PFGE).⁽¹⁸⁾

3.2 Acción Patógena

Los Pili comunes y antígenos superficiales actúan por su capacidad de adherencia (adhesivas). Los pili tipo 1 o MS (manosa - sensibles) y probablemente los antígenos O y K se fijan en las células epiteliales del tracto urinario, mientras que los pili MR (manosa- resistentes), denominados también factores de colonización, facilitan la fijación en las células de la mucosa

intestinal. Los antígenos O y K presentan propiedades antifagocitarias e inhibidoras de las sustancias bactericidas del suero y son responsables de la virulencia de las cepas invasivas, cuya síntesis está codificada por plásmidos de elevado peso molecular (140 Mdals). ⁽¹⁸⁾

3.3 Estructura antigénica

Las enterobacteriáceas poseen una compleja estructura antigénica. Se han clasificado más de 150 diferentes antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) termoestables, más de 100 antígenos K (capsulares) termolábiles y más de 50 antígenos H (flagelares).

Los antígenos O son la parte más externa de la pared de la célula bacteriana y constan de unidades repetidas de polisacáridos. Algunos polisacáridos O contienen azúcares únicos. Los antígenos O son resistentes al calor y al alcohol, generalmente se detectan mediante aglutinación bacteriana.

Los antígenos K son antígenos O externos sobre algunas, pero no todas, las enterobacteriáceas. Algunos son polisacáridos, incluso los antígenos K de la ***Escherichia coli*** otros son proteínas. Los antígenos K pueden interferir con la aglutinación por antisuero O, y a veces se asocian con virulencia.

Los antígenos H se localizan sobre los flagelos y se desnaturalizan o retiran mediante calor o alcohol. En las variedades de bacterias dotadas de motilidad se les puede conservar mediante tratamiento con formalina. Estos antígenos H se aglutinan con anticuerpos H. Los determinantes de los antígenos H son una

función de la secuencia de aminoácidos en la proteína flagelar. Los microorganismos tienden a cambiar de una fase a la otra; esto se denomina variación de fase. Los antígenos H sobre la superficie de la bacteria a veces interfieren con la aglutinación por anticuerpos anti-O. ⁽³⁾

3.3.1 Flagelos

Los flagelos bacterianos son apéndices filiformes compuestos en su totalidad por proteína, miden de 12 a 30 nm de diámetro. Son los órganos de la locomoción para las formas que los poseen. Se conocen tres tipos de ordenamientos: *monótrico* (flagelo polar único), *lofótrico* (flagelos polares múltiples) y *perítrico* (flagelos distribuidos en la totalidad de la célula).

Un flagelo bacteriano está constituido por varios millares de moléculas de una subunidad proteínica denominada *Flagelina*. El flagelo está formado por la agregación de subunidad para formar una estructura helicoidal. Se presume que las flagelinas de diversas especies bacterianas difieren entre sí en la estructura primaria. Son altamente antigénicas (antígenos H) y algunas de las respuestas inmunitarias a la infección están dirigidas contra estas proteínas. El flagelo está adherido al cuerpo celular bacteriano por medio de una estructura compleja constituida por un gancho y un cuerpo basal. El gancho es una estructura curva y corta que parece actuar como articulación universal entre el motor en la estructura basal y el flagelo. El cuerpo basal tiene una serie de anillos: un par en las bacterias gram positivas y dos pares en las gram

negativas. Todos los componentes del motor flagelar se localizan en la envoltura celular. Los flagelos unidos a envolturas celulares aisladas y selladas giran de manera anormal cuando el medio contiene un sustrato adecuado para la respiración o se establece, de manera artificial, un gradiente de protones.

Cuando una bacteria *peritrica* nada, sus flagelos se reúnen para formar un manojo posterior que empuja a la célula hacia delante en una línea recta mediante rotación en sentido opuesto al movimiento de las manecillas del reloj.

3.3.2 Pili (fimbrias)

Muchas bacterias gram negativas poseen apéndices rígidos en la superficie denominados pili (del latín, “pelos”) o fimbrias (del latín, “flecos”). Son más cortos y más delgados que los flagelos; como éstos, están constituidos por subunidades proteínicas estructuradas llamada *pilinas*. Algunas fimbrias contienen un solo tipo de pilina; otras, más de uno. Las proteínas menores situadas en los extremos de las fimbrias determinan las propiedades de adhesión. Pueden diferenciarse dos clases, las fimbrias ordinarias, que intervienen en la adherencia de las bacterias simbióticas y patógenas a las células huésped. ⁽³⁾

3.4 Clasificación de *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* causante de diarrea es muy común en todo el mundo. Estas *Escherichia coli* se clasifican por las características de sus propiedades

de virulencia, y cada grupo causa la enfermedad por un mecanismo diferente. Las propiedades de adherencia a las células epiteliales de los intestinos grueso y delgado son codificadas por genes situados en los plásmidos. De manera similar, con frecuencia las toxinas son mediadas por plásmidos o por fagos. ⁽³⁾

En los últimos años se han identificado 6 categorías de ***Escherichia coli***:

- ***Escherichia coli*** enterotoxigénica (ECET) genera una enterotóxina
- ***Escherichia coli*** enteropatógena (ECEP) generada por adherencia íntima a la célula huésped.
- ***Escherichia coli*** enteroinvasiva (ECEI) por invasión a la célula.
- ***Escherichia coli*** enterohemorrágica (ECEH) adherencia a la íntima de la célula huésped
- ***Escherichia coli*** enteroagregativa (ECEAgg).
- ***Escherichia coli*** enteroadherente (ECDA) generada por una producción de enterotóxina.



CUADRO N° 1. Características de los diferentes grupos de E. coli que causan diarrea en seres humanos (Blanco 1991) ⁽¹⁷⁾

Características	ECEP	ECET	ECE	*ECHE	DAEC	EAggEC
Toxinas	Generalmente no las producen	Enterotoxinas LT y Sta	Invaden las células sin producir toxinas	Verotoxinas VT-1 y VT2		EAST-1 Hemolisina Termolabil
Factores de colonización	Factor adherente EAF. Sólo en cepas de clase I	CFA/I CFA/II CFA/III CFA/IV, PCF O159, PCF O148	Proteínas de membrana externa	Fimbria que se adhiere a células Hente-407	Adherencia Células	Estructura fibrilar posible, Pili de adhesión
Lugar de actuación	Intestino delgado y grueso	Intestino delgado	Intestino grueso	Intestino grueso		Intestino grueso
Tipo de diarrea	Acuosa	Acuosa	Sanguinolenta con fiebre	Sanguinolenta con fiebre	Acuosa	Acuosa
Países donde predomina	Amplia distribución	Principalmente en países en vía de desarrollo	Baja frecuencia en casi todo el mundo	Principalmente en EEUU y Canadá		

3.4.1 *Escherichia coli* Enteropatógena (ECEP) es causa importante de diarrea en los lactantes, particularmente en los países en desarrollo. La ECEP se asoció antes con brotes de diarrea en guarderías en los países desarrollados. La ECEP se adhiere a las células mucosas del intestino delgado. Los factores mediados cromosómicamente promueven adherencia firme. Hay pérdida de las microvellosidades (borramiento), formación de pedestales de actina filamentosa o estructuras calciformes, y en ocasiones, las ECEP penetran a las células mucosas. En las micrografías electrónicas de biopsia de

las lesiones del intestino delgado pueden observarse lesiones características. La infección por ECEP provoca diarrea acuosa, generalmente autolimitada, pero puede ser crónica. La diarrea por ECEP se ha vinculado con múltiples serotipos específicos de ***Escherichia coli***; las cepas se identifican mediante la tipificación del antígeno O y en ocasiones del antígeno H. También se puede desarrollar un modelo de infección en dos etapas con células Hep-2. Las pruebas para identificar la ECEP se llevan a cabo en laboratorios de referencia. El tratamiento con antibióticos puede acortar la duración de la diarrea por ECEP y curarla cuando es crónica. ⁽³⁾

3.4.2 *Escherichia coli* Enterotoxígena (ECET) es causa común de la “diarrea del viajero” y agente etiológico importante de diarrea en lactantes de los países en desarrollo. Factores específicos de colonización de la ECET promueve en humanos la adherencia a las células epiteliales del intestino delgado. Algunas cepas de ECET producen una exotoxina termolábil (LT) (PM 80 000) bajo control genético de un plásmido. Su subunidad B se une con el gangliósido GM₁ del borde en cepillo de las células epiteliales del intestino delgado y facilita la entrada de la subunidad A (26 000 de peso molecular) a la célula, donde activa la adenililciclase. Esto incrementa notablemente la concentración local del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), que a su vez produce hipersecreción intensa y prolongada de agua y cloruros e inhibe la reabsorción de sodio. La luz intestinal se distiende con el líquido y sobrevienen aumento de la perístasis y

diarrea que duran varios días. La LT es antigénica y presenta reacción cruzada con la enterotoxina del *Vibrio cholerae*; estimula la producción de anticuerpos neutralizantes en el suero (y tal vez sobre la superficie del intestino) de personas previamente infectadas con la *Escherichia coli* enterotoxígena. Las personas residentes en regiones donde estos microorganismo son muy prevalentes (p. ej., algunos países en desarrollo) tal vez poseen anticuerpos y son menos susceptibles a sufrir diarrea con las nuevas exposiciones a la *Escherichia coli* productora de LT. Las pruebas para LT incluyen las siguientes:

- 1) Acumulación de líquido en el intestino de animales de laboratorio.
- 2) Cambios celulares típicos en el cultivo de células ováricas de caballo chino y en otras líneas celulares.
- 3) Estimulación de la producción de esteroides en cultivos de células de tumor suprarrenal.
- 4) Pruebas de enlace e inmunitarias con antisueros LT estandarizados. Estas pruebas sólo se practican en laboratorios de referencia. Algunas cepas de la ECET producen la **enterotoxina termoestable** ST (PM 1 500 a 4 000) bajo control genético de un grupo heterogéneo de plásmidos. La ST activa la guanililciclase en las células epiteliales entéricas y estimula la secreción de líquido. Muchas cepas positivas a ST también producen LT; las cepas con ambas toxinas producen diarrea más grave. ⁽³⁾

Los plásmidos portadores de los genes para enterotoxinas (LT, ST) también pueden portar genes para **factores de colonización** que facilitan la adhesión de las cepas de *Escherichia coli* al epitelio intestinal. Factores de colonización reconocidos se presentan con particular frecuencia en algunos serotipos. Ciertos serotipos de la ECET se encuentran en todo el mundo; otros presentan distribución limitada. Potencialmente cualquier *Escherichia coli* puede adquirir un plásmido que codifique para enterotoxina. No hay una asociación definida de la ECET con las cepas de ECEP causantes de diarrea en niños. De igual manera, no hay relación entre cepas enterotoxígenas y cepas capaces de invadir las células del epitelio intestinal.

Se recomienda cautela en la selección y con el consumo de alimentos potencialmente contaminados con ECET para ayudar a prevenir la diarrea del viajero. La profilaxia antimicrobiana puede ser eficaz, pero a veces incrementa la resistencia bacteriana a los antibióticos y tal vez no debe recomendarse en todos los casos. Una vez presente la diarrea, el tratamiento con antibióticos reduce de manera eficaz la duración de la enfermedad.

3.4.3 *Escherichia coli* Enteroinvasora (ECEI) produce una enfermedad muy similar a la shigelosis. La enfermedad se presenta más comúnmente en los niños de los países en desarrollo y en las personas quienes viajan a dichos países. Igual que la Shigella, las cepas de ECEI no fermentan la lactosa, o la

fermentan tardíamente, y carecen de motilidad. La ECEI produce la enfermedad al invadir las células epiteliales de la mucosa intestinal. ⁽³⁾

3.4.4 *Escherichia coli* Enteroagregativa (ECEA) causa diarrea aguda y crónica (> 14 días de duración) en personas de los países en desarrollo. Estos organismos también son causantes de enfermedades producidas por alimentos contaminados, en países industrializados. Se caracteriza por su patrón de adherencia a células humanas. EACE produce toxina parecida a ST y una hemolisina.

Septicemia (infección sistémica por la aparición de patógenos en la sangre) cuando las defensas anormales del huésped son inadecuadas, la ***Escherichia coli*** puede alcanzar el torrente sanguíneo y provocarla.

Los recién nacidos a veces son muy susceptibles a la septicemia por ***Escherichia coli*** debido a que carecen de anticuerpos IgM. La septicemia también puede presentarse como consecuencia de infección del aparato urinario.

Meningitis: la ***Escherichia coli*** y los estreptococos del grupo B son las principales causas de meningitis en los lactantes. Casi 75% de la ***Escherichia coli*** procedente de casos de meningitis posee el antígeno K1, el cual muestra reacción cruzada con el polisacárido capsular del grupo B de la ***N. meningitidis***. El mecanismo de virulencia asociado con el antígeno K1 aún no se comprende. ⁽³⁾

3.4.5 *Escherichia coli* Enterohemorrágica (ECEH) produce **verotoxina**, así denominada por su efecto citotóxico sobre las células Vero, una línea de células renales del mono verde africano. Existen al menos dos variantes antigénicas de la toxina. La ECEH se ha asociado con colitis hemorrágica (CH), una variedad grave de diarrea; y con el síndrome urémico hemolítico (SUH), enfermedad capaz de producir insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica micro-giopática y trombocitopenia. La verotoxina tiene muchas propiedades similares a la toxina Shiga producida por algunas cepas de la ***Shigella dysenteriae*** tipo 1; sin embargo, las dos toxinas son antigénica y genéticamente distintas. De los serotipos de la ***Escherichia coli*** que producen verotoxina el más común es **O157:H7** y el único que puede identificarse en muestras clínicas. La ECEH O157:H7 no emplea sorbitol, a diferencia de la mayor parte de las otras ***Escherichia coli*** es negativa sobre agar MacConkey sorbitol (tiene sorbitol en lugar de lactosa); para identificar las cepas O157: H7 se utilizan anticuerpos específicos. Las pruebas para la verotoxina se practican en laboratorios de referencia. Muchos casos de colitis hemorrágica y sus complicaciones asociadas pueden prevenirse mediante cocción completa de la carne molida de ternera. ⁽³⁾

3.5 *Escherichia coli* O157:H7

***Escherichia coli* O157:H7** y otros serotipos de productor de toxina Shiga (STEC: Shiga Toxin *E. coli*). ***Escherichia coli* O157:H7** es un patógeno

emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos. 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. Los brotes fueron asociados epidemiológicamente con hamburguesas contaminadas, consumidas en restaurantes pertenecientes a una cadena de comidas rápidas. A partir de entonces numerosos brotes han sido notificados en distintas partes del mundo. ⁽²³⁾

Hoy se sabe que ***Escherichia coli O157:H7*** es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos de ***Escherichia coli O157:H7*** (O26:H11; O103:H2; O111: NM; O113:H21; O145: NM; entre otros) que comparten el mismo potencial patogénico. Los serotipos de STEC, asociados a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de ***Escherichia coli*** enterohemorrágico (EHEC). Los serotipos de la VTEC (Vero Toxygenic ***Escherichia coli***) asociados a la producción de enfermedad en el hombre son los que corresponden a la clasificación de enterohemorrágicos (EHEC). Esta designación se debe a su capacidad de producir lesiones hemorrágicas en el intestino. Este grupo posee una serie de cualidades que determinan su virulencia, entre las cuales cabe mencionar:

- Producen verocitotoxina (VT1, VT1- VT2, VT2 y sus variantes)
- Sintetizan una proteína llamada intimina, que es codificada por el gen llamado eaeA del cromosoma de la bacteria. La intimina es la responsable de la unión de ***Escherichia coli*** a las células de la pared intestinal (enterocitos) proceso

que inicia las lesiones en las vellosidades que los enterocitos poseen en aquella parte de su superficie que constituye la pared interna del intestino. ⁽²³⁾

En algunos casos de Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) se han aislado cepas de VTEC que carecen del gen *eaeA* en los que la unión a los enterocitos está reemplazada por la producción de otro accesorio de adherencia.

- Poseen un plásmido (esto es, ADN de doble cadena que al unir sus extremos adquiere forma circular) de gran tamaño (por eso se lo llama megaplásmido) con un peso molecular de 60 millones. Este plásmido contiene los genes necesarios para la síntesis de una enterohemolisina, toxina que es capaz de producir la destrucción (lisis) de los glóbulos rojos (de allí hemolisina) y un apéndice de adherencia al epitelio intestinal típico de las EHEC.

Resulta interesante destacar que en las primeras observaciones, en la década del 50 y del 60, surgen interpretaciones tanto clínicas como etiológicas y patogénicas, que luego fueron desplazadas por otras o relegadas al olvido para cobrar nuevamente vigencia en la actualidad enriquecidas con estudios y observaciones de los últimos años. En 1966 no hacían diferenciación entre la Púrpura Trombótica Trombocitopénica (PTT) y el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) más que por la edad de presentación y la extensión de las lesiones.

Posteriormente se desvinculó a estas entidades, diferenciando netamente por un lado la PTT o Síndrome de Moschcowitz Symmer de presentación especialmente en jóvenes adultos con sintomatología predominantemente neurológica, lesiones microvasculares diseminadas, evolución generalmente

fatal y etiología desconocida y por otro el SUH o Síndrome de Gasser de presentación principalmente en niños de corta edad, precedido generalmente por diarrea sanguinolenta, dominando el cuadro clínico la insuficiencia renal aguda junto a anemia hemolítica con lesiones microvasculares de selectiva localización renal y de etiología múltiple. Por ello se postuló que SUH y PTT pueden ser gradientes sintomáticas de una misma enfermedad. ⁽²³⁾

3.6 Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es la causa más frecuente de insuficiencia renal aguda (IRA) en los niños (en la mitad de los casos necesita diálisis). Es un síndrome que incluye IRA, trombocitopenia (disminución del número de plaquetas en la sangre) y hemólisis (destrucción de los glóbulos rojos que lleva a una anemia) esto es producto, en la mayoría de los casos, por toxinas producidas por una bacteria: ***Escherichia coli O157:H7***. La toxina producida por este serogrupo de ***Escherichia coli*** se denomina “siga toxina”, por ser similar a la producida por Shigella. La muerte por síndrome urémico hemolítico disminuyó gracias a la precocidad de los diagnósticos y a los nuevos métodos de control de la insuficiencia renal. Hoy, la tasa de letalidad es del 2 por ciento. El 70 por ciento de los niños que padecen esta enfermedad se recuperan sin secuelas, sin embargo, es necesario controlarlos regularmente porque, en algunos casos, desarrollan problemas renales o hipertensión como consecuencia tardía del síndrome.

3.7 Patogenia

La carne picada insuficientemente cocida, es el vehículo más frecuente de brotes de ETAs (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) causados por este organismo.

La colitis hemorrágica ha sido transmitida además por embutidos fermentados, leche cruda, yogures artesanales, sidra de manzana y mayonesa. Los brotes que han involucrado alimentos ácidos demuestran la tolerancia de los organismos causales a pH bajos. Estos microorganismos también han sido aislados de productos vegetales, la contaminación de vegetales puede ser consecuencia del uso de abonos orgánicos de origen bovino. También el agua ha sido considerada vehículo de transmisión, habiéndose informado de brotes asociados a la ingestión de agua no clorada, o del contacto con piletas de natación y también de un lago contaminado. También se ha identificado a la materia fecal bovina como una fuente de contaminación para alimentos y agua.⁽²³⁾

Actualmente se ha convertido en uno de los desafíos más fuertes para la industria de la carne. La transmisión persona a persona es también una vía importante para adquirir la infección debido a la baja dosis infectiva (50 – 100 UFC). Ingresa al organismo por la ingesta de carne (especialmente mal cocida), o por otros alimentos que han estado en contacto con la materia fecal de la vaca, como leche no pasteurizada, verduras y frutas mal lavadas, aguas contaminadas, etc.

El principal reservorio es el ganado bovino pero otros animales como el cerdo o las mascotas (perro, gato) pueden también actuar de reservorios. A partir de estos animales, el ser humano puede infectarse directamente, mediante alimentos lácteos o cárnicos o por la contaminación de vegetales. Los humanos contaminados pueden contagiar a otros directamente o a través de la contaminación de alimentos.

También la contaminación fecal de las aguas o la falta de higiene en el procesamiento industrial puede explicar la presencia de esa bacteria en los pescados. Es importante conocer el origen de los alimentos y en aquellos que los posean, leer muy bien los rótulos, cómo han sido conservados y procesados, observar la higiene, el cumplimiento de la cadena de frío y el grado de cocción. En esta situación lo más valioso es la prevención.

La contaminación fecal del agua y otros alimentos y la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos son rutas importantes en la transmisión de la infección.

Es importante destacar que STEC sobrevive a las temperaturas de refrigeración y congelación y puede desarrollar a 8°C. Esta característica tiene un tremendo impacto tanto en la industria de la carne, como en los sectores de comercialización en donde el uso del frío está muy extendido. Cepas de ***Escherichia coli*** enterohemorrágica (EHEC) han sido aisladas de una gran variedad de alimentos y del medio ambiente, esto implica distintas condiciones en término de nutrientes, pH, salinidad y temperatura. ⁽²³⁾

3.8 Mecanismo de acción

Estas bacterias producen unas potentes citotoxinas que destruyen in vitro las células en cultivo de la línea continua llamada Vero (que proviene de células de riñón de mono verde africano) razón por la cual han sido bautizadas como verocitotoxinas. También se conocen como (SLT) Shiga-like toxins (toxinas parecidas a la Shiga), porque pertenecen a la misma familia que la citotoxina Shiga sintetizada por la bacteria *Shigella dysenteriae* tipo 1 causante de la disentería bacteriana. La producción de verocitotoxinas está codificada por los ácidos nucleicos de distintos bacteriófagos, que son virus que infectan a las bacterias, los que incorporan instrucciones en *Escherichia coli* para sintetizar nuevos compuestos. Hay dos tipos de verocitotoxinas, las VT1 (SLT-I) y las VT2 (SLT-II) con sus variantes que incluyen a la VT2e, producida por las bacterias que causan la enfermedad de los edemas en el cerdo. Las verocitotoxinas ejercen su acción sobre una amplia variedad de células endoteliales que tapizan el interior de los vasos sanguíneos y sobre células epiteliales, incluyendo aquellas que tapizan el interior del íleon (parte final del intestino delgado) y colon (intestino grueso), células endoteliales glomerulares (los glomérulos son la estructura renal encargada de filtrar el plasma sanguíneo). También actúan sobre los glóbulos rojos que presentan en su membrana el grupo glicolípido P1. Las verocitotoxinas actúan sobre las células uniéndose específicamente a componentes de la membrana celular llamados receptores. Se sabe ahora que estos receptores son glicolípidos (componentes de la

membrana celular formados por lípidos y azúcares) específicos. El receptor habitual para VT1 y VT2 es una ceramida trihexosida llamada Gb3; la VT2e puede unirse a un glicolípido neutro diferente denominado Gb4. Las verocitotoxinas están formadas por dos subunidades llamadas A y B. La subunidad B es la encargada de asociar a la VCT con el glicolípido. Luego, la subunidad A de la toxina inicia la inhibición de la síntesis proteica en la célula llevando a la muerte celular por apoptosis; la inhibición se produce por inactivación de la fracción llamada 60S de los ribosomas encargados de la síntesis de proteínas. Cuando esto sucede a nivel de las células que constituyen el endotelio de los vasos sanguíneos, el daño produce coagulación intravascular principalmente en el sistema nervioso central, el tubo digestivo y los riñones. ⁽²³⁾

3.9 Factores y condiciones para el desarrollo de *Escherichia coli* Enterohemorrágica.

Escherichia coli enterohemorrágico también pueden causar infecciones cuando se hallan presentes en un alimento en cantidades muy escasas, en individuos que son vulnerables por razón de la edad avanzada o de la corta edad, por enfermedad o después de una terapia inmunosupresora. También se deben adoptar medidas rigurosas para evitar la contaminación cruzada desde el alimento crudo al cocido o cocinado.

Por esta razón, se debe ejercer vigilancia y, en aquellos casos en los que sea necesaria intervención, en todas las líneas de fabricación, abastecimiento, distribución y almacenamiento.

Los alimentos frescos o naturales suelen contener una población microbiana mixta. La velocidad del crecimiento de cada organismo depende de muchos factores, lo que influye de modo notable el carácter de la población que finalmente predominará. Estos factores fueron clasificados por Mossel ⁽²⁰⁾ en cuatro grupos principales:

- 1) **Factores intrínsecos:** aquellos que dependen de las características del sustrato de crecimiento, es decir, del propio alimento. Incluyen parámetros químicos, tales como la cantidad de agua disponible (a_w), los tipos y niveles de nutrientes disponibles, el pH y la capacidad tampón o amortiguadora de los cambios de pH, el potencial redox y la capacidad tampón del potencial redox, y las sustancias antimicrobianas naturales. Además, son importantes los factores biológicos intrínsecos, es decir, resultantes de la estructura de los tejidos de los alimentos. ⁽²⁰⁾
- 2) **Factores de procesado o tratamiento:** aquellos que son consecuencia de los tratamientos aplicados durante la elaboración de los alimentos, tanto a escala industrial como a escala doméstica, que modifican primariamente la composición de la microflora. Entre ellos: los tratamientos físicos que

ocasionan la muerte de los microorganismos, por ejemplo, el calentamiento y la irradiación; los cambios similares llevados a cabo por la adición de compuestos químicos, por ejemplo, los cambios de pH causados por la adición de ácidos, o por inoculación de organismos que producen ácidos, o por las presiones selectivas creadas como consecuencia de la adición de agentes conservadores; los aumentos en determinados recuentos de colonias que son consecuencia de la contaminación, procedente del medio ambiente en el que se tratan los alimentos. ⁽²⁰⁾

- 3) **Factores extrínsecos:** por ejemplo, la temperatura de almacenamiento, la humedad de la atmósfera y la composición de la fase gaseosa

- 4) **Factores implícitos:** estos efectos dependen de la microflora particular dominante que inicialmente se desarrolla en respuesta a los factores intrínsecos, del tratamiento y extrínsecos. Los efectos implícitos pueden ser sinérgicos o antagónicos. Los efectos sinérgicos implican la alteración de las condiciones por un grupo de microorganismos de modo que otro grupo resulta favorecida. Esto puede suceder como consecuencia de:
 - a) Organismo que elimina una sustancia que es inhibidora para otro.
 - b) Organismo que produce factores de crecimiento requeridos por otro.
 - c) Alteración microbiana del pH, del Eh, del contenido de agua o de la estructura del alimento, que favorecen el crecimiento de otros organismos. Los

efectos antagónicos son análogos, excepto que actúan de un modo opuesto: por ejemplo, un grupo de organismos puede eliminar un factor de crecimiento necesario para el crecimiento de otro. ⁽²⁰⁾

Los factores intrínsecos y extrínsecos que actúan sobre el crecimiento de ***Escherichia coli*** son comunes a la ***Escherichia coli O157:H7***. Las células de ***Escherichia coli O157:H7***, son resistentes a temperaturas de refrigeración y congelación, y se destruyen solamente cuando son sometidas a temperaturas superiores a 71° C. El microorganismo tiene como características bioquímicas diferenciales las siguientes: no es capaz de fermentar el sorbitol o lo hace lentamente, no crece en las temperatura utilizadas para diferenciar ***Escherichia coli*** de los demás coliformes (44.5°C-45.5°C) y no produce betaglocuronidasa. ⁽²¹⁾

La capacidad de supervivencia de la ***Escherichia coli O157:H7*** en pH ácido ha sido estudiado por algunos investigadores. Ensayos realizados con mayonesa industrializadas con pH entre 3,6 y 3,9, mantenidas a temperaturas de 5° C y 20° C, concluyeron que la E. coli O157:H7 tiene la capacidad de sobrevivir mas tiempo a 5° C (34 a 55 d) que a 20° C (8 a 21 d) También se observó que el microorganismo se mantiene bien en mayonesa y en salsas base de mayonesa a 7° C y a 25° C y por lo tanto esos, y probablemente otros alimentos ácidos pueden participar en la transmisión del microorganismo. La ***Escherichia coli O157:H7*** se mantiene viable en alimentos ácidos por 35 días, si son conservados en refrigeración. ⁽²¹⁾

3.10 Epidemiología ⁽¹⁹⁾

La infección fue reportada por primera vez en EE.UU., el brote de Colitis Hemorrágica y fue producto de ECEH del serotipo O157:H7 no fermentador de sorbitol. Desde entonces ha sido responsable de al menos 216 brotes epidémicos de Colitis Hemorrágica, los cuales tuvieron lugar en su mayoría en EE.UU, Canadá y Gran Bretaña.

El primer brote confirmado de *Escherichia coli* O157:H7 verotoxigénico ocurrió en 1983. El más grave de todos ocurrió en 1985 en una residencia de la tercera edad en Ontario (Canadá) y en él se vieron afectados 55 de los 169 residentes y 18 de los 137 empleados del centro, murieron 19 personas. Otro de los brotes afectó a un grupo de estudiantes canadienses que al visitar una granja consumieron leche fresca recién ordeñada. Entre 1986 y 1988 se realizó un estudio epidemiológico en niños para definir el rasgo distintivo del SUH en pacientes en que *Escherichia coli* O157:H7 fue aislado en materia fecal; en una población de estudio de 226 niños; 60 de ellos desarrollaron HUS en 1998; 86 en 1987 y 80 en 1988, la edad promedio de los niños fue de 2 años y el 72% fueron menores de 5 años. El análisis mostró un alto estatus socio-económico entre los niños con SUH como se ha observado también en Argentina. Se ha propuesto como hipótesis que los niños con bajo estrato socio-económico puedan estar protegidos por una temprana exposición a *Escherichia coli* O157:H7 verotoxigénica y desarrollan inmunidad antes que se presenten efectos sistémicos de las verotoxinas.

En 1988 se reportó el primer brote en una comunidad del Reino Unido, 24 personas fueron afectadas, los vegetales fueron asociados al curso de la infección. Entre 1987 y 1991 se establecieron 1773 casos de infección por ***Escherichia coli O157:H7*** verotoxigénica en Alberta (Canadá) y Escocia, 115 casos de HUS y 24 muertes, el consumo de carne fue la fuente más comúnmente implicada 66%.

En 1993 se presentó un brote en Sheffield (Inglaterra) en el cual tres niños sufrieron SUH después de haber bebido leche no pasteurizada y en este mismo año se aislaron en Gran Bretaña cepas de ***Escherichia coli O157:H7*** de leche cruda, carne cruda y vacas lecheras.

Aislamientos ocasionales de ***Escherichia coli O157:H7*** se han reportado en brotes en Bélgica, Italia, Israel y Africa meridional (Brote de agua que afectó a cientos de personas en octubre de 1992).

En Colombia un estudio reveló una incidencia de ***Escherichia Coli O157:H7*** en bovinos sanos de 6.5%: la alta incidencia encontrada en bovinos indica que el ganado sano es un reservorio importante, este hecho indica la necesidad de potenciar medidas higiénicas en los sitios de sacrificio de los animales y así mismo la implementación de programas educacionales respecto al proceso de cocción de las carnes; esencialmente en el área de mayor prevalencia del patógeno. ⁽¹⁹⁾ (mas brotes ver anexo N°. 2)

El desarrollo de una enfermedad y el apareamiento de sus síntomas clínicos en el hombre no son dependientes únicamente de la presencia de los patógenos

en el organismo ni de sus mecanismos patagónicos. Es necesario que ocurra la interacción sinérgica de varios factores para que se manifieste el síndrome de la enfermedad. Estos factores pueden estar asociados a los agentes patógenos o a las personas, aisladamente o relacionarse a una comunidad que comparte una o más características predisponentes a la enfermedad como sean los grupos étnicos, anomalías fisiológicas como por ejemplo supresión o deficiencia temporal de los mecanismos de inmunidad. El hombre sano cuenta con varios mecanismos de protección contra agresiones del medio ambiente. Dos de esos mecanismos juegan un rol fundamental en la protección de la salud:

-Las barreras no específicas: como la acidez estomacal, las secreciones químicas de la membrana mucosa del intestino y de otros órganos del cuerpo humano; juegan un papel fundamental para impedir o dificultar que el agente invasor (microorganismo) llegue, aun viable, al sitio en cual desempeñará funciones patogénicas; por otro lado, el organismo también cuenta con barreras específicas, como las que actúan selectivamente sobre agentes patógenos y sus toxinas, tratando de neutralizar su acción nociva.

-Las barreras específicas: que entran en funcionamiento cuando los agentes invasores logran sobrepasar las barreras no específicas y alcanzan sitios internos del organismo. Esas barreras se constituyen en las respuestas del sistema inmunológico, con la producción de anticuerpos y/o inmunoglobulinas, como respuestas al estímulo de un antígeno específico.

La exposición diaria y constante a los agentes patógenos causantes de ETAs es, sin duda, un factor de riesgo epidemiológico. De otra parte la convivencia permanente con sintomatología leve de ETAs, como sean las diarreas leves; pueden llevar a una conceptualización de condición de normalidad, considerándose por ejemplo, que la diarrea solo es síntoma de enfermedad, acompañada de otros síntomas que dificulten las actividades diarias. Además, la inmunidad que se adquiere naturalmente por el contacto constante con pequeñas dosis del agente infeccioso o toxigénico, puede influenciar los datos sobre riesgos de ocurrencia de ETAs, porque los estados endémicos tienden a producir un “equilibrio” en la población que considerando diarreas y/o vómitos con criterios menos rígidos que los de un diagnóstico clínico, ya que esos síntomas por comunes pueden considerarse condición normal.

Otros índices, como la tasa de mortalidad infantil pueden, por otro lado, indicar con mayor seguridad los riesgos reales a que se exponen los consumidores de alimentos callejeros. De otra manera resumida, se puede afirmar que en situaciones de endemia ocurre una “selección natural” de los individuos mas resistentes durante la primera infancia. La ocurrencia de diarrea infantil refleja, además de la diseminación de patógenos entéricos, la posible resistencia adquirida por la población adulta. La incidencia de ETAs entre turistas y visitantes de otras áreas en donde las acciones básicas de salud son más efectivas, es otro ejemplo de la existencia del riesgo de enfermarse a través del consumo de alimentos callejeros, y de la ocurrencia de la enfermedad no

asociada con un estado de equilibrio endémico. Hasta el 50% de los visitantes se enferman después de consumir alimentos en donde la diseminación de agentes patógenos por esta vía es expresiva. La diarrea de los viajeros es mundialmente reconocida como enfermedad asociada al consumo de alimentos.⁽²¹⁾

3.11 CARNE MOLIDA ⁽¹¹⁾

La carne molida ha sido considerada en todo el mundo como un alimento nutritivo muy deseable, pero su papel como alimento básico ha cambiado recientemente en los países más ricos. Los desarrollos tecnológicos alcanzados en el procesado, conservación y manipulación de los alimentos han permitido a los consumidores poder elegir los alimentos que pueden comprar dentro de una gama muy amplia.

Junto a esta preocupación por la frescura debe situarse el énfasis creciente que se presta a los aspectos sanitarios; la carne, por su propia naturaleza y origen, no sólo es muy sensible a la alteración, sino que frecuentemente está también implicada en la difusión de enfermedades transmitidas con los alimentos; a pesar de los muchos avances que han tenido lugar en los últimos 100 años en la higiene del procesado de este alimento, la preocupación por el papel de los productos cárnicos como causa de toxiinfecciones está aumentando en lugar de disminuir.

La carne está constituida fundamentalmente por el tejido muscular de la “carne roja” de los mamíferos que en la práctica corriente se limitan a un número pequeño de “especies de abasto”. El músculo está formado por elementos miofibrilares contráctiles y proteínas sarcoplásmicas solubles; hasta una cuarta parte de su peso es tejido conjuntivo y dependiendo del músculo en particular una tercera parte puede ser grasa. Aunque el tejido conectivo crudo es relativamente resistente al ataque microbiano, no se ha demostrado claramente que su presencia tenga consecuencia microbiológica significativa alguna; de otra parte, el tejido graso presenta propiedades claramente diferentes de las del músculo.

3.11.1 Propiedades importantes de la carne molida

Desde el punto de vista microbiológico la propiedad más importante es que la carne presenta un gran contenido de agua (Cuadro N^o.3) que corresponde a una a_w de aproximadamente 0,99, lo que permite el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.

El músculo contiene aproximadamente un 75% de agua en la que hay disueltos una gran variedad de importantes sustratos de crecimiento y de otros micronutrientes (Cuadro N^o.3); por lo tanto, el músculo es un medio muy apto para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos, en especial bacterias a quienes favorecen las condiciones de humedad.

CUADRO N° 2. Composición aproximada de la musculatura de mamíferos adultos después del rigor mortis.

Componentes	%	Peso húmedo
Agua		
Proteína		75
Conectivo estructural	2.0	
Miofibrilar	11.5	19
Sarcoplásmica	5.5	
Grasa		2.5
Carbohidratos		
Glucógeno	0.1	
Glucosa + fosfatos	0.2	1.2b
Ácido láctico	0.9	
Sustancias solubles diversas		
Nitrógenadas: Aminoácidos	0.35	
Creatina	0.55	1.65
Ingredientes	0.75	
menores	0.35	
Inorgánicas: K	0.2	0.65
P	0.1	
Otras		
Vitaminas: La mayoría del grupo B		
Presentes en cantidades utilizables		

a. Basada en Lawrie

b. Variable hasta casi inexistente

El crecimiento de los microorganismos de la carne tiene lugar fundamentalmente a expensas de sus componentes solubles: carbohidratos, ácido láctico y aminoácidos. Las propiedades redox de la carne ejercen una gran influencia en su microbiología; el factor central es la respiración tisular que continúa consumiendo oxígeno (si existe) y produciendo CO₂. En los animales vivos la demanda de oxígeno está más que compensada por el que transporta la sangre y la tensión de oxígeno y el potencial redox del músculo vivo son grandes (salvo en determinados músculos en periodos largos de ejercicio violento). Al cesar con la muerte el aporte sanguíneo, el contenido de oxígeno y

el potencial redox del músculo disminuyen gradualmente, llevando a la producción y acumulación anaeróbica de ácido láctico; la acidez desarrollada puede ser suficiente para reducir mucho el metabolismo tisular que, sin embargo, continúa varios días a una velocidad (incluso a temperatura baja) que supera a la que el oxígeno puede difundir unos pocos milímetros en la carne; por lo tanto, la masa cárnica en unas pocas horas *post mortem* se convierte en anaerobia y permanece así, salvo una pequeña porción superficial ventilada de unos pocos milímetros de grosor, lo que se manifiesta porque tiene un color rojo más brillante y porque no se origina acidez. Cuando la carne se congela, se trata por el calor o se sala, se inhibe la respiración; no obstante, normalmente persiste la suficiente actividad reductora como para mantener condiciones anaeróbicas en el interior de cualquier trozo de carne de un espesor mayor de unos 10mm aproximadamente. Consecuentemente, aunque en la superficie se desarrolle una flora aeróbica, en la carne sólo pueden crecer los anaerobios o los anaerobios facultativos (algunos de los últimos sólo crecen con relativa lentitud). Debido a que pocos de estos microorganismos anaerobios se desarrollan fácilmente a temperaturas bajas, en la profundidad de la carne refrigerada lo hacen difícilmente, incluso después de transcurrido mucho tiempo. Cuando se pica la carne se vuelve a airear, pero si se envasa a continuación, en su masa se reinstauran gradualmente las condiciones anaeróbicas; si hay muchos microorganismos (más de $10^6/g$) su respiración aumenta la de los tejidos.

En condiciones naturales el pH de la carne puede oscilar desde aproximadamente 7,0, que está muy cerca del óptimo de muchas bacterias patógenas y causantes de alteración a valores próximos a 5,0; los próximos a 5,5 son por sí mismos desfavorables al desarrollo de muchas bacterias importantes y combinados con otros factores perjudiciales, tales como temperaturas bajas, pueden prevenir el crecimiento casi por completo. El pH bajo, combinado con las sales del curado, es especialmente eficaz frente a las bacterias que corrientemente se encuentran en las carnes curadas. El pH de la carne es inversamente proporcional a la cantidad de ácido láctico producido por la glucólisis muscular después de la muerte.

3.11.2 Métodos de conservación

La carne es un producto muy alterable, es decir, los microorganismos deteriorantes crecen fácilmente en ella; de aquí que el comercio de la carne, incluso a nivel de venta local a granel, dependa en cierto grado de los métodos de conservación que controlan la flora alterante; cuanto mayor sea su procesado y más distante el mercado más necesaria es la conservación.

Los sistemas de conservación más importantes son la refrigeración, el tratamiento térmico (incluido el enlatado), el curado (frecuentemente con ahumado) y el secado o deshidratación. La moderna tecnología combina frecuentemente varios de estos procedimientos; por ejemplo, el jamón curado ahumado puede enlatarse, tratarse térmicamente y mantenerse en refrigeración con lo que permanece en condiciones de consumo durante mucho tiempo.

El almacenamiento a temperaturas bajas (refrigeración y congelación) por sí solo permite mantener la carne cierto tiempo sin que sus propiedades cambien apreciablemente. Por otra parte otros métodos de conservación (tratamiento térmico, enlatado, desecación, curado y ahumado) afectan de alguna forma a las propiedades características de la carne y dan lugar a un producto totalmente distinto de la carne fresca.

El tratamiento térmico destruye las formas vegetativas de los microorganismos alterantes y de la mayoría de los patógenos, disminuyendo la proporción de sobrevivientes a medida que aumenta la temperatura aplicada; un buen curado controla la flora alterativa normal y la patógena, además de modificar el aspecto y el aroma; la congelación, refrigeración y envasado pueden practicarse con cualquier tipo de carne cruda, curada, o tratada por el calor.

La pasteurización a temperaturas menores de 85°C puede dejar algunos microorganismos viables capaces de crecer en el producto; estos productos tienen sólo una estabilidad limitada ("semiconserva"); las temperaturas más altas originan productos microbiológicamente estables ("conservas") y las pocas esporas sobrevivientes no pueden desarrollarse. El envasado a vacío (que favorece a las especies anaerobias y anaerobias facultativas), la refrigeración (que limita el crecimiento bacteriano o sólo las especies psicrotrofas) y la congelación (que hasta la fusión del hielo detiene todo crecimiento) modifican estas relaciones básicas.

3.11.3 Microflora inicial

Con la excepción de la superficie externa y de los tractos digestivos y respiratorios, los tejidos de los animales sanos contienen pocos microorganismos; los mecanismos de defensa animal controlan con eficacia los agentes infectivos en los animales sanos vivos; sin embargo, esta defensa falla después de la muerte.

Hay pruebas que demuestran que el número de microorganismos del interior de los tejidos aumenta durante el estrés y desciende de nuevo tras el reposo. Recuentos variables a 37°C del orden de 10^3 g de tejido pueden indicar una invasión microbiana bajo un estrés poco corriente, pero hay indicios de que existen diferencias entre las distintas especies animales, y este problema es todavía objeto de controversia.

La limpieza del ganado en el momento del sacrificio depende de una serie de factores que varían con la ubicación de la explotación, el método de transporte y las condiciones de estabulación en el matadero, la contaminación de los animales que pastan en épocas lluviosas bajo condiciones de humedad, será distinta de la del ganado procedente de zonas secas y polvorientas. La temperatura que predomina en el suelo influenciará la proporción de microorganismos psicrótrofos en la contaminación de este origen. Los suelos tropicales contienen menos bacterias psicrotrofas que los de zonas templadas y los microorganismos de la piel y de la carne del vacuno siguen un comportamiento similar. El vacuno estabulado, explotado en régimen intensivo,

suele llevar menos microorganismos del suelo y más bacterias fecales que el de pastoreo; la naturaleza y la cantidad de contaminación fecal se ven afectadas por la dieta y otros factores.

La carne se contamina por contacto con el pelo, piel, patas, contenido estomacal y entérico, leche de la ubre, fábrica y equipo de la misma, manos y ropa de los operarios, agua utilizada para el lavado de la canal e incluso el aire de las zonas de procesado y de almacenamiento. La contaminación puede darse casi en todas las operaciones del sacrificio, despiece, procesado, almacenamiento y distribución de la carne; la intensidad con que ocurre la contaminación refleja las normas de higiene y limpieza observadas en el matadero y en la planta de procesado. La composición de esta flora es un reflejo de las distintas fuentes contaminantes y de la eficacia de las medidas higiénicas que persiguen evitar la difusión microbiana.

El procesado primario de la carne consiste en el sacrificio, desollado y evisceración, refrigeración y despiece. La flora inicial viene determinada principalmente por la contaminación superficial acaecida durante estas operaciones.

3.11.4 Sacrificio

Las bacterias pueden llegar a la profundidad tisular con la corriente sanguínea, como consecuencia de la contaminación del cuchillo de degollar, pero la facilidad con que pueden obtenerse tejidos estériles de animales sacrificados en

el matadero por el sistema corriente, indica que la contaminación por el sistema sanguíneo normalmente es pequeña. A esta causa se han atribuido algunos fallos durante el curado de jamón, si bien ello no se ha confirmado de forma definitiva.

3.11.5 Refrigeración

El efecto de la refrigeración en la flora microbiana depende de varios factores; la refrigeración rápida a temperaturas bajas con aire a gran velocidad y baja humedad puede reducir la carga bacteriana. En condiciones menos rigurosas puede tener lugar el crecimiento de los microorganismos psicrótrofos alterándose así la proporción de psicrótrofos/mesófilos. El tiempo que la canal permanece en la cámara de refrigeración puede tener más efecto en la población microbiana que la temperatura de refrigeración. Con tal de que se mantengan convenientemente las condiciones de refrigeración, la contaminación aérea no sobrepasará los 10^2 microorganismos/m²/minuto, que aportará unos 14 microorganismos/cm² de superficie de canal/día. Si las canales se dejan enfriar a temperatura ambiente (de 15-20°C o más) pueden desarrollarse las bacterias mesófilas, incluidas las patógenas. El despojos comestible generalmente está mucho más contaminado que la carne de la canal y por lo tanto deben someterse a enfriamiento inmediatamente. Ciertos países, por ejemplo, los de la Comunidad Europea exigen su enfriamiento por debajo de 3°C. ⁽¹¹⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLÓGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 Tipo de estudio:

- Campo: Realizada en supermercados Súper Selectos, Despensa de don Juan, Europa e Hiper Europa y Despensa familiar.
- Experimental: Realizada en los Laboratorios de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD)
- Transversal: Microorganismo que representa una problemática actual.

4.1.1 Investigación Bibliografica:

Visita y consulta en las bibliotecas de las siguientes instituciones:

- Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Medicina de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca del Colegio de Médicos de El Salvador.
- Libros relacionados con el tema y consulta a sitios Web en Internet.

4.1.2 Investigación de Campo ⁽²⁾

Visita y entrevista con Personal capacitado y responsable en las siguientes instituciones.

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
- Ministerio de Salud Publica y Asistencia Social (MSPAS)

4.2 Diseño y Tamaño de la muestra. ⁽²⁾

Se realizó un muestreo estratificado de acuerdo a los tipos de supermercados que se encuentran en el área metropolitana de San Salvador, para seleccionar las salas de los supermercados entre los cuales se seleccionaron las muestras de carne molida de res cruda.

Se considera el 50% de la población (p) ya que no se tiene una investigación previa que determine este porcentaje. El muestreo estratificado se hará clasificando los supermercados del área metropolitana de San Salvador por sus líneas comerciales, (ver anexo 3) es decir cuatro estratos de la siguiente manera

CUADRO N° 3. Estratos, supermercado, cantidad de supermercados.

Número de estrato	Nombre del supermercado	Cantidad de supermercados en el área metropolitana de San Salvador
1	Súper Selectos	27
2	Despensa de Don Juan	9
3	Europa e Hiper Europa	5
4	Despensa Familiar	1
	Total de Supermercados	42

Para seleccionar los supermercados a muestrear por estrato, se utilizó un muestreo aleatorio simple, en donde fue elegido al azar. ⁽²⁾

$$n = \frac{N Z^2 pq}{d^2(N-1) + Z^2 pq}$$

Donde: N: Tamaño del universo
 Z: Grado de confianza del 95%
 Pq: Desviación típica ò estándar de la población
 d: Error muestral máximo permisible en la investigación

$$\text{Así tenemos: } n = \frac{42 (1.96)^2 (0.5) (0.5)}{(0.5)^2 (42-1) + (1.96)^2 (0.5) (0.5)}$$

$$n = 3.6 \approx 4 \text{ (Tamaño de muestra)}$$

El porcentaje representativo de cada estrato se representa así:

$$\% = (N_i / N) \times 100$$

Donde: Ni: Numero de supermercados por estrato
 N: Numero de supermercados en el universo

Así tenemos

$$\% = (27/42) \times 100; \quad = 64 \% \text{ Representación porcentual del estrato 1}$$

CUADRO N° 4. Porcentaje de representatividad de los supermercados

Estrato	Calculo	Porcentaje (%)
1	$\% = (27/42) \times 100$	64
2	$\% = (9/42) \times 100$	21
3	$\% = (5/42) \times 100$	12
4	$\% = (1/42) \times 100$	3
Total		100

La unidad muestreada por cada estrato se obtiene de la siguiente forma:

$$n_i = n (N_i / N)$$

Donde: N_i : Numero de supermercados por estrato

N : Numero de supermercados en el universo

n : Tamaño de muestra

n_i : Numero de supermercados a muestrear por estrato

Así por estrato 1, tenemos:

$$n_i = 4 (27/42)$$

$$n_i = 2.57 \approx 3 \text{ supermercados a muestrear en el estrato 1}$$

CUADRO No 5. Cantidad de supermercados a muestrear por estrato

Estrato	Calculo	Cantidad
1	$n_i = 4 (27/42)$	3
2	$n_i = 4 (9/42)$	1
3	$n_i = 4 (5/42)$	1
4	$n_i = 4 (1/42)$	1
Total		6

CUADRO N° 6. Variedad comercial de la carne por estrato

Estrato	Súper Especial	Especial	Regular	Lomo de ternera
1	SI	SI	SI	SI
2	SI	SI	SI	SI
3	SI	SI	NO	NO
4	SI	SI	NO	NO

Para conocer la cantidad de muestras de carne que se tomaron por supermercados por cada estrato se desarrollara la siguiente formula:

$$n = \frac{Z^2 pq}{d^2}$$

Donde:

Z: Grado de confianza del 95%

Pq: Desviación típica ò estándar de la población

d: Error muestral máximo permisible en la investigación

$$\text{Así tenemos: } n = \frac{(1.96)^2 0.25}{(0.5)^2}$$

$$n = 3.84$$

$$n = 4 \text{ muestras por supermercado}$$

Se tomaron 4 muestras de carne por supermercados por cada estrato, es decir una muestra por variedad.

CUADRO N° 7. Cantidad de muestras de variedad de carne por estrato

Estrato	Súper Especial	Especial	Regular	Lomo de ternera (Lomo)
1	1 muestra	1 muestra	1 muestra	1 muestra
2	1 muestra	1 muestra	1 muestra	1 muestra
3	1 muestra	1 muestra	NO	NO
4	1 muestra	1 muestra	NO	NO
Total	4 muestras	4 muestras	2 muestras	2 muestras

Así tenemos, en el estrato 1 que se tomaron 3 supermercados

Por tanto:

$$n_T = *n \times \# \text{ de supermercados por estrato}$$

$$n_T = 4 \times 3$$

$$n_T = 12 \text{ bandejas de carne}$$

Se tomaron 12 muestras de carne en el estrato 1, es decir 4 bandejas de carne molida por cada uno de los 3 supermercados.

CUADRO N° 8 Cantidad de muestra a tomar por estrato

Estrato	Muestras de carne por estrato
1	12
2	4
3	2
4	2
Total	20

En el estrato 3 y 4 solo comercializan dos variedades de carne molida por tanto solo se tomó una de cada una. (ver cuadro N°. 7)

CAPITULO V
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 El muestreo realizado en los supermercados para la obtención de la carne molida de res cruda y posterior enriquecimiento, tenemos los siguientes supermercados:

CUADRO N° 9 Listado de supermercados a muestrear

Nombre de supermercados a muestrear
1. Selectos, Caribe
2. Selectos, Centro
3. Selectos, Metro Sur
4. Despensa de Don Juan, Darío
5. Europa, Centro
6. Despensa Familiar, Centro

5.2 Aislamiento selectivo del microorganismo, de acuerdo a esto a continuación se presentan los resultados obtenidos del aislamiento con medios selectivos y diferenciales comparándose los resultados con los obtenidos con la cepa ATCC de *Escherichia coli O157:H7*. debido a que este microorganismo no fermenta el sorbitol y carece de la enzima betaglucoronidasa que le confiere la fluorescencia en medios fluorogénicos como agar Fluorocult E. coli O157:H7.

CUADRO N° 10 Perfil de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 a través de medios selectivos y diferenciales.

Cepa ATCC	Agar MacConkey - sorbitol	EMB	Agar Fluorocult E.coliO157:H7	Fluorescencia	Agar Chromocult coliforme
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	-	+	+	-	+

Los resultados obtenidos con la cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 proporcionada por el Ministerio de Salud Pública y Asistencia social nos indica los siguientes parámetros:

- Forman colonias no fermentadoras de sorbitol en agar MacConkey sorbitol, es decir colonias incoloras.
- Forman colonias Azules con brillo metálico en agar EMB.
- Forman colonias incoloras, puntiformes, definidas en agar Fluorocult E. coli O157:H7, sin fluorescencia frente a luz ultravioleta a longitud de onda de 366nm
- Forman colonias violetas, puntiformes, definidas en agar Chromocult coliforme.

CUADRO N° 11 Aislamiento a través de medios selectivos y diferenciales en estrato 1.

Selectos Caribe	Agar MacConkey -sorbitol	EMB	Agar Flourocult E.coliO157:H7	Fluorescencia	Agar Chromocult coliforme	<i>E. coli O157:H7</i>
Lomo	-	-	+	-	+	Ausente
Súper especial	-	-	+	-	+	Ausente
Especial	-	-	+	-	-	Ausente
Regular	-	-	+	-	+	Ausente
Selectos Centro						
Lomo	-	-	+	-	+	Ausente
Súper especial	-	+	+	+	-	Ausente
Especial	-	-	+	+	-	Ausente
Regular	+	+	-	+	-	Ausente
Selectos Metrosur						
Lomo	-	-	+	-	+	Ausente
Súper especial	-	-	+	-	-	Ausente
Especial	-	-	+	-	+	Ausente
Regular	-	-	+	-	+	Ausente

CUADRO N° 12 Aislamiento a través de medios selectivos y diferenciales en estrato 2.

Dispensa de don Juan Darío	Agar MacConkey sorbitol	EMB	Agar Flourocult E.coliO157:H7	Fluorescencia	Agar Chromocult coliforme	<i>E. coli O157:H7</i>
Lomo	-	-	+	-	-	Ausente
Súper especial	-	-	+	-	-	Ausente
Especial	-	-	+	-	-	Ausente
Regular	-	-	+	-	-	Ausente

CUADRO N° 13 Aislamiento a través de medios selectivos y diferenciales en estrato 3.

Europa Centro	Agar MacConkey sorbitol	EMB	Agar Flourocult E.coliO157:H7	Fluorescencia	Agar Chromocult coliforme	<i>E. coli</i> O157:H7
Súper especial	-	-	+	-	+	Ausente
Especial	-	+	-	-	+	Ausente

CUADRO N° 14 Aislamiento a través de medios selectivos y diferenciales en estrato 4.

Despensa Familiar Centro	Agar MacConkey sorbitol	EMB	Agar Flourocult E.coliO157:H7	Fluorescencia	Agar Chromocult coliforme	<i>E. coli</i> O157:H7
Súper especial	-	-	+	-	-	Ausente
Especial	-	-	+	-	-	Ausente

Los resultados obtenidos en el aislamiento a través de medios selectivos y diferenciales para cada una de las muestras de los cuatro estratos, nos indica ausencia de ***Escherichia coli* O157:H7** debido a que ninguna muestra cumple con el parámetro de resultados obtenidos en la cepa ATCC de ***Escherichia coli* O157:H7** (ver cuadro N° 9), es decir que ninguna muestra responde de la misma manera frente a los medios de cultivo. Por lo que fue necesario caracterizar bioquímicamente las cepas aisladas para conocer los tipos de microorganismos presentes en las muestras.

5.3 Para la caracterización bioquímica de las cepas aisladas y determinar la ausencia o presencia de la cepa en estudio se compararon los resultados con los obtenidos con la cepa ATCC de ***Escherichia coli* O157:H7**.

CUADRO N° 15 Identificación de cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 a través de pruebas bioquímicas.

MSPAS	TSI	Citrato	Movilidad	Indol	Voges-Proskauer	Rojo de metilo	Microorganismo identificado
Cepa ATCC	A/A g(+)	-	+	+	-	+	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

Los resultados obtenidos con la cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 de acuerdo a pruebas bioquímicas nos indica:

- Formación de gas sin producción de H₂S en TSI
- El microorganismo no utiliza el citrato como fuente de carbono.
- Movilidad gracias a su capacidad flagelar.
- Formación de Indol por la degradación del aminoácido Triptófano.
- No hay conversión de acetoina en diacetil en la prueba de Voges-Proskauer
- Formación de ácidos fuertes a partir de la glucosa en rojo de metilo.

CUADRO N° 16 Identificación de cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 a través de pruebas bioquímicas API 20E.

MSPAS	Perfil Numérico	Microorganismo identificado
Cepa ATCC	5144176	<i>Escherichia coli</i> O157:H7

De acuerdo a pruebas bioquímicas API 20E el perfil numérico de *Escherichia coli* O157:H7 es **5144176** este valor es obtenido a través de una hoja de resultados que acompaña a cada prueba API 20E (ver anexo 8).

CUADRO N° 17 Identificación a través de pruebas bioquímicas en seis muestras de estrato 1.

Selectos Caribe	TSI	Citrato	Movilidad	Indol	Voges-Proskauer	Rojo de metilo	Microorganismo identificado
Súper especial	A/A g(+)	+	+	-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
Especial	k/k g(-)	+	-	-	-	-	<i>Pseudomona sp</i>
Selectos Centro							
Lomo	A/A g(+)	+	+	-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>
Selectos Metro sur							
Lomo	k/A g(-)	-	+	-	-	+	<i>Shigella sp</i>
Súper especial	k/k g(-)	+	-	-	-	-	<i>Pseudomona sp</i>
Regular	k/A g(-)	-	+	-	-	+	<i>Salmonella typhi</i>

CUADRO N° 18 Identificación a través de pruebas bioquímicas API 20E en seis muestras de estrato 1

Selectos Caribe	Perfil Numérico	Microorganismo identificado
Lomo	6104116	<i>Salmonella sp</i>
Regular	3304177	<i>Enterobacter cloacae</i>
Selectos Centro		
Súper especial	7044152	<i>Escherichia coli</i>
Especial	2202004	<i>Pseudomona aureoginosa</i>
Regular	3146572	<i>Escherichia coli</i>
Selectos Metrosur		
Especial	4104116	<i>Salmonella pullorum</i>

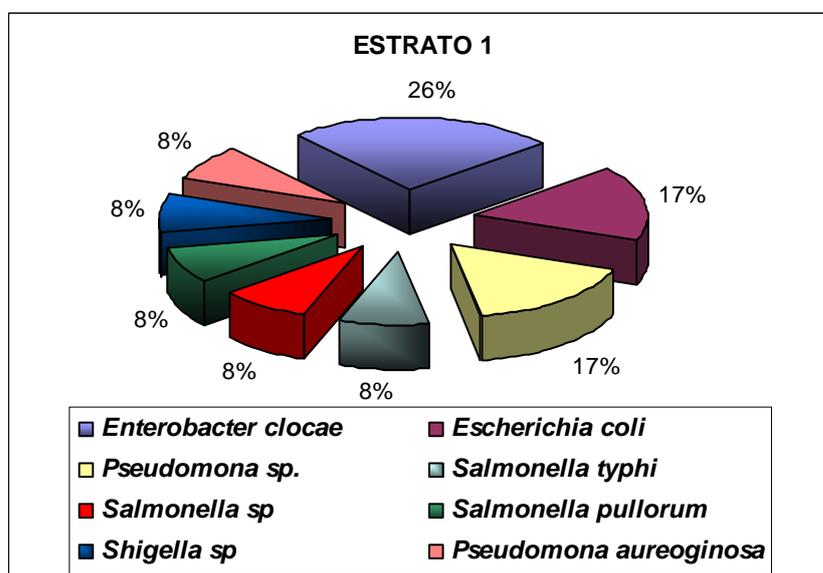


FIGURA N° 1 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímica y pruebas bioquímicas API 20E en muestras de estrato 1.

Existe una gran variedad de microorganismos en las muestras de carne molida de res cruda distribuida en los supermercados de Súper Selectos que representa el estrato 1. De entre las cuales se encuentra en mayor proporción ***Enterobacter cloacae***, además se encontró ***Escherichia coli*** no serotipada, al igual que ***Pseudomona sp.*** y en menor proporción ***Salmonella sp.***, ***Shigella sp.***, ***Salmonella tiphy***, ***Salmonella pullorum*** y ***Pseudomona aureoginosa***; pero no se encontró ***Escherichia coli O157:H7***. La causa por la cual se encuentran presentes estos diferentes tipos de bacterias, se debe a la alta contaminación que se somete la carne desde el mantenimiento de la res en los campos, mataderos, procesamiento y manipulación de la carne hasta llegar al consumidor.

CUADRO N° 19 Identificación a través de pruebas bioquímicas en dos muestras de estrato 2.

Despensa	TSI	Citrato	Movilidad	Indol	Voges-Proskauer	Rojo de metilo	Microorganismo identificado
Don Juan Darío Especial	k/k g(-)	+	-	-	-	-	<i>Pseudomona aureoginosa</i>
Regular	A/A g(+)	+	-	-	+	-	<i>Enterobacter clocae</i>

CUADRO N° 20 Identificación a través de pruebas bioquímicas API 20E en dos muestras de estrato 2.

Despensa de Don Juan Darío	Perfil Numérico	Microorganismo identificado
Lomo	0020040	<i>Brucella sp</i>
Súper especial	0024040	<i>Shigella sp</i>

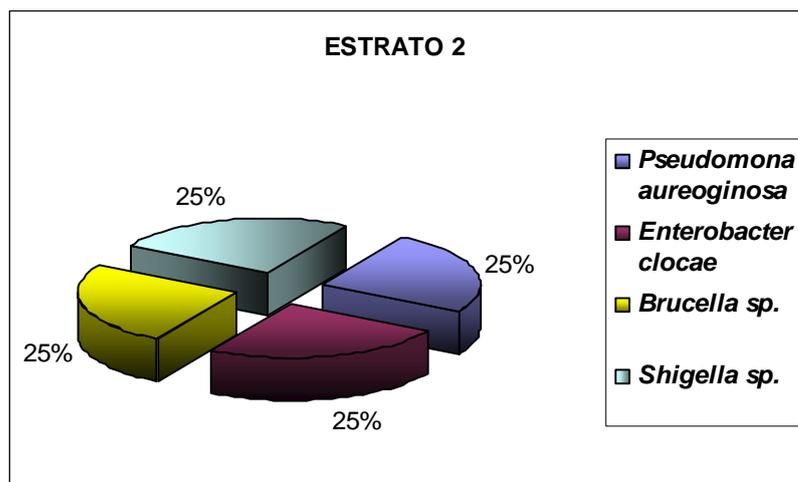


FIGURA N° 2 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímica y pruebas bioquímicas API 20E en dos muestras de estrato 2.

En el supermercado de la Despensa de don Juan se encontró en iguales proporciones *Pseudomona aureoginosa*, *Enterobacter clocae*, *Brucella sp* y *Shigella sp*, pero no existe *Escherichia coli O157:H7*. Las características nutritivas propias de la carne, así como su pH aproximado a 7.0 y una temperatura de refrigeración inadecuada superior a 5 °C son condiciones óptimas para el desarrollo de estos tipos de microorganismos que al encontrarse en ciertas cantidades pueden llegar a causar enfermedades en las personas que consuman la carne poco cocida.

CUADRO N° 21 Identificación a través de pruebas bioquímicas API 20E en dos muestras de estrato 3.

Europa Centro	Perfil Numérico	Microorganismo identificado
Súper especial	3305173	<i>Enterobacter clocae</i>
Especial	3704542	<i>Salmonella arizonae</i>

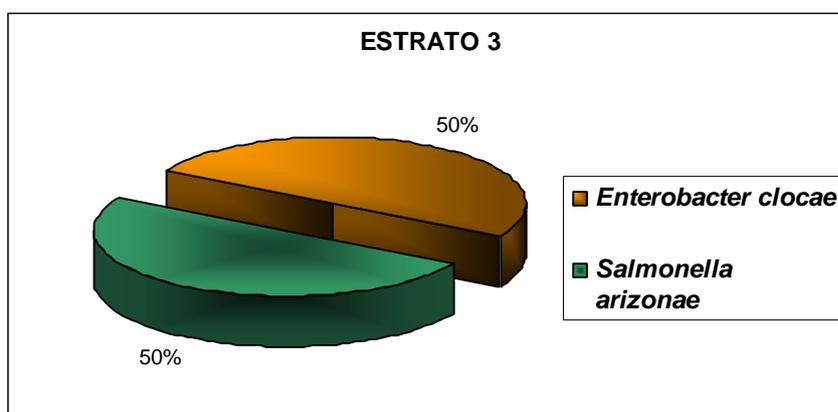


FIGURA N° 3 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímica API 20E en dos muestras de estrato 3.

El análisis de identificación de las muestras del supermercado Europa que representa el estrato 3 incluía únicamente pruebas bioquímicas API 20E, las que nos mostró la presencia de *Enterobacter cloacae* y *Salmonella arizonae*. Estas Enterobacteriáceas son causante de enfermedades entéricas en muy raras ocasiones, por lo que no se descarta que puedan causar complicaciones diarreicas al consumidor.

CUADRO N° 22 Identificación a través de pruebas bioquímicas en dos muestras de estrato 4.

Despensa	TSI	Citrato	Movilidad	Indol	Voges-Proskauer	Rojo de metilo	Microorganismo identificado
Familiar Centro	k/k	+	-	-	-	-	<i>Pseudomona sp</i>
Súper especial	g(-)	+	-	-	-	-	<i>Pseudomona aureoginosa</i>
Especial	k/k	+	-	-	-	-	<i>Pseudomona aureoginosa</i>
	g(-)						

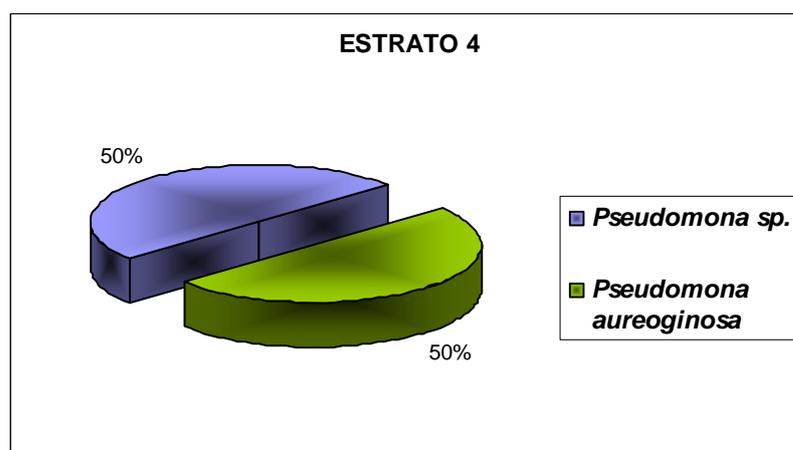


Figura N° 4 Resultado de identificación a través de pruebas bioquímica en muestras de estrato 4.

El análisis de identificación de las muestras del supermercado la Despensa Familiar que representa el estrato 4, incluyó únicamente pruebas bioquímicas, en las cuales se identificó la presencia de *Pseudomona sp* y *Pseudomona aureoginosa*, las cuales presentan un alto riesgo de patogenicidad, por lo que el consumo de esta carne debe hacerse adecuadamente cocida.

CUADRO No 23 Proporción de microorganismos presentes en las 20 muestras de carne molida de res.

Microorganismo	No. Mx	%
<i>Enterobacter clocae</i>	5	25
<i>Pseudomona aureoginosa</i>	3	15
<i>Pseudomona sp.</i>	3	15
<i>Escherichia coli</i>	2	10
<i>Shigella sp.</i>	2	10
<i>Salmonella typhi</i>	1	5
<i>Salmonella pullorum</i>	1	5
<i>Salmonella sp.</i>	1	5
<i>Brucella sp.</i>	1	5
<i>Salmonella arizonae</i>	1	5
Total	20	100

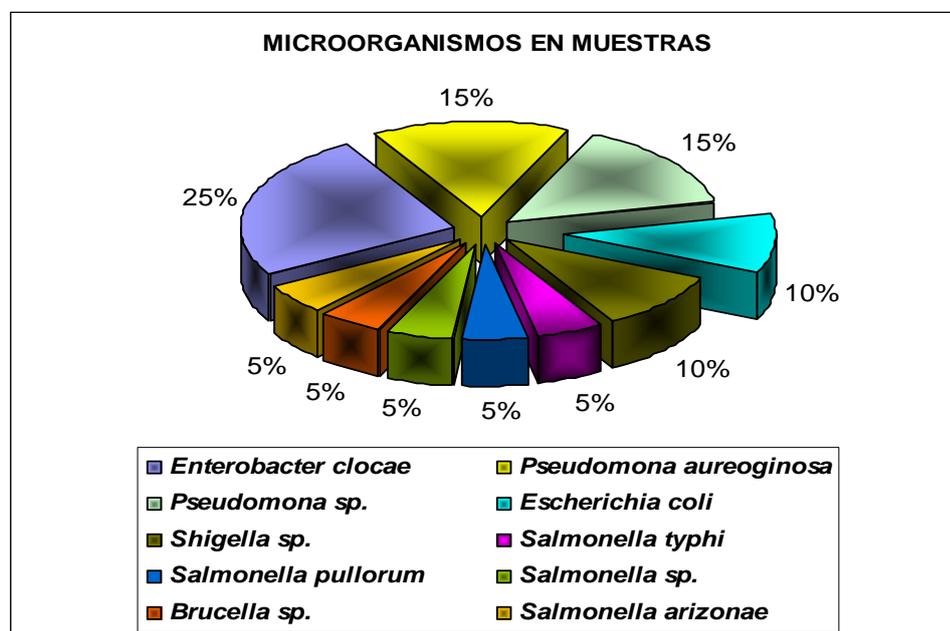


FIGURA N° 5 Proporción de microorganismos presentes en las 20 muestras de carne de res.

En las muestras de carne se encontró en mayor proporción *Enterobacter cloacae* en un 25% del total de las muestras, seguido de *Pseudomona sp* y *Pseudomona aureoginosa* con un 15% respectivamente y en menor proporción el resto de microorganismos. La contaminación por estas enterobacteriáceas es asociada a la flora intestinal de los mamíferos, por lo que no se descarta la contaminación fecal de la carne por medio del contacto directo con las vísceras de la vaca, transmisión madre-cría al momento del nacimiento y lactancia, contaminación en el procesamiento y manipulación de carne, transporte y almacenamiento de la carne en los supermercados son algunas de las causas por las cuales pueden encontrarse estas bacterias en la carne y que causan enfermedades graves en el hombre.

- 5.4 No se realizaron comprobaciones mediante técnicas serológicas, debido a ausencia de ***Escherichia coli 0157:H7***.
- 5.5 Se dio a conocer a las autoridades del CONACYT, los resultados obtenidos de la determinación de ***Escherichia coli 0157:H7*** en carne molida de res cruda, a través de un documento de información sobre la investigación, por lo cual se extendió una carta de recibido con sello y firma de CONACYT (ver anexo 10)

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. En el aislamiento realizado en 20 muestras de carne molida de res cruda con medios selectivos y diferenciales no se observaron características propias de *Escherichia coli* **0157:H7** al compararse con los resultados obtenidos con la cepa ATCC.
2. De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y API 20E, los microorganismos aislados presentaron características diferentes a *Escherichia coli* **0157:H7** por lo que el análisis realizado identifica otro tipo de bacterias entéricas y la ausencia de la bacteria en estudio. Predominando *Enterobacter cloacae* en un 25% de las muestras el cual rara vez produce enfermedades.
3. En el análisis realizado a las muestras de carne molida de res cruda, comercializada en supermercados del área metropolitana de San Salvador, período 2007, no se encontró la presencia de *Escherichia coli* **0157:H7** pero si la de otros microorganismos patógenos incluyendo *Escherichia coli* no serotipada.
4. La ausencia de características bioquímicas propias *Escherichia coli* **0157:H7** en las cepas aisladas, no permitió realizar una confirmación serológica de la cepas de *Escherichia coli* identificadas, ya que

***Escherichia coli* 0157:H7** no fermenta el sorbitol y carece de la enzima betaglucoronidasa que le confiere la fluorescencia en medios fluorogénicos como agar Fluorocult E. coli O157:H7.

5. La diversidad de patógenos encontrados refleja la inadecuada condición microbiológica en que se encuentra la carne molida de res cruda comercializada en supermercados, la cual no es apta para el consumo humano por el simple hecho de que al consumirse mal cocida puede repercutir en enfermedades a los consumidores.
6. La contaminación de microorganismos en la carne se debe a: el contacto directo de la madre a la cría a través de la sangre en el parto, por el proceso de lactancia y alimentación de la cría; en el sacrificio la carne entra en contacto con las vísceras intestinales y desechos fecales, un inadecuado lavado y procesamiento de la carne así como también la manipulación humana son algunos factores que influyen en el estado de la carne.
7. Las instituciones gubernamentales encargadas de velar por la salud e inocuidad de los alimentos: Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, respectivamente, no consideran la determinación de este patógeno en los análisis clínicos y normativas de alimentos realizadas, debido al alto costo que esto implica.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones para determinar la presencia de ***Escherichia coli* 0157:H7** en las diferentes etapas del procesado de la carne desde el rastro, lavado, molienda y almacenamiento.
2. Identificar la presencia de ***Escherichia coli* 0157:H7** en otros tipos de alimentos como: frutas, vegetales, lácteos, agua y otros tipos de carne. A si como también clínicamente en muestras de heces de personas con padecimientos diarreicos de origen bacteriano.
3. A las autoridades del CONACYT, incluir la determinación de ***Escherichia coli* 0157:H7** en carne molida de res cruda en la norma de carnes y productos carnicos.
4. A las autoridades del Ministerio de Salud, tipificar la ***Escherichia coli*** aislada de muestras de heces procedentes de un cuadro clínico sospechoso de ser ***Escherichia coli* 0157:H7** ya que una infección diagnosticada a tiempo puede prevenir complicaciones en el paciente que puedan perjudicar su vida y a la vez prevenir posibles brotes provocados por contagio.

5. A las autoridades sanitarias que verifiquen y monitoreen periódicamente el estado y calidad de las carnes en los supermercados y que se les exija a estos últimos el cumplimiento de las condiciones adecuadas de almacenamiento y manipulación de las carnes desde que llega al establecimiento hasta las manos del consumidor.
6. Crear una normativa que regule los procedimientos de sacrificio de la res y procesamiento de la carne con el fin de evitar una contaminación en cada uno de los pasos de obtención del producto final.
7. Realizar investigaciones en personas adultas y niños con enfermedades diarreicas y disfunciones renales en unidades de salud y hospitales entre los meses con mayor número de casos, como en época lluviosa y días festivos, con la finalidad de determinar la presencia de ***Escherichia coli 0157:H7***.
8. A las instituciones relacionadas en salud e investigación públicas o privadas, normalizar y validar los procedimientos para la identificación de ***Escherichia coli 0157:H7*** en alimentos, aguas y muestras clínicas, para tener la certeza que los resultados son valederos y confiables.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Ayala R.R.M. y otros. 1995, Investigación para la elaboración de un compendio de métodos de análisis bacteriológicos para productos lácteos y cárnicos, Tesis, Lic. F.Q.F. San Salvador Universidad de El Salvador C.A
p. 18-21

- 2) Bonilla G. 1995. Estadística II Métodos Prácticos de Inferencia Estadística.
2 ed. San Salvador ES. Ed. UCA editores. p. 11-17,86-93

- 3) Brooks G.F y otros. 2005. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick, Adelberg. 18 ed. Distrito Federal México. Ed. El manual moderno, S.A. de C.V. p. 246-248

- 4) Canales F.H, y otros, 1986, Metodología de la investigación. manual para el desarrollo de personal de salud. Distrito Federal México. Ed. Limusa, S.A de C.V. P 147-155.

- 5) Cicuta, M.E y otros, 2006, Detección de *Escherichia coli* productor de toxina shiga (STEC) en reses bovinas y carne molida de corrientes. (en línea). Argentina. Revista veterinaria 17:1,20-25. Consultado 26 de febrero 2007. Disponible en: <http://www.vet.unne.edu.ar/revista/17-1/RevVetvol17-06-deteccin.pdf>.

- 6) Claros M. y otros. C2007. Diccionario de Medicina Océano Mosby. 4 ed. Barcelona Esp. Océano grupo editorial, S.A. p. 280, 1253.
- 7) FDA (Food and Drug Administration). 1992. Bacteriological Analytical Manual (BAM). 7 ed. AOAC. Internacional Arlington USA. p. 27-31.
- 8) García L. y otros. 2000. Nefrología Pediátrica. 2 ed. España. Ed Aula Médica. p. 269-276.
- 9) Gispert C. y otros editores. C2007. Manual Merck de información médica general. Barcelona Esp. Océano grupo editorial, S.A p. 539, 787,788.
- 10) Huapaya C. B, y otros, 2001, Primer aislamiento de ***Escherichia coli*** **O157:H7** Enterohemorrágica en el Perú. (en línea). Revista médica 18: 1-2. Consultado el 13 de febrero de 2007. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/Medicina_Experimental.
- 11) ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). 1980. Ecología Microbiana de los Alimentos 2. Productos alimenticios. Zaragoza Esp. Ed. Acribia S.A. Vol. 2. p. 333-340, 343, 366-371.

- 12) Koneman E.W y otros. 1992, Diagnòstico microbiològico texto y atlas color. 3 Ed. Buenos Aires Arg. Ed. Médica panamericana. p. 212-221, 258-261.
- 13) Lynch M.S y otros. 1985. Métodos de Laboratorio. 2 ed. D.F Méx. Ed. Interamericana S.A de C.V. p. 916-918, 954-955.
- 14) Merck KGaA. Manual medios de cultivo Merck. 1982. RF de Alemania. E.Merck frankfurter strasse 250 p. 88, 123.
- 15) BD Difco. Manual Difco. 1984. Medios de Cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. 10 ed. Difco laboratorios. Michigan USA. p. 309-319.
- 16) Margall N. y otros. 1997. ***Escherichia coli*** Enterohemorràgica (en linea). Barcelona Revista Española Salud Pública. 71(5):437-443. Consultado el 10 de febrero de 2007. Disponible en: <http://www.scielosp.org/pdf/resp/v71n5/colaboracion.pdf>.
- 17) Marzocca M.A y otros, 2006, Detección de ***Echerichia coli O157:H7*** en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. (en linea). Revista. Argentina de microbiología, 38:38-40. Consultado el 16 de febrero del 2007. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php>

- 18) Mattar S. y otros. 2001. *E. coli* O157:H7 Enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea y zoonosis en Colombia subestimado. Parte I (en línea). Revista MVZ-Cordoba. 6(1):15-23. Consultado el 10 de febrero de 2007. Disponible en: <http://www.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/MVZ-61/15.pdf>.
- 19) Mattar S. y otros. 2001. *E. coli* O157:H7 Enterohemorrágico: un agente etiológico de diarrea en Colombia subestimado. Parte II (en línea). Revista MVZ-Cordoba. 6(2): 81-86. Consultado el 10 de febrero de 2007. Disponible en: <http://www.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/MVZ-61/15.pdf>
- 20) Mossel D.A.A y otros. 2002. Microbiología de los alimentos. 2 ed. Zaragoza, Esp. Editorial Acribia S.A de C.V. p. 8-10, 85-86, 137-164, 433, 473-483.
- 21) OPS (Organización Panamericana de la Salud) y sus Estados miembros. 1996, Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina y características socioeconómicas de sus vendedores y consumidores. p.16-20, 38-41
- 22) Oquendo R.M.M. 2006, Incidencia de *Escherichia coli* serotipo **O157:H7** en carne de bovino proveniente de mataderos de Puerto Rico. Tesis MSc. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. p.1-40.

Consultado el 20 de febrero del 2007. Disponible en:
<http://grad.uprm.edu/tesis/oquendorodriguez.pdf>.

23)Viñas R. y otros. 2000. ***Escherichia coli*** verotoxigènica (VTEC): su transmisión por alimentos.(en línea). Revista Ciencia Hoy. 10(55):1- 42.
Consultado el 21 de febrero del 2007. Disponible en:
<http://www.medvet.com.ar/SUH-Informe.pdf>

ANEXOS

Anexo N° 1

	2000	2001	2002	2003	2004	2005-2007	
Ahuachapán	9	5	2	2	2	YA NO SE CAPTURA ESTE DATO	
Centro	110	12	126	111	35		
Chalatenango	4	13	16	10	4		
Chalchuapa	0	0	0	10	39		
Ciudad Barrios	0	0	0	0	1		
Cojutepeque	64	6	18	8	13		
Ilobasco	12	0	2	0	1		
Ilopango	8	22	24	40	13		
Jiquilisco	12	0	9	11	3		
La Libertad	400	178	133	27	620		
La Paz	46	20	9	4	12		
La Unión	7	15	5	5	13		
Metapán	0	0	0	0	0		
Morazán	125	123	7	7	27		
Norte	11	8	9	6	3		
Nueva Concepción	1	34	0	1	8		
Nueva Guadalupe	15	1	2	4	1		
San Miguel	13	3	2	11	8		
San Vicente	11	10	16	8	7		
Santa Ana	1 090	672	2	6	5		
Santa Rosa de Lima	0	1	0	0	0		
Santiago de María	1	0	0	0	1		
Sensuntepeque	1	11	2	3	2		
Sonsonate	33	4	105	2	3		
Soyapango	17	0	7	5	11		
Suchitoto	0	3	2	0	0		
Sur	20	16	44	0	5		
Usulután	106	7	10	5	3		
Total	2.116	1.164	552	286	840		0



Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
 Dirección de Control y Vigilancia Epidemiológica
 Unidad de Epidemiología
 Infección por Eschericia Coli
 Distribución por SIBASI - año 2000 - 2004





MINISTERIO DE SALUD PUBLICA Y ASISTENCIA SOCIAL
DIRECCION DE CONTROL Y VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA
UNIDAD DE EPIDEMIOLOGIA
INFECCION POR ESCHERIACHIA COLI, AÑOS 2000 - 2004



	<1 a		1-4		5-9		10-19		20-59		60 y más		TOTAL
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
2000	84	85	130	214	139	140	66	189	134	755	42	138	2116
2001	34	48	90	126	58	85	34	97	81	420	27	64	1164
2002	16	15	46	50	30	44	24	48	44	174	16	45	552
2003	10	12	39	34	8	23	12	15	19	96	6	12	286
2004	59	62	72	93	57	63	31	35	65	158	60	85	840

Fuente: Reporte Epidemiológico Semanal

Anexo N° 2

Cuadro No.24 Brotes de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico-urémico (SHU) más relevantes en los EEUU hasta por cepas de *E.coli* 0157:H7

(16)

Localización geográfica	Año	N° casos	N° pacientes hospitalizados	N° pacientes que desarrollaron SHU	Mortalidad	Ámbito	Fuente de infección
Oregón (EEUU)	1982	26	18	0	0	Comunidad	Hamburguesas
Michigan (EEUU)	1982	21	14	0	0	Comunidad	Hamburguesas
Nebraska (EEUU)	1984	34	13	1	4 (12%)	Residencia 3ª. Edad	Hamburguesas
Ontario (Canadá)	1985	73	-	12	19 (35%)	Residencia 3ª edad	Bocadillos de carne
Inglaterra	1985	24	11	-	1 (4,1%)	Comunidad	Manipulación de vegetales
Washington (EEUU)	1986	37	17	3	2 (5%)	Restaurante	Hamburguesas
Birmingham (RU)	1987	26	6	1	0	Comunidad	Bocadillos de carne
Minesota (EEUU)	1988	32	4	0	0	Instituto	Hamburguesas
Cabool, Missouri	1990	243	32	2	4 (1,6%)	Comunidad	Agua
Pórtland, Oregón (EEUU)	1990	21	7	3	0	Parque recreativo	Baño en lago ¹
Massachussets (EEUU)	1991	23	6	4	0	Comunidad	Sidra
Reino Unido	1991	16	13	5	-	Comunidad	Yogur
Maine (EEUU)	1992	4	-	1	1 (25%)	Comunidad	Vegetales mal lavados
Washington, Idaho, California y Nebraska (USA)	1993	700	195	55	4 (0,6%)	Restaurante	Hamburguesas
Virginia (EEU)	1994	20	3	1	0	Campamento de verano	Hamburguesas
Washington y California	1994	23	6	2	-	Comunidad	Salami

Anexo No 3

Listado de Supermercados del área metropolitana de San Salvador

1. Súper Selectos

1 Antel Centro	10 Feria Rosa	19 San Miguelito I
2 Arce	11 La Cima	20 Santa Emilia
3 Autopista Sur	12 Los Santos	21 San José
4 Bethoveen	13 Masferrer	22 San Miguelito 2
5 Caribe	14 Metro Sur	23 San Benito
6 Centro I	15 Metro Centro	24 San Luís
7 Centro Libertad	16 Miralvalle	25 Trigueros
8 Escalón	17 Morazán	26 Olímpica
9 España	18 San Jacinto	27 Miralvalle 2

2. Despensa de Don Juan

1 Centro Libertad	4 Cumbres Escalón	7 Darío
2 Escalón Norte	5 General Arce	8 La Cima
3 San Benito	6 San Jacinto	9 Terraza

3. Europa e Hiper Europa

1 Centro	4 Las Piletas
2 Bernal	5 Plaza Merliot
3 Hiper Europa	

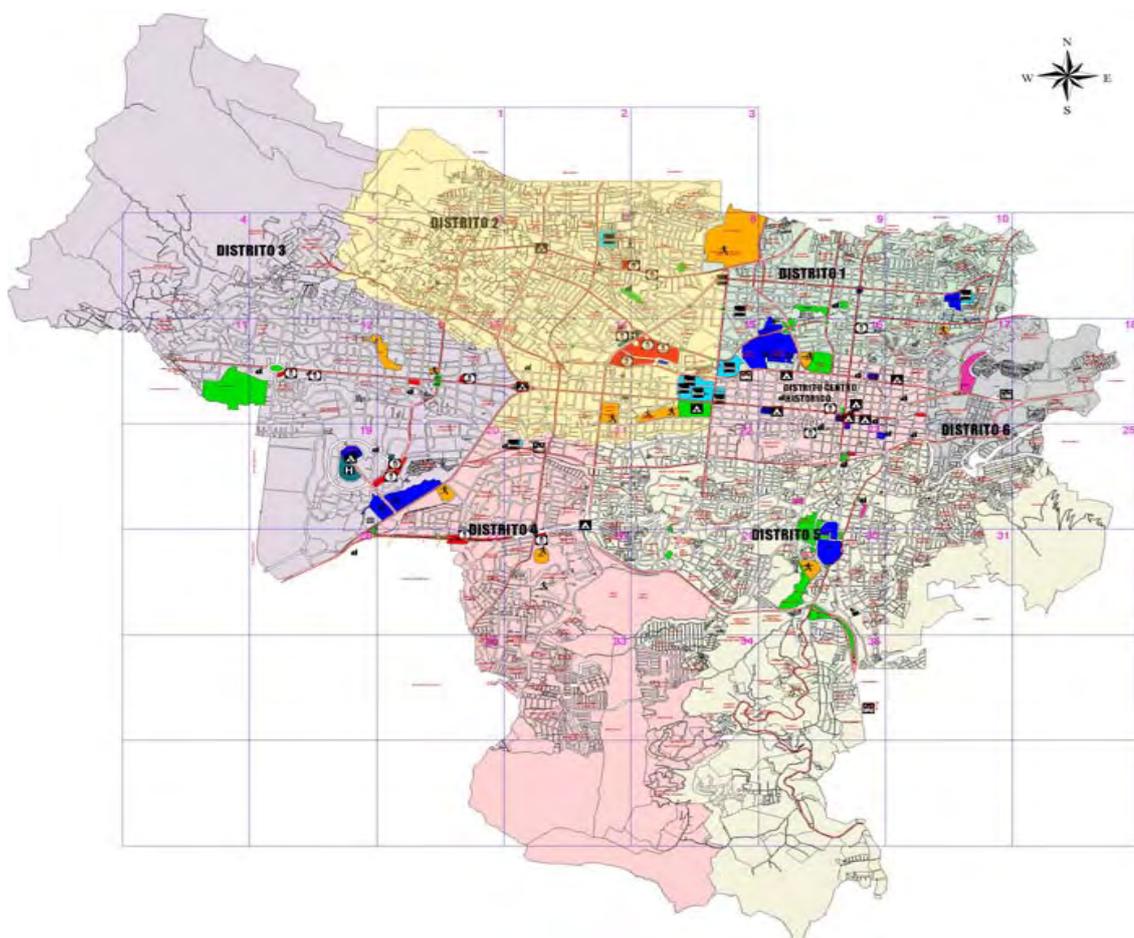
4. Despensa Familiar.

1. Centro

Total: 42 Establecimientos

Anexo N° 4

Mapa de la zona metropolitana de San Salvador



Anexo N° 5

Reactivos, Material y Equipo

- Antisuero O157
- Antisuero H7
- Agar TSA
- Agar MacConkey sorbitol
- Agar Cromocult coliforme
- Agar Flourocult E.coli O157:H7
- EMB (Eosina metileno azul agar)
- BHI (Cerebro corazón infusión)
- Caldo infusión de ternera (SIM)
- Pruebas bioquímicas (Indol, Rojo metilo, Voges-Proskauer, Citrato, Movilidad)
- Patrón N° 3 Macfarland de Sulfato de bario
- Solución de NaCl al 0.85 % estéril
- Agua estéril
- Agua peptonada.

Material

- Tubos
- Gradilla
- Pipetas estériles de 10mL
- Pipetas estériles de 1 MI

- Pipetas Pasteur
- Placas de petri estériles
- Asas estériles
- Termómetro
- Guantes
- Mascarilla
- Beakers
- Porta objetos
- Frascos de vidrio estériles
- Mecheros.

Equipo

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Balanza Analítica
- Refrigeradora
- Esterilizador de asas
- Baño de Maria
- Autoclave
- Estufa

Anexo N° 6

Procedimiento de aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 ⁽⁷⁾

ENRIQUECIMIENTO

-Pesar 10 g de carne molida de res cruda, transferirlo a un frasco que contenga 90 mL de agua peptonada estéril, agitar vigorosamente por dos minutos hasta homogenizar la muestra e incubar a 37 °C durante 24 horas.

AISLAMIENTO

-Después de 24 horas de enriquecimiento estriar el cultivo en placas de Agar MacConkey sorbitol.

-Incubar a 37 °C durante 18-24 horas.

-Transferir 1 a 2 colonias sospechosas en placas de TSA

-Incubar a 37 °C durante 24 horas.

- Transferir 1 a 2 colonias a agar EMB, Cromocult y Fluorocult E.coli O157:H7.

-Dejar en incubación a 37 °C durante 24 horas.

- Después de 24 horas tomar de agar Fluorocult E.coli O157:H7 1 a 2 colonias y transferirlas a caldo BHI

- Dejar en incubación a 37 °C durante 24 horas.

-Tomar 1 a 2 asadas y estriar en placas de TSA e incubar a 37 °C durante 24 horas

Anexo N° 7

Procedimiento de Pruebas bioquímicas ⁽¹²⁾

Producción de indol:

- Inocular colonias sospechosas de *Escherichia coli* **O157:H7** en caldo triptofano e incubar a 35°C de 18-24hr.
- Luego se incorporan 15 gotas de reactivo de Kovacs por la pared interna del tubo

Prueba rojo de metilo:

- Inocular el caldo MR/VP(rojo de metilo-Voges-proskauer) con el cultivo puro de *Escherichia coli* **O157:H7**
- Incubar el caldo a 35°C durante 48-72hr (no menos de 48hr.)
- Agregar 5 gotas de reactivo rojo de metilo directamente al caldo.

Voges-Proskauer:

- Inocular el caldo MR/VP (rojo de metilo-Voges-proskauer) con el cultivo puro del microorganismo y se incuba durante 24hr a 35°C.
- Colocar 1mL de este caldo en tubo de prueba limpio e incorporar 0,6mL de α -naftol 5% seguidos por 0,2mL de KOH al 40%.
- El tubo se agita suavemente y se deja en reposo durante 10-15min.

Prueba de citrato:

- Tomar una colonia aislada sospechosa de ser *Escherichia coli* **O157:H7** y se inocula en estría en la superficie del medio (pico de flauta).
- El tubo se incuba a 35⁰C durante 24-48hr.

Prueba de motilidad:

- Tomar una colonia aislada sospechosa de ser *Escherichia coli* **O157:H7** con un asa en punta.
- Introducir sobre el centro del tubo con medio de movilidad y formar una línea de inoculación, hasta una tercera parte del medio.
- Incubar de 24-48hr y observar si presenta enturbiamiento.

Anexo N° 8

Identificación bioquímica con sistema API 20E

- Picar una o dos colonias sospechosas de *Escherichia coli* 0157: H7, con el asa bacteriológica estéril y formar una suspensión en un tubo con 5 mL de Solución salina al 0.85% estéril.
- Reunir fondo y tapa de una cámara de incubación de la Galería API 20 E y repartir aproximadamente 5 mL de agua desmineralizada (preferentemente estéril) en los alvéolos de la cámara para crear la atmósfera húmeda.
- Rotular la colonia examinada en la lengüeta lateral de la cámara de incubación.
- Sacar la Galería API 20 E de su envase y colocarla en la cámara de incubación.
- Con una pipeta Pasteur extraer una fracción de la suspensión de las colonias sospechosas y llenar los tubos y las cúpulas de los ensayos:

CIT	VP	GE
-----	----	----
- Llenar únicamente los tubos (y no las cúpulas) de los otros ensayos.
- Crear una anaerobiosis en los ensayos ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, llenando las cúpulas con aceite mineral (aceite de parafina) estéril.
- Cerrara la cámara de incubación.
- Incubar a 36°C ± 2 °C durante 18 – 24 horas.
- Después de la incubación, la lectura de la galería debe hacerse remitiéndose a la Tabla de Lectura API web.

-Anotar los resultados de todas las reacciones espontáneas (REACCIÓN ESPONTÁNEA es aquella que no necesita adición de reactivos) en la HOJA DE RESULTADOS.

-Realizar los ensayos que necesitan la adición de reactivos de la siguiente manera:

-Prueba TDA: agregara una gota del reactivo TDA. Un color marrón-rojizo indica una reacción positiva que se anotará en la hoja de resultados.

-Prueba IND: agregar una gota del reactivo JAMES. Un color rosado que se difumina en toda la cúpula indica una reacción positiva, que se debe anotar en la hoja de resultados.

-Prueba VP: agregar una gota del reactivo VP1 y una gota del reactivo VP2. Esperar un mínimo de 10 minutos. Un color rosa o rojo indica una reacción positiva que se anotará en la hora de resultados. Una débil coloración rosa que aparece después de 10 minutos debe ser considerada negativa. (REALIZAR ESTA PRUEBA POR ÚLTIMO).

-Determinación del Perfil Numérico: en la hoja de resultados, los test están separados en grupos de tres y se indica para cada uno un valor de 1, 2 ó 4 (si la reacción es positiva). Si la reacción es NEGATIVA el valor es cero. Sumar los valores que corresponden a REACCIONES POSITIVAS en cada grupo de tres, para obtener un número de 7 cifras que corresponde al PERFIL NUMÉRICO de la bacteria identificada. A la prueba de oxidasa se le asigna el valor 4, cuando resulte positiva.

HOJA DE RESULTADO.

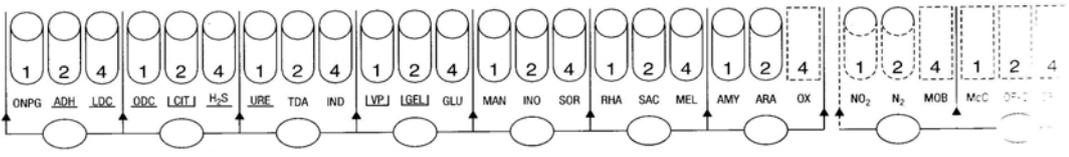
		REF : _____ / _____ / _____	
CE 07223 C		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :	
			
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :			Ident. / Ταυτοποίηση :

TABLA DE LECTURA.

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitro-fenil-βD-galactopiranosida	0,223	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-βD-galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo (1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina-dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
LDC	L-lisina	1,9	Lisina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
[CIT]	citrato trisódico	0,756	utilización del CITrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul (3)
H ₂ S	tiosulfato sódico	0,075	producción de H ₂ S	incoloro/grisáceo	depósito negro/fin liserado
URE	urea	0,76	UREasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	0,38	Triptofano DesAminasa	TDA / inmediato amarillo marrón-rojizo	
IND	L-triptófano	0,19	producción de INDole	JAMES / inmediato incoloro verde pálido/ amarillo rosa	
[VP]	pinuvato sódico	1,9	producción de acetoina (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloro rosa/rojo (5)	
[GEL]	Gelatina (origen bovino)	0,6	Gelatinasa (GELatina)	no difusión	difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1,9	fermentación/oxidación (GLUCosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1,9	fermentación/oxidación (MANitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
INO	inositol	1,9	fermentación/oxidación (INOsitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentación/oxidación (SORbitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
RHA	L-ramnosa	1,9	fermentación/oxidación (RHAmnosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SAC	D-sacarosa	1,9	fermentación/oxidación (SACarosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MEL	D-melibiosa	1,9	fermentación/oxidación (MELibiosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	0,57	fermentación/oxidación (AMYgdalina) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
ARA	L-arabinosa	1,9	fermentación/oxidación (ARAbinosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
OX	(ver ficha técnica del test de oxidasa)		citocromo-OXidasa	(ver ficha técnica del test de oxidasa)	

- (1) Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.
 (2) La aparición de un color naranja tras 36-48 H de incubación debe considerarse negativa.
 (3) Lectura en la cúpula (zona aerobia).
 (4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.
 (5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa.
- Las cantidades indicadas pueden ser ajustadas en función de los títulos de las materias primas.
 - Ciertas cúpulas contienen componentes de origen animal, notablemente peptonas.

Anexo N° 9

Procedimiento de técnicas serológicas. ⁽¹⁵⁾

- Colocar en placas estériles 15 mL de Agar infusión de ternera, dejar solidificar y mantener en refrigeración hasta posteriormente utilizarlas.
- Esterilizar un asa metálica y tomar 4 asadas, colocándola e la placa de Agar infusión de ternera, a través del método de estrías.
- Incubar las placas a 35 °C durante 16-24 horas

Prueba en tubos para valoración del Antígeno O

- Esterilizar un asa metálica
- Suspender el crecimiento del aislado de prueba en solución de NaCl al 0.85%
- Calentar la suspensión del organismo en baño de María (hirviendo) durante 30-60 min.
- Dejar enfriar la suspensión.
- Diluir con solución de NaCl al 0.85 % a una densidad aproximada al patrón N⁰ 3 Macfarland de Sulfato de bario.
- Agregar formalina a la concentración final de 0.5 % por volumen.
- En una gradilla, preparar una fila de 8 tubos de ensayo para la suspensión que se ha de analizar
- Colocar 0.9 mL de solución de NaCl al 0.85 % al primer tubo, y 0.5 mL a los tubos restantes.

Rehidratación de Antisuero E coli O157

- Agregar 3 mL de solución de NaCl al 0.85 % esteril al vial del antisuero; girar suavemente para disolver el contenido por completo
- Colocar 0.1 mL de Antisuero ya reconstituido al tubo 1 con una pipeta serologica de 1 mL mezclar bien. Transferir 0.5 mL del tubo 1 al tubo 2 y mezclar bien. De manera similar continuar transfiriendo 0.5 mL hasta el tubo 7 y descartar 0.5 mL del tubo 7 después de mezclar. El tubo 8 es un tubo de control y solo contiene solución NaCl 0.85 %.
- Agregar 0.5 mL de suspensión del organismo de prueba a cada uno de los ocho tubos.
- Agitar la gradilla para mezclar
- Incubar en baño de María a $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 18-24 horas
- Efectuar una lectura para determinar la aglutinación.

Prueba en tubo para la detección del Antígeno H

- Preparar un cultivo con motilidad activa y transferir al menos 2-3 pasadas del cultivo del microorganismo a prueba.
- Inocular un asa llena de cultivo de medio para motilidad en un tubo de caldo de infusión de ternera
- Incubar de 6-8 horas a 35°C .
- Inactivar el cultivo con formalina a 0.3% de volumen final de caldo de infusión de ternera.

Dilución del Antisuero H7

- Agregar 0.2 mL de antisuero H7 reconstituido a 49.8 mL de solución de NaCl al 0.85 %.
- Mezclar bien e incubar en baño de Maria a $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora.
- Efectuar una lectura para determinar la aglutinación

Anexo N° 10



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN SALUD
UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR



162 Años
Al servicio de la
Educación Superior
salvadoreña

Ciudad Universitaria
Final 25 Avenida Norte
San Salvador, El Salvador

Telefax No. (503) 225-8826 y 225-8434
Correo: CEN_SALUD_UES@hotmail.com
roedilow@navegante.com.sv

San Salvador, 26 de Septiembre de 2007.

Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
Licenciado.
Ricardo Harrison

De la manera más atenta, hacemos del conocimiento que el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología ha recibido los resultados de la investigación: **Determinación de Escherichia coli O157:H7 a partir de carne molida de res cruda comercializada en supermercados del área metropolitana de San Salvador, periodo 2007**; la cual fue realizada por: SOFIA MARGARITA MARTINEZ MAZARIEGO y LUIS ALONSO PLATERO REYES, egresados de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Esta investigación fue realizada en los Laboratorios de Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la universidad en mención.

Atentamente.



Lic. Ricardo Harrison Parker
Asistente de Normalización

27/ sept / 07

Anexo N° 11

Fotografías

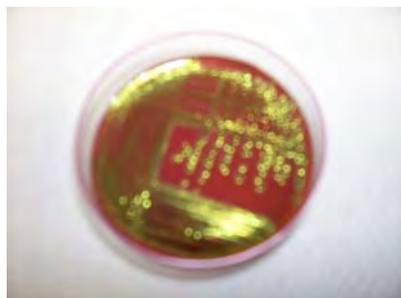
Aislamiento de Cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7



MacConkey sorbitol (-)



TSA



EMB (+)



Fluorocult E coli O157:H7 (+)



Cromocult Coliforme (+)

Identificación de cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 a través de pruebas bioquímica API 20E

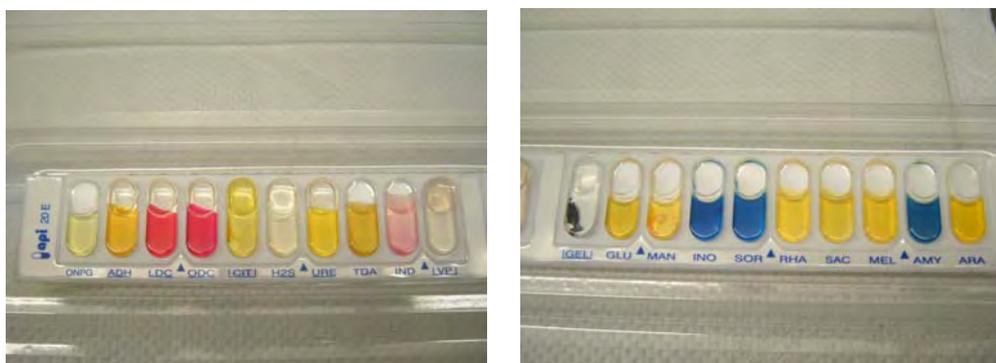


FIGURA N° 8 Identificación de cepa ATCC de *Escherichia coli* O157:H7 a través de pruebas bioquímica API 20E