

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA.

UNAN – LEON.



MAESTRIA EN MEDICINA PREVENTIVA VETERINARIA.

CON MENCIÓN EN SALUD PÚBLICA.

TESIS

**Identificación de *Escherichia Coli* productora de Shiga toxina en producto terminado de Bovinos sacrificados en el matadero NUEVO CARNIC S.A, en el periodo comprendido de Febrero a Abril del 2016.**

TUTOR:

**Mv. Manuel Tiffer.**

ELABORADO POR:

**MV. Juan Carlos Téllez Altamirano.**

*"A la Libertad por la Universidad"*

## INDICE

<b>Contenido</b>	<b>Pagina</b>
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Antecedentes.....	3
Justificación.....	5
Planteamiento del problema.....	6
Objetivos.....	7
Marco teórico.....	8
Introducción.....	8
Etiología.....	9
Epidemiología.....	10
Reservorios.....	10
Transmisión.....	11
Signos clínicos.....	11
Morbilidad y mortalidad.....	12
Diagnostico.....	12
Diagnostico por el método GDS.....	13
Tratamiento.....	14
Prevención.....	14
Materiales y métodos.....	16
Resultados.....	26
Discusión.....	29
Conclusiones.....	30
Recomendaciones.....	31
Bibliografía.....	32
Anexos.....	35

## **DEDICATORIA**

*Dedico este trabajo a dios sobre todas las cosas por haberme dado la vida, inteligencia, perseverancia y sabiduría para seguir escalando un peldaño más en mi carrera como médico veterinario.*

*A mis hijos por ser el motor que impulsa mi vida*

*A mi familia y amistades por que confiaron en mí, contribuyendo así de manera directa e indirectamente mis logros*

**MV. Juan Carlos Téllez Altamirano**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios y mi familia por compartir todos los momentos de mi existencia.

Al instituto de Protección y Sanidad agropecuaria por la restitución de derecho a la continua capacitación de sus profesionales

Al Dr. Manuel Velásquez Tiffer por todo su apoyo, dedicación y disposición que brindo en la realización de este trabajo

A la Dra. Ligia Hernández por sus enseñanzas en la culminación de este trabajo

**Mv. Juan Carlos Téllez Altamirano**

## RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el matadero Nuevo Carnic del departamento de Managua, Nicaragua, es un estudio de corte transversal, con el objetivo de Identificar la bacteria *Escherichia Coli* productora de Shiga toxina en producto terminado de Bovinos Faenados en el matadero NUEVO CARNIC y evaluar las pérdidas económicas que ocasionan los decomisos de productos cárnicos contaminados por estos serotipos de bacterias. El problema a la salud pública que ha causado este serotipo de bacteria a nivel mundial es grande, para este fin durante el trabajo de investigación se verifico los sistemas de inocuidad y calidad que contaba el establecimiento mediante un muestreo que duro tres meses, de 7,024,500 libras de carne bovina CH Y BM que se exportaron al exterior ,se enviaron 599 muestras a los laboratorios de la planta y a los del instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria, los resultados revelan que no hay casos positivos a la *Escherichia Coli* O157 Y otras STEC, manifiesta la buena gestión de inocuidad y calidad en todos los productos que se procesan en la planta.

## INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y animales de sangre caliente , descubierta por Theodor Escherich en 1885 (**Shulman ,2007**), la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar graves enfermedades de transmisión alimentaria generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda, los síntomas de la enfermedad incluyen cólicos y diarrea, que puede ser sanguinolenta, síndrome urémico hemolítico, también pueden aparecer fiebre y vómitos, la mayoría de los pacientes se recuperan en el término de 10 días, aunque en algunos casos la enfermedad puede causar la muerte (**OMS, 2011**).

Las *Escherichia coli* Shiga toxigénica productoras de toxinas (STEC) son bacterias Gram-negativas, en forma de barra, caracterizadas por la producción de toxinas Shiga (Stx). Dependiendo de la referencia citada, hay 200 a 400 serotipos STEC, muchos de los cuales no han sido implicadas en enfermedades humanas, Sin embargo, un subconjunto de *Escherichia coli* entero hemorrágica (EHEC), O157: H7 son actualmente las cepas más predominantes y representan aproximadamente el 75% de las infecciones de E. coli Entero hemorrágicas (EHEC) en todo el mundo, otros serotipos O157 EHEC están surgiendo como una causa de las enfermedades transmitidas por los alimentos. Las cepas de E. coli O157 H7, inicialmente eran susceptibles a un rango amplio de antibióticos y recientemente ha incrementado resistencia a estreptomicina, sulfisoxazole y tetraciclinas (**Sánchez, 2012**).

En los Estados Unidos se han reportado un grupo de E. coli entero hemorrágicas las cuales se refieren a ellas como las "Big 6" (O111, O26, O121, O103, O145 y O45), por lo tanto, son foco de preocupación (**FDA, 2012**).

## ANTECEDENTES

La *E. Coli entero hemorrágica* O157: H7 se identificó por primera vez en EE.UU. En 1982, un brote en el que las hamburguesas de un restaurante de comida rápida fueron el vehículo. **(FDA, 2012).**

Estudios en mercados locales de Argentina demostraron nivel de contaminación por STEC (*Escherichia coli* productora de Shiga toxina) O157, confirmado por aislamiento, fue del 4,4% (11/252), en la carne molida, así como en los productos cárnicos elaborados, embutidos, carne procesada, y de los productos lácteos en diferentes lugares de la Argentina **(Biomed, 2014).**

Estudios Realizados en el departamento de León, Nicaragua revelaron alta correlación de casos diarrea en La niñez nicaragüense con los varios serotipos de *Escherichia coli* y algunos casos aislados con EHEC **(Reyes, 2010).**

Julio, 1997. Colorado - 15 personas se enfermaron con síntomas característicos de infección gastrointestinal. La mayoría de los pacientes indicaron haber consumido hamburguesas Hudson Foods, El Departamento de Salud Pública de Colorado reportó que análisis genéticos realizadas a las hamburguesas Hudson Foods resultaron positivas para *Escherichia. coli* O157:H7. Hudson Foods retiró voluntariamente 3 lotes adicionales de hamburguesas. En cooperación con oficiales del USDA. **(Sánchez, 2012)**

Cada año 48 millones de personas se enferman y 3.000 mueren de enfermedades transmitidas por los alimentos, La reducción de enfermedades transmitidas por alimentos en sólo un 10% evitaría que 5 millones de estadounidenses se enfermen cada año y La prevención de un solo caso mortal de *Escherichia. coli* O157 ahorraría un estimado de \$ 7 millones. **(CDC, 2010).** En latino américa *Escherichia coli* O157 H7. Es un problema endémico, siendo Argentina, Uruguay y Chile los países más afectados. En Uruguay, la tasa de incidencia es de 4 a 5 en 100,000 niños menores de 5 años. Argentina es el país con las tasas más altas de SHU en el mundo, se describen aproximadamente 400 casos nuevos cada año, constituyendo

*la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica (Rivas et al,2006)*

En el mes de abril del 2009 en 9 estados de estados unidos se reportaron un total de 23 personas en el cual se les detecto la cepa de Escherichia Coli O157 H7, la mayoría informo que consumió carne molida de la compañía JBS, el 70 % de los pacientes fueron internados en hospitales del país y el 2 % de estos padecieron de síndrome urémico hemolítico durante el proceso de investigación se retiraron de los mercados grandes cantidades de los productos elaborados en JBS(CDC,2010)

## JUSTIFICACIÓN

La bacteria *Escherichia coli* O157:H7, afecta principalmente a niños y ancianos, ya que son las edades más susceptibles por padecer de enfermedades, presentando intoxicación de origen alimentario y en casos graves el síndrome urémico hemolítico y muerte, siendo estas bacterias de gran importancia para la salud pública. Existe poca información de los productos cárnicos y de los exámenes que se les realizan en los diferentes establecimientos de Nicaragua siendo el Nuevo Carnic, el principal exportador de carne bovina de Nicaragua y Centro América. Por requerimiento del FSIS USDA equivalente al servicio de inspección carnes de Nicaragua, solicita que los productos cárnicos bovinos se les realicen una serie de análisis especiales a la carne tanto de STEC como de residuos. Por otra parte, al ser identificada la *Escherichia Coli* O 157 H7 Y otras *Escherichia coli* productora de Shiga toxina, daremos la pauta para prevenir enfermedades de causa inespecífica, que pueden estar asociadas al de consumo de carne infectadas con esta bacteria, tal es caso de las personas con insuficiencia renal y síndromes diarreicos mal diagnosticados y verificar si los programas de inspección se están ejecutando correctamente.

El conjunto de *E. coli* patógenas, que puede causar diarrea o colitis hemorrágica en los humanos. En ocasiones, la colitis hemorrágica deriva en síndrome urémico hemolítico (SUH), una causa importante de insuficiencia renal aguda en niños y morbilidad y mortalidad en adultos. En los ancianos, la tasa de letalidad por el SUH puede elevarse al 50%. La *E. coli* O157:H7 (*Escherichia coli* entero Hemorrágica O157:H7) ha sido reconocida como la causa de este síndrome desde la década de 1980. El estudio pretende proporcionar información importante a cerca de los productos cárnicos que se exportan, como los que se consumirán a lo interno, obteniendo resultados que nos podrán ayudar a diseñar planes para mejorar la seguridad alimentaria.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con la implementación de los programas prerrequisitos (buenas practicas pecuarias, de manufactura), el sistema de Análisis de Peligro y Puntos Críticos de Control y el sistema de aseguramiento de la calidad.

¿Existe *Escherichia Coli* O157: H7 y *Escherichia Coli* productora de Shiga Toxina (STEC)? ¿En la carne que se exporta?

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

•

Identificar la bacteria *Escherichia Coli* productora de Shiga toxina en producto terminado de Bovinos Faenados en el matadero NUEVO CARNIC S.A, en el periodo comprendido de Febrero a Abril del 2016.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Valorar la utilización de los sistemas de gestión de inocuidad en los productos que se elaboran en el matadero Nuevo Carnic por medio de los indicadores biológicos
- Determinar las pérdidas económicas, que ocasiona estos productos contaminados, con *Escherichia. Coli* O157H7.

## MARCO TEÓRICO

### INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es parte común de la microflora anaeróbica facultativa normal del tracto intestinal de humanos y animales de sangre caliente, la mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y algunas son patogénicas y causan enfermedad **(OMS, 2011)**

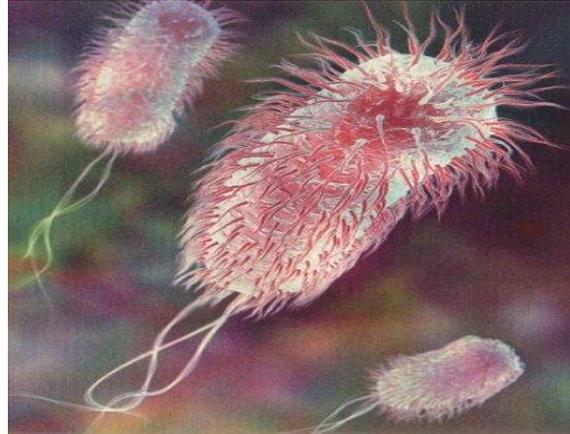
La *Escherichia coli*, también conocida como *E. coli*, es una bacteria que se encuentra comúnmente en el sistema digestivo de los seres humanos y animales de sangre caliente. Debido a su alta presencia en el intestino, la *E. coli* se utiliza Como el indicador principal para detectar y medir la contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad del agua y de los alimentos. Consideradas comensales inofensivos, las cepas de *E. coli* constituyen alrededor del 1% de la población microbiana normal del intestino. Si bien la mayoría de las cepas dentro del intestino son agentes patógenos gastrointestinales beneficiosos para el ser humano, otros son perjudiciales. **(Sánchez 2012)**

Las cepas que causan infecciones entéricas se denominan *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD) y se clasifican en seis categorías: enteropatógena (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EaggEC), de adherencia difusa (DAEC) y *Escherichia coli* productor de shigatoxinas (STEC) **(Vidal, 2005)**.

Cepas de *Escherichia Coli* aisladas inicialmente eran susceptibles a un rango amplio de antibióticos Cepas aisladas recientemente han incrementado resistencia a estreptomycin, sulfisoxazole y tetraciclina **(Sánchez, 2012)**

## ETIOLOGÍA DE INTOXICACIONES POR *ESCHERICHIA COLI*

Características Morfológicas y Tintoriales De La Bacteria <i>E. Coli</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Bacilo Gram negativo.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• No forma esporas</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Móviles (flagelos peritricos).</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Miden 0.5 <math>\mu</math> de ancho por 3 <math>\mu</math> de largo.</li></ul> <p>Catalasa positivos.</p>



Khttp://1.bp.blogspot.com/\_MIZikqjwI/S8to0gDulEI/AAAAAAAAAJ8/TaJUmBv1W3w/s320/ecoli.jpg

Escherichia coli es un bastón Gramnegativo (bacilo) de la familia Enterobacteriaceae. La mayoría de las *E. coli* son comensales normales que se encuentran en el tracto digestivo. Las cepas patógenas de este organismo se distinguen de la flora normal por poseer factores de virulencia, como exotoxinas. Los factores de virulencia específicos pueden utilizarse, junto al tipo de enfermedad, para separar dichos organismos en patotipos. La *E. coli* verocitotoxigénica (o verotoxigénica) (ECVT) produce una toxina, Existen 2 familias principales de verocitotoxinas, Vt1 y Vt2. Una cepa de ECVT puede producir una o ambas toxinas. Dado que la verocitotoxina es homóloga a las toxinas shiga de *Shigella dysenteriae*, a las ECVT también se las denomina *E. coli* productora de toxina shiga. **(CFSPH, 2009)**

Una minoría de los serotipos de *E. coli* son capaces de causar enfermedad en seres humanos por diferentes mecanismos. El patógeno de interés primordial ha sido *E. coli* O157: H7, que es una productora de toxina Shiga *E. coli* (STEC). Sin embargo, otros serogrupos de *E. coli*, conocido como no O157: H7 STECs, también puede causar enfermedades humanas.

El más significativo de estos serogrupos son E. coli O26, O103, O111, O121, O45, O145 y, a veces denominados colectivamente como "los seis grandes" al igual que E. coli O157: H7, los seis grandes STECs patógenas poseen otros determinantes virulentos, además de la toxina Shiga. El subconjunto de STECs que contienen tanto la toxina y estos determinantes virulentos adicionales se conoce como E. coli entero hemorrágica **(Johnson, 2015)**.

*La Escherichia coli* O157:H7 es una bacteria patógena, Gram negativa en forma de varilla, móviles, pertenece a la familia Enterobacteriaceae y es responsable de muchos casos de colitis hemorrágica en seres humanos. **(FDA,2012)**. Produce toxinas tipo Shiga, incapaz de crecer bien a temperaturas  $\geq 44.5^{\circ}\text{C}$ , Incapaz de fermentar sorbitol, Posee un gen de adhesión y eliminación (eae), muchas cepas son tolerantes a condiciones ácidas, PH mínimo: 4.0 a 4.5, Sobrevive en alimentos supuestamente inocuos: Salchichas fermentadas (pH 4.5), Mayonesa (pH 3.6–3.9) Cidra de manzana (pH 3.6-4.0) **(Sánchez, 2012)**

## **EPIDEMIOLOGIA**

La infección por STEC, particularmente cepas del serogrupo O157, fue demostrada primero en Canadá en 1983-1985 y posteriormente confirmada por numerosos estudios realizados en distintos países, incluida Argentina, a partir de la década del 80 se han producido brotes asociados a la infección por STEC en distintas partes del mundo, afectando a numerosas personas. La ocurrencia de brotes en distintas partes Permite tener un panorama de la distribución mundial de E. coli O157:H7 **(Rivas; Miliwebsky,2007)**

## **RESERVORIOS**

*E. Coli* O157: H7. El reservorio principal de este organismo es el ganado vacuno se ha encontrado en, ovejas, cabras, cerdos, ciervos, perros y aves de corral; animales jóvenes son más propensos a arrojar bacterias en las heces.

La eliminación fecal puede durar sólo unas semanas a meses y puede ser intermitente. La infección experimental de los terneros se traduce en signos clínicos. Las ovejas también parecen transportar el organismo de forma asintomática. **(Sánchez, 2012)**

## **TRANSMISIÓN**

La transmisión es por vía fecal-oral. Los seres humanos pueden ser infectados por contacto directo con animales o portadores humanos, transmisión por fómites, como el agua y los alimentos, también es común. Los pájaros son vectores potenciales. Brotes humanos son a menudo asociados con los productos de comer inadecuadamente cocidos o preparados de origen animal, carne particularmente ternero, sino también la leche no pasteurizada y carnes procesadas (incluyendo carnes ácidas como el salami), Sidra, brotes de alfalfa y otros productos vegetales contaminados también han sido fuentes de epidemias. *Escherichia coli* O157: H7 permanece viable durante más de 2 meses en las heces y el suelo, y sobrevive bien en la carne molida. Sigue siendo infeccioso durante semanas o meses en los alimentos ácidos como la mayonesa, salchichas, sidra de manzana y queso cheddar a temperaturas de refrigeración. **(FDA, 2012)**

## **SIGNOS CLÍNICOS**

Infecciones en humanos el período de incubación varía de uno a ocho días en los seres humanos; uno o dos días es más común; La infección se caracteriza por calambres, dolor abdominal y diarrea acuosa, seguido de diarrea con sangre. Una fiebre de bajo grado puede estar presente o ausente en las etapas iniciales. La deshidratación es posible. En adultos sanos, las infecciones suelen durar alrededor de una semana. Las complicaciones graves pueden desarrollar en un pequeño porcentaje de los casos, Síndrome urémico hemolítico (SUH) se produce en 2-10% de los pacientes, por lo general una semana después del comienzo de la

diarrea. **SUH** se caracteriza por insuficiencia renal, lo que puede resultar en un daño permanente, y la anemia hemolítica. Las convulsiones, derrames cerebrales, pancreatitis, perforación del colon, hipertensión y coma también pueden ser visto. Algunos pacientes desarrollan diabetes dependiente de la insulina permanente. SUH puede afectar a todas las edades, pero es más común en niños menores de 10 años. **(Rivas; Miliwebsky,2007)**

## **MORBILIDAD Y MORTALIDAD**

En los Estados Unidos, se cree que aproximadamente 63.000 casos de infecciones por *Escherichia coli* se produce anualmente. La colitis hemorrágica es generalmente auto limitada y la enfermedad suele durar alrededor de una semana. SUH se desarrolla en 2-10%. Las complicaciones y muertes son particularmente comunes en los niños pequeños, los ancianos y las personas con enfermedades debilitantes. El HUS es fatal en 3-5% de los pacientes y TTP en hasta el 50% de los ancianos. La muerte puede ocurrir incluso en casos de colitis no complicada. **(CDC, 2010)**

## **DIAGNÓSTICO**

Se utilizan tres criterios diagnósticos para establecer la asociación entre enfermedad e infección por *Escherichia coli* (STEC): aislamiento y caracterización del patógeno; detección de Stx libre en materia fecal (StxMF); y detección de anticuerpos anti-Stx en suero<sup>21</sup>. Para la identificación de las cepas STEC en materia fecal se utiliza como tamizaje la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos o “primers” específicos para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfbO157*. La caracterización genotípica de los factores de virulencia accesorios, *eae* y *exhA* se realiza también por PCR. Los aislamientos Stx positivos son identificados por técnicas bioquímicas estándares, y sero tipificados usando antisueros de *Escherichia. coli* O y H. Para la caracterización fenotípica se realiza, además, la detección de la entero hemolisina, producción de Stx por citotoxicidad específica en células Vero, y ensayos de sensibilidad a los antimicrobianos. La sub tipificación de

las cepas se cumple con la identificación de las variantes de *stx* y *eae* por análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción, fago tipificación de cepas O157, y con el estudio de la relación clonal aplicando la técnica de macrorrestricción y separación por electroforesis de campos pulsados. Para la detección de StxMFse emplea la técnica de neutralización del efecto citotóxico en células Vero, empleando anticuerpos monoclonales para Stx1 y Stx2. La determinación de anticuerpos anti-Stx en los sueros de los pacientes, se realiza por ensayos de neutralización del efecto citotóxico en células Vero y por Western Blot. **(Rivas, et al 2006)**

### **Diagnostico por el Método de GDS Aseguramiento ® Avanzado Genética de Detección Patógenos Alimentarios**

Es uno de los métodos de diagnóstico recomendado por FSIS USDA para la detección de stec y non stec, por sus características y precisión este método de diagnóstico ha sido oficializado por el instituto de protección y sanidad Agropecuaria IPASA

#### **Velocidad y precisión**

Método de detección precisa una rápida cuenta con las últimas innovaciones en tecnología de detección genética y microbiología de los alimentos para la detección de Top STEC, incluyendo *E. Coli* O157: H7, O26, O45, O103, O111, O121, y O145.

#### **Tres niveles de especificidad**

La colección versátil de los ensayos de STEC Aseguramiento de GDS MPX incorpora tres niveles de especificidad, incluyendo propietaria PickPen® separación inmunomagnética (IMS) para garantizar el tiempo rápido y preciso de los resultados.

Con la PickPen IMS, partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos específicos a la parte superior de STEC O-grupos se combinan con la muestra enriquecida. El dispositivo PickPen recoge y elimina las partículas con el límite *E. coli* que los separa de los grupos que no son objeto O y ayudando a asegurar la detección de los objetivos de genes se limita a las juntas de grupos deseados *E. coli*. La realización de IMS antes del análisis por PCR elimina los falsos positivos debido a la no diana O-grupos de *E. coli*. **(Biocontrol, 2016)**

## TRATAMIENTO

El tratamiento de apoyo y puede incluir líquidos y una dieta blanda. Los antibióticos no se utilizan normalmente: no parecen reducir los síntomas, prevenir las complicaciones o disminuir la excreción y parecen aumentar el riesgo de síndrome urémico hemolítico. Los pacientes con complicaciones pueden requerir de cuidados intensivos, incluyendo diálisis. Las vacunas no están disponibles. **(CDC, 2014)**

## PREVENCIÓN

- Utilización de buenas prácticas de higiene durante el faenamiento del ganado.
- Aplicar controles en los puntos críticos de la elaboración de alimentos.
- Asegurar una correcta y homogénea cocción de la carne. La bacteria se destruye a los 70°C.
- Tener especial cuidado con la cocción de la carne picada, ya que generalmente se cocina bien la parte superficial, pero no en el interior, permaneciendo la bacteria viable.
- Evitar el contacto de las carnes crudas con otros alimentos.
- No consumir jugos de frutas no pasteurizados.
- Lavar cuidadosamente las frutas y verduras.
- Asegurar la correcta higiene de las manos. Deben lavarse siempre con agua y jabón antes de preparar los alimentos y después de manipular carne cruda.

- Lavar las manos con agua y jabón luego de ir al baño.
- No asistir a comunidades cerradas aquellas personas con diagnóstico bacteriológico positivo a *Escherichia coli* productora de Shiga toxina hasta no tener 2 coprocultivos negativos en un lapso de 72 hrs.
- Evitar el uso de antimicrobianos y antidiarreicos, considerados factores de riesgo en la evolución de diarrea a SUH;
- Consumir agua potable. Ante cualquier duda hervirla. **(OMS,2011)**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Tipo de estudio**

Este es un estudio descriptivo de corte transversal.

### **Área de estudio**

El estudio se realizó en el matadero NUEVO CARNIC ubicado en el departamento de Managua, dirección en el Km. 10 carretera norte, un Km. al norte con coordenadas 86° 10' 28.2" de longitud oeste 12° 9' 17.50" de latitud norte, se encuentra a 56 msnm, las precipitaciones anuales alcanzan 1,200 mm y una temperatura media anual de 26.6°C, el clima de la ciudad es de tropical de sabana

### **Población en estudio**

Todo el Lote de producción procesados en un día cada sub-lotes equivale a 175 cajas de 60 libras cada una, elaboradas en una fecha específica de producción.

### **Tamaño de la muestra y tipo de la muestra**

un lote de producción el cual es un sub-lote de carne procesada en un día. Equivalente a 10,500 libras de productos de carne fresca destinados a la exportación.

### **Selección de la muestra**

De la producción del día se tomará una muestra por cada 175 cajas de producto bovino según procedimiento oficial del Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria N60 (1 muestra que consta de un número de 60 cortes).

### Factores de inclusión

Son los productos de carnes procesados en un día en NUEVO CARNIC que están conformados por sub lotes, de los cuales se tomarán por cada 175 cajas un producto para ser analizados. Productos industriales CH Y BM (cecina y musculo blando) que se exportaron en los meses de estudio.

### Factores de exclusión

Cortes selectos de carne bovina, que no será sometido a muestreo.

### OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

ESTUDIO	VARIABLES	DEFINICION	INDICADOR	ESCALA
STEC	Presencia	Presencia de STEC en los cortes que conforman la muestra enviada al Laboratorio	Resultado de la muestra tomada	Positivo
	Ausencia	Ausencia de STEC en los cortes que conforman la muestra enviada al Laboratorio	Resultado de la muestra tomada	Negativo
E. coli O157:H7	Presencia	Presencia de STEC en los cortes que conforman la muestra enviada al Laboratorio	Resultado de la muestra tomada	Positivo
	Ausencia	Ausencia de STEC en los cortes que conforman la muestra enviada al Laboratorio	Resultado de la muestra tomada	Negativo

## **Materiales y Equipos**

Bolsas Whirl-Pak para muestras, ganchos, chairas, pinzas, cuchillos, solución desinfectante, agua caliente, termómetro, toallas de papel y los formatos para registrar las cajas muestreadas.

## **Procedimiento para la toma de muestra de E. coli O157:H7 Escherichia coli productora de Shiga toxina (STEC) según método oficial, n60, IPSA.**

1. Se colocó de manera aséptica la cantidad de piezas, basados en los sub-lotes de un día de producción.
2. Se Corto piezas de carne aproximadamente de 3 pulgadas de largo, 1 pulgada de ancho y 1/8 de pulgada de grueso, seleccionado preferiblemente de los productos que vienen de la superficie de las canales. El peso mínimo de la muestra debe ser de 375 gramos (Cantidad indicada por el método de GDS de BIOCONTROL SYSTEM) o 325 gramos
3. Se Colecto 60 piezas de carne de las 60 cajas de un sub-lote de 175 cajas.
4. Para poder obtener las 60 piezas de carne, tomamos la muestra una caja de por medio que se pese en las basculas. Muestreamos la primera y la ultima caja, esto dará 59 cajas y se añadió la penúltima para completar las 60 cajas.
5. Se Colocó las 60 piezas de carne en dos bolsas WHIRL-PAK (30 piezas de carne en cada bolsa) apropiadamente identificadas, la muestra debe pesar aproximadamente 3/4 de libra y colectar una muestra adicional en una tercera bolsa WHIRL-PAK de 1 libra y ¼ como contra muestra. Las dos bolsas con los 30 pedazos y la tercera bolsa con la contra muestran deben pesar aproximadamente 2 libras (907 gramos).

6. Se Tomó la temperatura del sub-lote y no de la muestra tomada.
7. Las cajas, hasta las 175 del primer sub-lote se identificaron en ambos lados con el sub-lote A y con la fecha de producción.
8. Se Muestreo los siguientes sub-lotes de acuerdo con las instrucciones previas e identificarlos con la siguiente letra (no usada) del alfabeto y la fecha de producción.
9. Se Realizó un análisis por separado en cada uno de los sub-lotes.
10. Se Aplicó la prueba N60 al excedente del día de producción y no se mezcló con la producción del día siguiente.

#### Envío de la Muestra:

- 1) Las muestras se enviaron al Laboratorio el mismo día de la toma y con su respectiva hoja de remisión.
- 2) Las muestras coleccionadas se mantuvieron refrigerada a 4°C y enviadas de esa forma al Laboratorio, las muestras no deben congelarse, se aseguró el correcto empaque de las muestras para evitar que estas se rompieran y se contaminaran.

#### **Análisis Laboratorial (método de aseguramiento GDS®MPX)**

El método de aseguramiento GDS®MPX de las 7 principales es un sistema de ácido nucleico automatizado para la detección de la E. coli O 157:H7 y de las “seis principales” E. coli (STEC) toxígenos de Shiga no-O157. Las seis principales STEC no-O157 son definidas como E. coli que pertenecen a los serogrupos O103, 0111, O121, O145, O26 o O45 que poseen tanto el gen eae y al menos uno de los genes stx o stx de la toxina Shiga.

El método de Aseguramiento GDS MPX de las 7 STEC principales utiliza un procedimiento patentado de preparación de muestras basado en IMS para capturar organismos pertenecientes a 7 serogrupos O específicos (O103, O111, O121, O145, O26, O45, Y O157) antes del análisis genético para los genes de patogenicidad asociada.

### **Componentes Del Kit**

Cada kit del método de Aseguramiento GDS MPX de las 7 STEC principales contiene lo siguiente:

Reactivo de concentración de los 7 STEC principales, tubos de amplificación de los principales STEC MPX, Búfer de re-suspensión MPX, solución de lavado de los principales STEC.

### **Equipos Y Materiales requeridos**

Otros materiales necesarios no proporcionados incluyen:

Medios mEHEC; Autoclave; Equilibrio analítico; tolerancia  $\pm 0.2g$ ; Stomacher/Masticador; Bolsas tipo stomacher con filtro o su equivalente; incubadora capaz de mantener  $41.5 - 42.5^{\circ}C$  con micro pipeta capaz de suministrar 1.0 mL

### **Preparación de la muestra**

#### **A. Preparación de la porción de prueba y enriquecimiento**

(a) Muestra de Res- Asépticamente pesar una porción de prueba de 375 g en 1,500mL de un medio ( $42^{\circ}C$ ) mEHEC precalentado (para la muestra de 25g utilizar 225 mL mEHEC). Masticar u homogenizar la muestra a mano durante 2 minutos. Incubar durante 10-18 horas a  $42^{\circ}C$ .

## **B. Protocolo de preparación de la Muestra**

Cambiarse los guantes antes de manipular reactivos.

a) Vórtice del reactivo de concentración de las 7 principales STEC. Transferir inmediatamente transfer 20  $\mu$ L a cada uno de los pozos de muestra requeridos de Aseguramiento GDS (1 pocillos/muestra) utilizando pipeteador de repetición y puntas de pipetas de 0.5 mL. Cubrir la placa de re-suspensión con tiras adhesivas.

b) Transferir 1.0 mL de solución de lavado de las principales STEC a cada uno de los 2 pocillos de muestras adicionales (2 pocillos/muestra) utilizando una pipeta de repetición y puntas de pipetas de 10 mL.

c) Transferir 45  $\mu$ L de Bùfer de Re-suspensión MPX a los pocillos de muestra en la placa de re-suspensión utilizando un pipeteador de repetición y puntas de pipeta de 0.5 mL. Cubrir la placa de re-suspensión con tiras adhesivas.

d) Remover cuidadosamente la tira adhesiva de una franja de pocillos de muestra que contengan Reactivo de concentración de las 7 STEC principales. añadir 1.0 mL de una muestra incubada a cada pocillo de muestra. Evitar transferir partículas de alimentos. Debe utilizarse una nueva punta de pipeta por cada muestra, Cubrir cada franja de pocillos de muestra con una nueva tira de película adhesiva antes de añadir muestras a una nueva franja de pocillos. Inmediatamente devolver las muestras a la incubadora para ser utilizadas durante la confirmación si es necesario.

e) Colocar los pocillos de muestra sellados en el mezclador de vórtice y centrifugar a unos 900 rpm aproximadamente por 10-20 min. Si es necesario ajustar los rpm para estar seguro de que el líquido no entre en contacto con la tira adhesiva.

- f) Con cuidado descartar la tira adhesiva de una línea de muestras. Retirar la película plástica de los pocillos de muestra que contengan solución de lavado de las principales STEC.
- g) Cargar las puntas en el PickPen, asegurando que las puntas estén firmemente colocadas en la herramienta del PickPen. Extender los imanes del pickpen e insertarlos en la primera franja de pocillos de muestra. Agite suavemente por 30 segundos al mismo tiempo que mueva continuamente de arriba y abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo. Golpear un poco las puntas del PickPen contra uno de los lados de los pocillos de muestra para remover el exceso de gotas del medio.
- h) Transferir el PickPen a los pocillos de muestras correspondiente que contengan solución de lavado de las principales STEC y retraer los imanes del pickpen Para liberar las partículas en la solución de lavado
- i) Desechar las puntas del pickpen y cargar un nuevo juego de puntas en el PickPen.
- j) Extender los imanes del pickpen e insertarlos en la franja de pocillos que contengan la solución de lavado de las principales STEC y partículas. Agitar suavemente por 30 segundos al mismo tiempo que mueva continuamente de arriba hacia abajo desde la superficie hasta el fondo del pocillo. Golpear las puntas del pickpen contra uno de los lados de los pocillos de muestra para remover el exceso de gotas de la solución de lavado.
- k) Transferir el pickpen al segundo juego de pocillos de muestras que contengan solución de lavado fresca de las principales STEC y suavemente centrifugar por 10 segundos (no liberar partículas en la solución)

l) Golpear las puntas del pickpen contra uno de los lados de los pocillos de muestra para remover el exceso de gotas de la solución de lavado de las principales STEC.

m) Transferir las partículas a la fila correspondiente de la placa de re-suspensión preparada. Con las puntas sumergidas, retirar los imanes del pickpen y golpear suavemente para las partículas de Búfer de re-suspensión MPX.

n) Repetir todos los pasos de la (f) hasta la (l) para todas las muestras. Cubrir placa de re-suspensión con tiras de cinta adhesiva.

### **Procedimiento de la Prueba**

Cambiarse los guantes antes de manipular reactivos.

#### **A. Preparación del bloque de Gel refrigerante**

a) Antes del uso inicial del bloque de gel refrigerante debe ser almacenado en el congelador (-25 a -15° C) por 6 horas. Al congelarse el bloque de gel refrigerante cambiara de color de rosa a purpura. Cuando no se utiliza el bloque de gel refrigerante deberá seguir siendo almacenado a una temperatura de -25 a -15° C

b) Entre cada utilización el bloque de gel refrigerante deberá ser devuelto al refrigerador hasta que se tome purpura en su totalidad indicando que ya está listo para su uso. Esto podría tardarse hasta 2 horas.

Nota: los ensayos del método de Aseguramiento MPX de las 7 STEC principales requieren el uso del bloque de gel de enfriamiento. El bloque de aluminio no debe ser utilizado.

## **B. Preparación de los tubos de Amplificación**

- a) La configuración de los datos de entrada del Aseguramiento GDS, Rotor – Gene deberán ser completados antes de transferir las muestras de la placa de re-suspensión en los tubos de amplificación.
- b) Retirar los tubos de amplificación MPX de las principales STEC de la bolsa de aluminio y colocarlas en el bloque de gel refrigerante congelado. Sellar la bolsa nuevamente.
- c) Transferir 30  $\mu$ L de la muestra de los pocillos de la placa de re-suspensión en cada tubo de amplificación utilizando una pipeta multicanal y puntas con filtro de barrera. Presionar firmemente hacia abajo en la tapa de cada tubo de amplificación para cerrar. Visualmente inspeccione cada tubo para asegurarse que la tapa está bien cerrada.
- d) Antes de colocar la paleta giratoria, invierta los tubos de amplificación y agite con un movimiento seco para mezclar bien los contenidos
- e) Colocar los tubos de amplificación en orden secuencial en el aseguramiento GDS Rotor –Gene, comenzando por la posición # 1. Iniciar el ciclo del Rotor-Gene. Consultar el manual de usuario del aseguramiento GDS obtener instrucciones detalladas sobre el funcionamiento del Rotor-Gene.

Nota: El aseguramiento GDS Rotor –Gene debe dar inicio 15 minutos después de la adición de las muestras en los tubos de amplificación

## **Resultados**

Al termino de completar la vuelta cada muestra será identificada como positivas o negativas para E. coli O157:H7 y positivas o negativas para las principales STEC, o sin Amp. Los resultados de genes individuales (eae, stx<sup>1</sup>, stx<sup>2</sup>) son presentados también.

### **Principales STEC (eae/Stx) Resultados:**

**Positivas:** las muestras positivas para E. coli son las que pertenecen a los serogrupos O tales como O103, O111, O121, O145, O26 y O45 y contienen el gen eae y uno o ambos genes de la toxina Shiga tales como stx<sup>1</sup> o stx<sup>2</sup>.

**Negativas:** las muestras negativas para E. coli son las que pertenecen a los serogrupos O tales como O103, O111, O121, O145, O26 y O45 y contienen el gen eae y uno o ambos genes de la toxina Shiga tales como stx<sup>1</sup> o stx<sup>2</sup>.

**Sin Amp:** la amplificación no tuvo lugar. Repetir la prueba comenzando desde el punto B.

### **Resultado para E. coli O157:H7:**

**Positivas:** las muestras positivas para E. coli O157:H7

**Negativas:** las muestras negativas para E. coli O157:H7

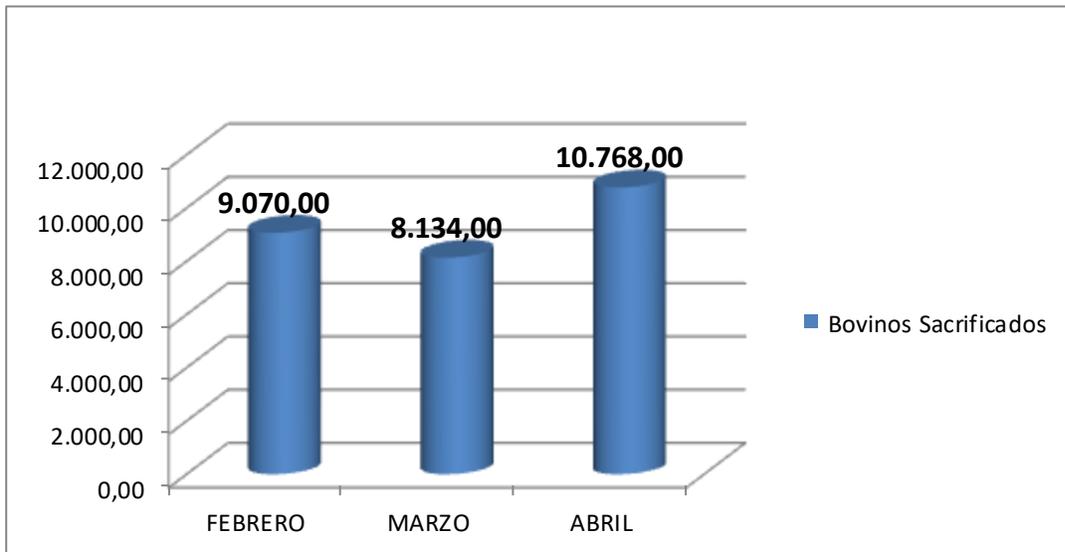
**Sin Amp:** la amplificación no tuvo lugar. Repetir la prueba u contactar el servicio técnico de Biocontrol

### **Análisis estadístico.**

Estadística descriptiva antes mencionada con el apoyo de programa estadístico. IBM SPSS Statistics2.1, En este estudio se realizarán grafico tablas porcentuales

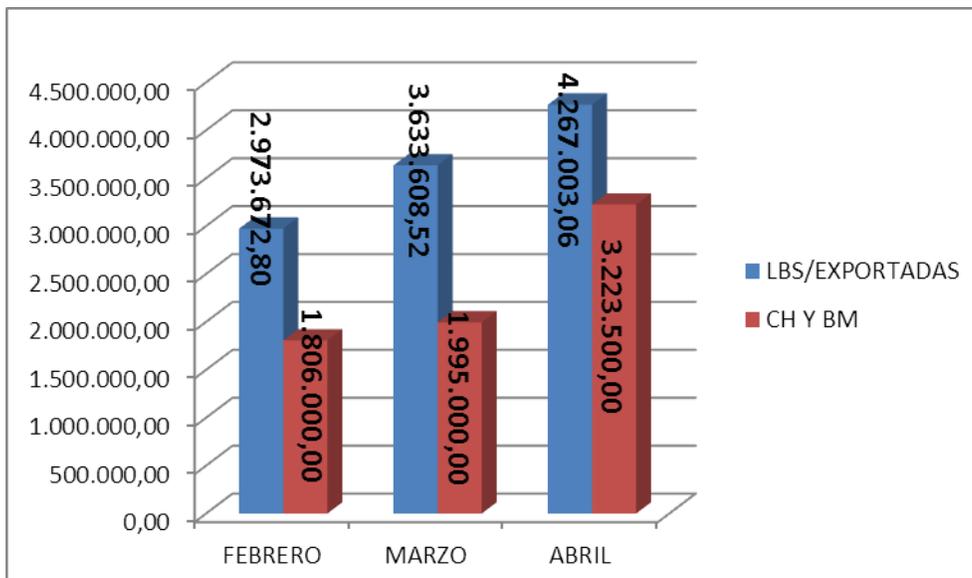
## Resultados

Tabla 1. Refleja los bovinos sacrificados de febrero a abril del 2016, en el matadero Nuevo Carnic con un total de 27,972 reses



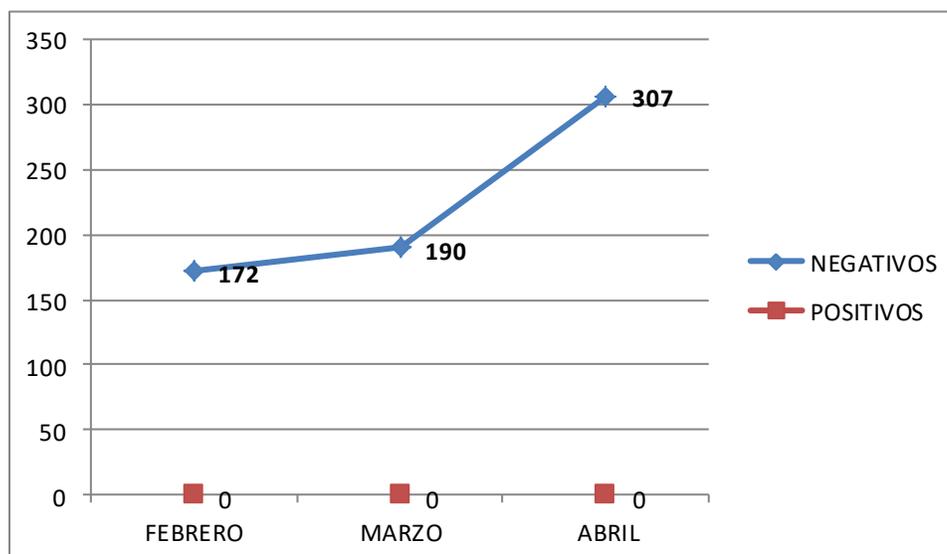
**Tabla 1. Bovinos Sacrificados**

**Tabla2. Refleja la producción total que se exporta en determinado mes también los productos que se sometieron a muestreo, la diferencia de estos incluye los cortes selectos**



**Tabla2.Producción Nuevo Carnic 2016**

**La tabla 3. Refleja la cantidad de muestras enviadas al laboratorio para el análisis de *E. Coli* O157 H7 y otras STEC, De los cuales resultaron negativas todas las muestras enviadas durante los tres meses de estudio**



**Tabla 3. Muestreo y resultados de laboratorio**

## PERDIDAS ECONOMICAS POR DECOMISOS POR *E. Coli* O157 H7

Al no existir ni un caso positivo a la bacteria *E. Coli* O157 H7, no se decomisó producto alguno, ni se presentó pérdidas económicas. En caso de existir un caso positivo al serotipo O 157 H7 y otras STEC se tendría que decomisar y condenar todo el lote completo (175 cajas equivalentes a 10500 lbs)

categoria	Peso/kg	Costo canal caliente C\$	Pérdida económica C\$.	Perdidas económicas dólares U\$
CH Y BM	4764	86	409709,6188	14,276

## DISCUSION

En el presente estudio No se detectó *Escherichia Coli* O157 H7 Y Otras STEC en muestras de carne bovina faenadas en el Matadero nuevo Carnic, en Nicaragua no existe registro por el ministerio de salud de personas afectadas que hayan sido afectadas por estos serotipos de *Escherichia coli*

Diversos estudios, en distintos países, han aislado éste patógeno de la carne bovina, describiendo una prevalencia de STEC O157 que fluctúa entre 0,4 a 3,7% y de STEC no-O157 que fluctúa entre 2,4 a 30% (Hussein, 2007). Lo anterior, difiere a los resultados del presente estudio

Estudios Realizados en el departamento de León, Nicaragua revelaron alta correlación de casos diarrea en La niñez nicaragüense con los varios serotipos de *Escherichia coli* y algunos casos aislados con EHEC (Reyes, 2010) pero el estudio fue realizado en heces liquidas no en carne, ni tampoco se identifica el serotipo E. Coli O157 y otras STEC

## **CONCLUSIONES**

- No se encontró la presencia de Escherichia coli en los productos CH Y BM que se exporta
- No se presentó pérdidas económicas
- El sistema de inspección sanitaria de la carne del Establecimiento número 5. Matadero nuevo Carnic, es uno de los mejores de Nicaragua
- De gran importancia sanitaria la aplicación de los sistemas de inocuidad y calidad de la carne (BPM, HACCP, NORMAS ISO)

## RECOMENDACIONES

- Realizar otros estudios en mercados de Nicaragua que no cuentan con los sistemas de inspección de carnes, ni los programas prerequisites para determinar posible contaminación fuera del matadero
- Realizar controles a la carne bovina importada y nacional, para detectar la presencia de E. COLI O157 H7 Y OTRAS STEC.
- Se sugiere exigir, a los proveedores de carne bovina nacionales y extranjeros, el muestreo y análisis de STEC durante la faena en los Establecimiento de origen.
- Fomentar las medidas de higiene y manipulación de los alimentos antes de su consumo.

## BIBLIOGRAFIA

- Biomed Res, caracterización de la productora de Toxina Shiga Escherichia coli aislada de carne picada, Argentina, 2014 pdf [http: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc)
- Biocontrol System.inc. marca registrada, Assurance GDS U.S. instructivo. Patent No. 6468810 2016
- Centers for Diseases control, en español, seguridad alimentaria, EE.UU. Atlanta 2010 version HTML. [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
- Centers for Diseases control, en español, seguridad alimentaria, EE. UU. Atlanta 2014 version html. [http: www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
- Center for food security y public heath, 2009 E. Coli Entero Hemorragica IOWA STATE UNIVERSITY, college of veterinary Medicine [http: www.cfsph.sastate.edu/IICAB/](http://www.cfsph.sastate.edu/IICAB/)
- Food and Drug Administration. Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Second Edition. [chapter title, pp. \_\_\_\_]. 2012.pdf [http: www.fda.gov/food](http://www.fda.gov/food)
- [http: www.fao.org/fileadmin/user\\_e\\_coli\\_es\\_pdf2012](http://www.fao.org/fileadmin/user_e_coli_es_pdf2012), Prevención de la E. coli en los alimentos, enero 2012-pdf

- Hussein H. Prevalence and pathogenicity of Shiga toxin-producing Escherichia coli in beef cattle and their products. J. Anim. Sci. 2007; 85: 63-72.
- INETER. 2000. Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales. Extensión territorial de Nicaragua por Departamentos y Municipios
- Jane Johnson, DVM, noO157 E. Coli productora de Shiga toxina, fsis-USDA, marzo 2015. [http: www.fsis.usda.gov/wps](http://www.fsis.usda.gov/wps)
- [http: www.who.int/about](http://www.who.int/about) Enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC), Nota descriptiva N°125, leído. 2015 pdf OMS, Diciembre de 2011
- Reyes Navarrete, Flora Escherichia coli y diarrea en niñez nicaragüense, tesis doctoral Karolinska Institute Stockholm –UNAN LEON, Nicaragua, 2010.
- Rivas, Marta; Miliwebsky, Elizabeth, et al. Diagnostico y caracterización de E. coli O157 H7 Productor de Toxina Shiga a partir de Especimenes clínicos, Departamento de Bacteriología- Instituto de enfermedades infecciosas 2007 A.N.L.I.S. WHO GLOBAL SALM SURV.
- Rivas Marta, Miliwebsky Elizabeth, Epidemiologia del Síndrome Urémico Hemolitico en argentina (Buenos Aires) 2006 Instituto de enfermedades infecciosas ANLIS Supl III.

- Sanchez Plata Marcos, Escherichia coli, The food consortium LLC, 2012 pdf, [mxsp@msn.com](mailto:mxsp@msn.com)
- Schlman Stanford, clinical infectius diseases, departamento of Pediatric, Chicago Ilinois vol. 45, num 8 pp-10225-1029. Art pdf.
- Vidal R, Oñate A, Salazar Y, Prado V. Shigatoxin Producing Escherichia coli in latin América. 2010, 179-190

# **ANEXOS**



**INSTITUTO DE PROTECCIÓN Y SANIDAD AGROPECUARIA**  
**DIRECCIÓN DE INOCUIDAD AGROALIMENTARIA**  
**SECCION DE INOCUIDAD CARNES**

**Hoja de Remisión de Muestras al Laboratorio de**  
**Diagnóstico Veterinario y Microbiología de los Alimentos**  
*Programa de Muestreo de E. Coli 0157:H7 y E. Coli non 0157 (STECs)*

Laboratorio IPSA

Laboratorio Planta

Est. No. \_\_\_\_\_

Nombre: \_\_\_\_\_

Fecha de Matanza: \_\_\_\_\_

Fecha de Deshuese: \_\_\_\_\_

Sub-lote: \_\_\_\_\_

Fecha de Envío: \_\_\_\_\_

Corte: \_\_\_\_\_

Temperatura del Producto: \_\_\_\_\_

Procedimiento de Toma: \_\_\_\_\_

Hora de la Toma: \_\_\_\_\_

Código del Laboratorio

Muestra de Rutina

Muestra de Verificación

Muestra de Confirmación

No. De Serie de Cajas

1-	21-	41-
2-	22-	42-
3-	23-	43-
4-	24-	44-
5-	25-	45-
6-	26-	46-
7-	27-	47-
8-	28-	48-
9-	29-	49-
10-	30-	50-
11-	31-	51-
12-	32-	52-
13-	33-	53-
14-	34-	54-
15-	35-	55-
16-	36-	56-
17-	37-	57-
18-	38-	58-
19-	39-	59-
20-	40-	60-

Fecha y Hora de recepción: \_\_\_\_\_

Firma del Responsable de Laboratorio. \_\_\_\_\_

Número y sello de Marchamo: \_\_\_\_\_

F-SIC-08 Médico Veterinario Oficial

Inspector Auxiliar Oficial



**Fotografía1. Toma de muestra de N60. para E. coli y otras STEC**



Fotografía 2. Muestra de N60

## Hoja de análisis laboratorial de la carne y otros.

ANALISIS	FEBRERO				MARZO				ABRIL				TOTAL			
	POSITIV.	NEGAT.	PENDIE.	TOTAL	POSITIV.	NEGAT.	PENDIE.	TOTAL	POSITIV.	NEGAT.	PENDIE.	TOTAL	POSITIV.	NEGAT.	PENDIE.	TOTAL
Organoclorinados	0	250	0	250	0	130	0	130	0	178	0	178	0	558	0	558
Organofosforados	0	36	0	36	0	12	0	12	0	10	0	10	0	58	0	58
Antibióticos	0	2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	5	0	5
Cloranfenicol	0	2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	5	0	5
Sulfonamidas	0	0	0	0	0	2	0	2	0	1	0	1	0	3	0	3
Hormonas	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	2	0	2
Metales Pesados	0	2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	5	0	5
Benzimidazoles	0	2	0	2	0	2	0	2	0	1	0	1	0	5	0	5
Avermectina	0	568	0	568	0	516	0	516	0	274	0	274	0	1358	0	1358
Ambiental	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	2	0	2
Salmonella	0	17	0	17	0	21	0	21	0	23	0	23	0	61	0	61
E. Coli Genérico Hisopado	0	30	0	30	0	27	0	27	0	36	0	36	0	93	0	93
E. Coli Genérico Músculo	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3
E. Coli 0157:H7 y STECs	0	172	0	172	0	190	0	190	0	307	0	307	0	669	0	669
Mesófilos Aerobios	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3
Clostridium Perfringes	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3
Bacteriológico del Agua	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	3	0	3
Bacteriológico del Hielo	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2	0	2
Físico-Químico de Agua	0	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	3
Encefalopatía E.E.B	0	3	0	3	0	1	0	1	0	1	0	1	0	5	0	5
<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>1093</b>	<b>0</b>	<b>1093</b>	<b>0</b>	<b>914</b>	<b>0</b>	<b>914</b>	<b>0</b>	<b>839</b>	<b>0</b>	<b>839</b>	<b>0</b>	<b>2846</b>	<b>0</b>	<b>2846</b>