



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología**

**Detección de cepas de Escherichia coli diarreogénicas en  
carnes y productos cárnicos de 6 mercados de Lima  
Metropolitana empleando PCR múltiplex en tiempo real y  
su asociación con las condiciones higiénico- sanitarias de  
expendio: junio a octubre, 2009**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo

Parasitólogo

**AUTOR**

Paulo Roberto FLORES ARÉVALO

**ASESOR**

Carmen MÉNDEZ F

Lima, Perú

2010



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Flores, P. (2010). *Detección de cepas de Escherichia coli diarreogénicas en carnes y productos cárnicos de 6 mercados de Lima Metropolitana empleando PCR múltiple en tiempo real y su asociación con las condiciones higiénico-sanitarias de expendio: junio a octubre, 2009*. Tesis para optar el título de Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

---

## 1.-INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es una bacteria que forma parte de la microbiota del intestino grueso del hombre y que en condiciones normales no causa ninguna enfermedad. Tradicionalmente se considera como un indicador de contaminación fecal en agua y alimentos, y su presencia en un determinado número puede advertir la existencia de algún agente patógeno. (Adams y Moss, 1995).

En los últimos 50 años se han detectado diversos serotipos de *E. coli* que pueden causar alguna patogenicidad y según su comportamiento clínico se han clasificado en grupos como: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en Inglés), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* shigatoxigénica (STEC), *E. coli* enteroadherente (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) entre otros (Nataro y Kaper, 1998) (Rodríguez- Ángeles, 2002).

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) de tipo O157:H7 es de gran importancia en la salud pública debido a su alta patogenicidad. Desde su identificación en 1983 se han detectado diversos brotes epidemiológicos en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, Japón y posteriormente en otros lugares del mundo. Esta variedad está asociada específicamente a carnes y productos cárnicos (hamburguesas, embutidos), a productos lácteos sin pasteurizar y a aguas contaminadas; por lo que es importante realizar su detección. (WHO, 2005).

Por otra parte *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las principales causas de diarreas en infantes en países en desarrollo y ocasiona la diarrea del viajero.

Tradicionalmente la caracterización de *E. coli* diarreogénicas se han realizado en base a los distintos serotipos y a sus factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998).

Debido al desarrollo de la biología molecular en los últimos 20 años se han caracterizado los genes que codifican los factores de virulencia presentes en DEC, así tenemos: *invE* en *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *stx1* y *stx2* en *E. coli* shigatoxigénica (STEC), *eaeA* en *E. coli* enteropatógenas (EPEC), *lth* y *sth* en *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *aggR* en *E. coli* enteroagregativas (EAEC) y *daaC* en *E. coli* de agregación difusa (DAEC), entre otros (Nataro y Kaper 1998, Guion *et al.* 2008).

Este avance ha permitido emplear estos genes en el diagnóstico, utilizando técnicas como la de PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), que es más sensible que la serotipificación (Chomvarin *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007).

En nuestro medio se han identificado cepas de *E. coli* enterohemorrágica procedentes de diversos productos alimenticios (León, 2003), sin embargo el estudio de las otras variedades diarreogénicas no se ha descrito en alimentos en nuestro medio; salvo en el caso de estudios de diarreas en infantes (Ochoa *et al.*, 2009).

El riesgo de infección por *E. coli* diarreogénica es alta, debido a las inadecuadas prácticas de manipulación e higiene de los alimentos y a la carencia de mecanismos de vigilancia y gestión sanitaria (León, 2003); por lo que es importante su investigación.

El objetivo de este estudio es la detección de cepas de *E. coli* diarreogénicas a partir de muestras de carne cruda de bovino y productos cárnicos derivados procedentes de centros de expendio de Lima metropolitana; mediante la técnica de PCR múltiple en tiempo real validada y además determinar su asociación con las deficientes condiciones higiénico-sanitarias de los lugares de expendio y el número de *E. coli* típica presente.

## **2.-Marco Teórico**

### **2.1.-Antecedentes**

#### **2.1.1.-Características generales de *Escherichia coli***

El género *Escherichia* comprende a más de 6 especies siendo las más conocidas *Escherichia coli*, *E. hermannii*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. vulneris*, *E. albertii* de las cuales la que tiene mayor importancia clínica y epidemiológica es *Escherichia coli* (Garza Velasco *et al.* 2001).

*Escherichia coli* es un bacteria Gram negativa anaerobia facultativa, no esporulada que forma parte del grupo de las *Enterobacteriaceae*. Presenta una forma cocobacilar y mide entre 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho por 2 $\mu\text{m}$ , con un volumen de 0,6 a 0,7  $\text{cm}^3$ . Algunas cepas presentan flagelos y son móviles.

Su temperatura óptima de crecimiento es de 37<sup>o</sup> C, pero puede multiplicarse en un rango de 20<sup>o</sup> a 49<sup>o</sup> C y puede sobrevivir a bajas temperaturas incluso menores a los 0<sup>o</sup> C, suele ser resistente a los ácidos débiles. Esta bacteria ha sido uno de los seres vivos más ampliamente estudiada y es usada como modelo general para el estudio de los organismos procarióticos. (Madigan *et al.* 2004).

Fue descubierta en 1885 a partir de muestras de heces de un niño por el pediatra austriaco Theodore von Escherich, que en un principio la denominó "Bacterium coli comune". Posteriormente el botánico alemán Walter Migula en 1895 modificó su nombre a *Escherichia coli* en honor a su *primer* descubridor. Es una bacteria ubicua del intestino grueso del hombre y de otros animales de sangre caliente, incluyendo a aves y mamíferos. Vive como comensal, favorece la producción de vitamina K y la absorción de los alimentos. Se sabe que esta bacteria coloniza el tracto intestinal en las primeras 48 horas, después de la primera comida. Fuera del intestino puede mantenerse por

periodos cortos, por lo que es un indicador ideal de contaminación fecal. (Adams y Moss, 1995).

#### **2.1.1.1.- Estructura genómica**

*E. coli* presenta un cromosoma circular, pero también puede presentar algunos plásmidos. Tiene alrededor de 4,639 kb, de los cuales 4,288 kb codifican secuencias potenciales de proteínas. El 70% de su genoma está constituido por genes simples (monocistronicos) y el 6% presenta genes policistronicos. Cerca del 38% de su genoma presenta marcos abiertos de lectura que presentan codificación desconocida. (Blattner *et al.* 1997)

Existen muchas cepas que presentan características genotípicas distintas a las cepas típicas de *E. coli*, las cuales son producto de procesos genéticos como: transformación, transducción y conjugación; ejemplo la presencia de shigatoxinas, que está asociada a ciertos bacteriófagos (Muniesa y Jofre, 2000) mediante el proceso de conversión lisogénica. (Snyder y Champness, 2003 ).

#### **2.1.1.2.- Estructura celular**

*E. coli* tiene forma bacilar a cocobacilar, con una estructura de membrana y pared celular al igual a cualquier otro tipo de bacteria Gram negativa. Presenta una membrana externa con fimbrias adhesivas y lipopolisacáridos, un espacio periplasmático, una delgada capa de peptidoglicano y una membrana celular interna que rodea al citoplasma donde se encuentra el cromosoma. La mayor parte de cepas presentan flagelos y pilis, algunas tienen la capacidad de transferir y adquirir plásmidos (Nanninga, 1998).

### **2.1.1.3.- Bioquímica**

*Escherichia coli* realiza una fermentación ácido mixta a partir de glucosa y otros monosacáridos en condiciones anaeróbicas con producción de lactato, succinato, etanol acetato y CO<sub>2</sub>. En algunos casos hay producción de gas hidrógeno, que puede favorecer el desarrollo de organismos sulfato reductores y de metanógenos. Puede desarrollarse tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, utilizando diversos compuestos de óxido reducción, que incluyen al ácido pirúvico, ácido fórmico, hidrógeno y aminoácidos en la oxidación y en procesos de reducción al oxígeno, nitrógeno y dimetil sulfóxido y trimetil óxido (Ingledew y Poole, 1984).

### **2.1.1.4.- Ecología y Patogénesis**

*E. coli* forma parte de la microbiota del intestino grueso de muchos animales de sangre caliente incluyendo los seres humanos. Participa en procesos de digestión, absorción de nutrientes y en la producción de la vitamina K (Bentley y Meganathan, 1982).

En condiciones normales no causa enfermedad, sin embargo si la bacteria se encuentra invadiendo un tejido extraño a la mucosa intestinal puede generar algunos problemas como: septicemia, meningitis e infección en el tracto urinario. En los últimos 50 años se han encontrado diversas cepas patógenas, que originan diversos cuadros diarreicos graves e incluso colitis hemorrágica; siendo una de las enfermedades entéricas emergentes más importantes.

Desde el punto de vista clínico y epidemiológico se han determinado hasta 7 tipos de *Escherichia coli* diarreogénica, entre las que se encuentran *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* shigatoxigénica (STEC), *Escherichia coli* enteroadherente (EAEC) y *Escherichia coli*



difusa adherente (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998), los cuales serán detallados más adelante.

## **2.2.-Aislamiento e Identificación**

El aislamiento de esta bacteria es relativamente fácil ya sea a partir de muestras fecales o de alimentos, ya que no es exigente en cuanto a su crecimiento *in Vitro*; requiere de condiciones mínimas para poder desarrollarse. Generalmente se usan medios como el agar Mac Conkey o el Agar Eosina Azul de Metileno, que permiten el crecimiento selectivo y la diferenciación de las *Enterobacteriaceae* en base a la morfología de la colonia.

En general las *Enterobacteriaceae* son usualmente identificadas mediante reacciones bioquímicas, empleando en algunos casos *kits* o pruebas rápidas de detección que se encuentran disponibles a nivel comercial. La identificación morfológica de las cepas de *Escherichia coli* puede ser utilizada en forma presuntiva, puesto que sólo el 90% de las cepas de *Escherichia coli* son lactosa positivas; algunas cepas como *E coli* enteroinvasiva son lactosa negativas; otras requieren de medios específicos como el Agar Mac Conkey Sorbitol como en el caso de las *Escherichia coli* enterohemorrágicas. La producción de indol a partir de triptófano es positiva en el 99% de los casos para *Escherichia coli*, lo que hace que sea una prueba confiable para la identificación de otras enterobacterias. (Nataro y Kaper, 1998)

### 2.3.- Serotipificación

La serotipificación juega un rol fundamental en la identificación de cepas diarreogénicas. En 1933, Adam demostró por medio de la serología que una cepa podría estar implicada en un brote de diarrea pediátrica. En 1944, Kauffman propone el empleo del sistema de clasificación serológica que aún se usa y no ha sido modificada hasta hoy (Nataro y Kaper, 1998).

El esquema de Kauffman se basa en la presencia de antígenos somáticos O, se trata de polisacáridos termoestables que diferencian a *E coli* en 170 serogrupos, el antígeno flagelar H, termolábil y de naturaleza proteica que corresponde a 56 serotipos de cada serogrupo. Además son importantes los antígenos K (capsulares I y II) y antígeno F (fimbrial). (Blanco *et al*, 2002).

La combinación específica de los antígenos O y H define el serotipo de *E coli*. Algunos serotipos pueden estar asociados a ciertos síndromes clínicos, pero en general los antígenos serológicos no son considerados como factores de virulencia. Sin embargo estos sirven como marcadores cromosomales que están relacionados a cepas virulentas específicas (Nataro y Kaper; 1998).

**Tabla N° 1: Principales serotipos de *Escherichia coli* diarreogénicas según sus categorías (Garza Velasco *et al*, 2001)**

STEC	O1:NM	O113:H53	O141:NM
	O1:H1	O45:NM	O145:NM
	O1:H7	O45:H2	O145:H25
	O2:H1	O48:H21	O146:NM
	O2:H5	O50:NM	O153:H25
	O2:H6	O50:H7	O157:NM
	O2:H7	O55:H7	<b>O157:H7</b>
	O4:NM	O111:H2	O163:H19
	O4:H10	O111:H7	O165:NM
	O5:NM	O111:H8	O165:H10
	O5:H16	O111:H30	O165:H19
	O6:NM	O113:H53	O165:H25
	O6:H1	O113:H21	O166:H12
	O18:NM	O117:H14	O166:H15
	O18:H7	O118:H12	O91:NM
	O22:H8	O118:H30	O91:H21
	O22:H16	O121:H19	O100:H32
	O25:NM	O125:NM	O101:H19
	O26:NM	O125:H8	O103:H6

EIEC	O28:NM
	O29:NM
	O112:NM
	O115:NM
	O124:NM
	O124:H7
	O124:H30
	O135:NM
	O136:NM
	O143:NM
	O144:NM
	O152:NM
	O164:NM
	O167:NM

EPEC	O26:NM	O114:NM
	O26:H11	O114:H2
	O55:NM	O119:H6
	O55:H6	O125:H21
	O55:H7	O126:H27
	O86:NM	O127:NM
	O86:H2	O127:H6
	O86:H34	O127:H9
	O111:NM	O128:H2
	O111:H2	O142:H6
	O111:H12	O158:H23
	O111:H21	

ETEC	O6:NM	O85:H7
	O6:H16	O114:H21
	O8:NM	O115:H21
	O8:H9	O126:H9
	O11:H27	O128:H12
	O15:H11	O128:H21
	O20:NM	O128:H27
	O25:H42	O148:H28
	O27:H7	O149:H4
	O27:H20	O153:H45
	O49:NM	O159:H20
	O63:H12	O166:H27
	O78:H11	O167:H5
	O78:H12	O159:H41

## **2.4.- Caracterización de cepas de *Escherichia coli* en función a sus factores de virulencia**

La identificación de cepas patogénicas de *E. coli* requiere que puedan ser diferenciadas de otras formas no patogénicas. La presencia de ciertos antígenos se relaciona algunas veces con categorías específicas de *Escherichia coli* diarreogénicas, pero estos marcadores son por lo general insuficientes para caracterizar una cepa (con excepción del serotipo O157:H7, que sirve para determinar *E. coli* enterohemorrágica; el cual se ha identificado con el aumento de casos esporádicos).

La serotipificación suele ser tediosa, costosa, y es realizada por un número limitado de laboratorios. Sin embargo existen métodos que permiten establecer directamente la virulencia de ciertas cepas, estos incluyen ensayos de fenotipificación *in vitro* que se correlaciona con una virulencia específica o a través de la detección de dichos genes.

Uno de los ensayos más empleados para el diagnóstico de *Escherichia coli* diarreogénicas es el ensayo de la adherencia en cultivo celular HEp-2. Este método desarrollado por Cravioto *et al* en 1979 es el “gold standard” para detección de cepas EAEC y DAEC. Se han determinado hasta tres patrones: adherencia localizada (LA), adherencia agregada (AA), y adherencia difusa (DA), que corresponden a los tipos EPEC, EAEC y DAEC respectivamente (Nataro y Kaper, 1998).

## **2.5.- Métodos Moleculares de detección de *Escherichia coli* Diarreogénicas**

Las *E. coli* diarreogénicas fueron uno de los *primeros* microorganismos estudiados por métodos moleculares, los que se aplicaron para el diagnóstico. Su empleo ha ido en progresiva evolución desde el desarrollo de sondas de DNA hasta la aplicación de técnicas como la PCR en tiempo real; que actualmente son los métodos más usados por su rapidez, alta sensibilidad y especificidad.

### **2.5.1.-Sondas de ácido nucleicos**

Los primeros usos de sondas para la detección de cepas patogénicas fueron sobre las toxinas termoestable (ST) y termolábil (LT) de *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), que reemplazaron los modelos animales para su detección. Posteriormente se desarrollaron distintos tipos de sondas para cada uno de los tipos de *E. coli* diarreogénicas.

En general se emplean dos métodos para el uso de sondas específicas. El primero emplea cultivos aislados y se siembran entre 30 a 50 colonias en una placa. Después de la incubación las cepas se pasan a un papel de nitrocelulosa o papel Whatman para su hibridización con sondas marcadas radioactivamente *in situ*, luego se genera una imagen a partir de una exposición a rayos X.

La otra alternativa es el empleo directo de las sondas sobre la muestra. En el caso de muestras de heces, estas son transferidas directamente al filtro de nitrocelulosa y luego son superpuestas dentro de una placa de agar. Después de un tiempo de incubación, el papel de nitrocelulosa es sacado de la placa, secado al aire y tratado como una sola colonia. La ventaja de este método reside en que las colonias de *E. coli* no necesitan ser aisladas, además incrementa la sensibilidad si el patógeno se encuentra en una menor proporción.

Sin embargo la presencia en un número alto de otras bacterias, disminuye la sensibilidad del test (alrededor de  $10^5$  a  $10^6$  por gramo de muestra) y no resulta frente a un cultivo puro del patógeno que puede requerir de la verificación del fenotipo.

En este tipo de ensayo se emplean dos tipos de sondas: las de oligonucleótidos o polinucleótidos. (Fragmentos de DNA.). Los fragmentos de DNA son cadenas de nucleótidos no específicos que pueden unirse a un determinado gen. En cambio los oligonucleótidos lo conforman sondas que se unen a genes específicos que se alinean a determinadas temperaturas (temperatura de alineamiento). (Nataro y Kaper, 1998).

### **2.5.2.- PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que fue desarrollada por Kary E Mullis 1986, la cual permite generar un gran número de copias de DNA, partiendo de una sola copia. Para ello se emplea una enzima capaz de trabajar en altas temperaturas, como la Taq polimerasa (esta enzima se encuentra en la bacteria *Thermus aquaticus* de allí la denominación Taq).

Cuando hacemos una reacción de PCR simulamos lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el DNA y se mezclan todos los ingredientes necesarios para hacerlo: la polimerasa, el DNA del organismo que queremos estudiar (donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar), los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores o cebadores), los dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de  $MgCl_2$ , KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa).

Luego se coloca en el termociclador, máquina que permite el calentamiento y enfriamiento de las moléculas a determinadas temperaturas; pasando varios ciclos de reacción.

En la primera etapa se denomina desnaturalización, las moléculas de DNA se desdoblaron a 95°C y quedan expuestas en hebras simples, luego el termociclador ajusta la temperatura entre 40 a 60 ° C conocido como temperatura de alineamiento. Es en este punto donde se rompen y se forman constantemente dímeros entre los *primers* y el DNA. Aquellas uniones más estables durarán un mayor tiempo, quedando los *primers* “alineados” formando una pequeña región de doble cadena.

La polimerasa se une a este pequeño pedazo de DNA de doble cadena y comienza a copiar en sentido 5' a 3'; al agregar unas bases más, los puentes de hidrógeno que se forman entre las bases estabilizan más la unión y los *primers* permanece en este sitio para el siguiente paso.

Luego la temperatura sube a 72°C, temperatura en la cual la polimerasa llega a su máxima actividad (conocida esta etapa como extensión) y donde se genera la síntesis de más fragmentos de DNA a partir de los que se habían alineado inicialmente.

Para poder visualizar los productos de la PCR, es necesario realizar una electroforesis en gel de agarosa o acrilamida, las cuales serán teñidas por un colorante (bromuro de etidio, por ejemplo), y se notarán como unas bandas que presentan un tamaño específico.

La detección de *E. coli* diarreogénicas por PCR, significó un gran avance en su estudio, debido a su alta sensibilidad. (Vargas *et al*, 1998).

Con el tiempo la PCR ha sufrido algunas modificaciones empleando simultáneamente varios *primers* para la identificación de las cepas patógenas, conocida como PCR multiplex, (Rappelli *et al*, 2001; Toma *et al*, 2003). a la vez se combinó con el monitoreo de la amplificación en el tiempo que ésta ocurre, en la cual no es necesario

realizar una electroforesis para saber si hay formación de productos, a esta técnica se conoce como PCR en tiempo real

### **2.5.3.-PCR en tiempo real**

La PCR ha ido evolucionando, haciéndose un ensayo de rutina en varios campos desde el área forense, clínica y hasta en el control de calidad de alimentos. Entre las distintas variantes se encuentra la PCR en Tiempo Real que es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose la tecnología en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y *quenchers*. Ambos factores, nos van a permitir monitorizar, en tiempo real, lo que esta ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación y va a sustituir a los pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR tradicional (Espy *et al*, 2006).

Una de las principales ventajas de la PCR en Tiempo Real frente a la PCR convencional (aparte de su mayor sensibilidad) es la capacidad de cuantificar; en la PCR convencional se hace en función del producto final y debido a que la propia PCR es una reacción enzimática, las variaciones que se pueden observar son muy significativas; sin embargo, en la PCR en Tiempo Real dicha cuantificación se realiza en función del valor del Ciclo Umbral (Threshold Cycle o Ct), que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del fondo y por realizarse al principio de la amplificación, no se ve afectado por todas esas variaciones; con lo que los resultados son completamente reproducibles y mucho más precisos.



La tecnología de la PCR en Tiempo Real se basa en la utilización conjunta de termocicladores con un fluorímetro incorporado y fluoróforos. Estos fluoróforos determinan dos tipos de mecanismos de detección:

- **No específicos.**

Detectan todos los DNA de doble cadena (dsDNA) producidos durante la reacción de amplificación (ya sea producto específico, producto inespecífico o dímeros de *primers*). Es el método estándar y consiste en añadir un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a ésta.

El más utilizado es el **SYBR Green I** que se excita a 497nm y emite a 520nm. Para discriminar si las muestras con curva de amplificación positivas corresponden a productos específicos, o dímeros de *primers* o productos inespecíficos, se suele realizar una curva de desnaturalización ("*melting curve*") al final de la reacción: la reacción se calienta lentamente desde 50°C hasta 95°C monitorizando continuamente la fluorescencia; la temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I. Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose diferentes picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dT/dF$ ) versus la temperatura.

Una posibilidad para evitar este problema es desnaturalizar los productos de la PCR incrementando la temperatura de la muestra a la temperatura de desnaturalización o melting ( $T_m$ ) del producto y se puede observar una drástica reducción de la intensidad de fluorescencia, ya que los productos de PCR inespecíficos (cortos) se desnaturalizan a una temperatura muy inferior que los específicos (largos). Esto permite corregir las curvas de desnaturalización de la contribución de los productos de PCR inespecíficos, incrementando la sensibilidad de la técnica a una copia por reacción.

En estas condiciones el SYBR Green I se puede utilizar para cuantificar e incluso para la detección de mutaciones puntuales (SNPs), ya que incluso los amplicones que difieren en un solo nucleótido, pueden desnaturalizarse a diferentes temperaturas y pueden detectarse por sus picos de desnaturalización (es posible distinguir muestras homocigotas -un solo pico- de muestras heterocigotas -dos picos-).

- **Específicos.**

Estos sistemas de detección son capaces de distinguir entre la secuencia de interés y los dímeros de *primers* o las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de *quenchers* y sondas marcadas con un amplio rango de fluoróforos con diferentes espectros de excitación y emisión.

Un fluoróforo es una molécula que absorbe energía y pasa a un estado excitado; posteriormente, al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia. Los *quenchers* son moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo y la disipan en forma de calor o fluorescencia.

Las dos formas de disipación de la energía de los *quenchers* definen los dos posibles mecanismos de actuación:

**-Quenching colisional:** se produce cuando el fluoróforo está en contacto o muy próximo al *quencher* de tal forma que se produce la transferencia de energía al *quencher*, el cual la disipa en forma de calor.

**-Quenching FRET:** se produce cuando el fluoróforo transfiere la energía al *quencher* (que en este caso puede ser otro fluoróforo) y esta energía es disipada en forma de fluorescencia a una mayor longitud de onda. La eficiencia del proceso depende de la distancia entre el fluoróforo y el *quencher*.

## **2.6.- *Escherichia coli* diarregénicas: Características comunes de virulencia**

Como muchos patógenos intestinales, las *E. coli* diarregénicas, presentan ciertas características de infección como son: colonización de la mucosa intestinal, evasión al sistema inmune, multiplicación y por último daño al hospedero. La característica mas común entre las diferentes *E. coli* diarregénicas, es la capacidad de colonizar la mucosa intestinal, a pesar de la peristalsis y la competencia de nutrientes con la microbiota intestinal (que incluye a otras cepas de *E. coli* comensales).

Las *E.coli* diarregénicas presentan fimbrias de adherencia con antígenos específicos que favorecen la colonización del intestino delgado. Una vez instalado en el intestino, las *E coli* diarregénicas presentan una amplia variedad de estrategias de patogénesis. Por lo general exhiben tres patrones generales que pueden originar cuadros diarreicos: la producción de enterotoxina como en las ETEC y EAEC, la invasión en las EIEC, la adherencia íntima y la señalización con la membrana de la mucosa intestinal en EPEC y EHEC. Sin embargo la interacción con la mucosa intestinal es específica en cada categoría.

La versatilidad del genoma de *E .coli* se debe principalmente a dos características: los factores de virulencia relacionados a plásmidos y las islas de patogenicidad presentes en los cromosomas. Tanto los plásmidos y las islas de patogenicidad presentan clusteres de virulencia que están presente en transposones y en fagos.

En las siguientes secciones se detallará acerca de cada uno de los tipos de *E coli* diarregénicas y su mecanismo de acción.

### **2.6.1.-*Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)**

La *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) pertenece al grupo de cepas productoras de dos clases de toxinas: la toxina termoestable (ST) y la toxina termolábil (LT).

#### **2.6.1.1.-Patogénesis**

Las cepas de ETEC colonizan la superficie de la mucosa intestinal gracias a que presentan factores de colonización y producen enterotoxinas. Pueden expresar un solo tipo de enterotoxina ya sea ST o LT, o incluso ambas; las cuales detallaremos sus características a continuación.

- **Toxinas termolabiles (LT)**

Las toxinas termolábiles de *E. coli* son proteínas oligoméricas que comparten ciertas características similares a la toxina de *Vibrio cholerae* (CT), Presenta una estructura con un 80 % de similaridad, compuesto por un receptor primario de actividad enzimática.

Las toxinas termolábiles se dividen a su vez en dos grandes serogrupos, las del tipo 1(LT-1) y las del tipo (LT-2), las cuales no presentan reacción inmunológica cruzada.

Se ha observado que las de tipo LT-1 presentan actividad tanto en humanos como en animales. Las LT-2 se han encontrado principalmente en animales y es muy raro en seres humanos.

- **Toxinas termoestables (ST)**

A diferencia de las toxinas termolábiles, las toxinas termoestables son más pequeñas, se trata de toxinas monoméricas que contienen múltiples residuos de cisteína unidos por puentes disulfuro, haciéndolos estables al calor. Se conocen dos tipos (STa y STb) que difieren en cuanto a estructura y mecanismo de acción. Los genes de ambos tipos se encuentran en plásmidos y a su vez se han encontrado en transposones.

STa se ha encontrado en *Yersinia enterocolitica* y en *Vibrio cholerae* no O1, existe hasta 50% de similitud con la toxina EAST1 (toxina termoestable tipo 1 de EAEC), en cambio STb solo se ha hallado en ETEC.

- **Factores de colonización**

El mecanismo por el cual las ETEC se adhieren a los enterocitos es mediante antígenos de superficie que se encuentran en las fimbrias, muchas de las cuales se han caracterizado e incluso se han utilizado para identificar cepas de ETEC. A partir de ellas, se ha propuesto una vacuna; pero existe una gran heterogeneidad, la que dificulta su desarrollo.

Las fimbrias de ETEC le confieren cierta especificidad, por ejemplo las cepas que expresan K99, son patógenas para ovejas, cerdos y terneros. Las ETEC que se encuentran en humanos presentan sus propios factores de colonización denominados CFA.

Los CFA puede dividirse en base a sus características morfológicas, de tipo CFA/I son fimbrias rígidas que están compuestas de una sola proteína, los de tipo CFA/II y CFA/IV, son fimbrias más flexibles y compuestas por varios tipos de proteínas. Lo de

CFA/III son fimbrias formadoras de pili. Además los genes de los CFA están codificados en plásmidos, al igual que las enterotoxinas (Nataro y Kaper, 1998).

Se conocen más de 22 factores de colonización cuya nomenclatura se designa como antígeno de superficie de *E coli* (CS). Dentro del amplio rango de CFA, las más comunes corresponden a cepas que incluyen las CFA/1, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5, CS6, CS7, CS14, CS17 y CS21. Estas han sido encontradas en todo el mundo con mayor frecuencia, sin embargo no todas las ETEC podría tener CFA, cerca del 30 al 50% de cepas aisladas no han sido detectadas. (Qadri *et al*, 2005)

### **2.6.1.2. Epidemiología**

Las cepas de ETEC se han encontrado asociadas principalmente a dos síndromes clínicos: diarreas en recién nacidos de países en desarrollo y la diarrea del viajero.

Los patrones epidemiológicos de una infección por ETEC están determinados en parte por algunos factores:

-La inmunidad a la infección por ETEC que se desarrolla en individuos expuestos. La presencia de pacientes asintomáticos, es decir que presentan la infección pero no desarrollan la enfermedad y por último la infección requiere de una alta dosis, se ha estimado como mínimo  $10^8$  células, pero en infantes y ancianos el número es menor.

-En algunas zonas endémicas en el mundo la presencia de las infecciones por ETEC son extremadamente persistentes. El porcentaje de casos en infantes varía entre 10 al 30% de diarrea esporádica, sobre todo en menores de dos años. En Bangladesh es la causa más común de diarrea en niños de 0 a los 2 años con cerca del 18% de las diarreas.

La incidencia de las infecciones por ETEC en países en desarrollo disminuye después de los 5 años hasta los 15 años. Nuevamente se incrementa en individuos por encima de 15 años, observándose cerca del 25% de infecciones en adultos.

El vehículo más frecuente de infección por ETEC, como muchas enfermedades gastrointestinales, es la ingesta de agua y alimentos contaminados. En áreas endémicas, donde las condiciones sanitarias son inadecuadas, se ha demostrado que existe un alto índice de infección. La contaminación fecal de alimentos y aguas es la principal razón de la alta incidencia en los países en desarrollo, sumado a la estacionalidad, sobretodo en los meses cálidos y húmedos; donde la multiplicación por ETEC es más eficiente. No se ha demostrado la infección de persona a persona en estudios de pacientes infectados con ETEC.

La transmisión de ETEC en productos procesados es menos común pero se ha documentado. En 1977 Salk *et al* realizó 240 aislamientos de *E. coli* a partir de alimentos de origen animal. Similares resultados se ha obtenido en Brasil donde de un total 1200 *E coli* aisladas a partir de hamburguesas y salsas, 1.5% corresponden a ETEC (Qadri *et al*, 2005).

Estudios en comunidades donde la higiene personal, la educación y en general las condiciones de vida son deficientes, la transmisión se hace persistente. En los viajeros, cerca de 20 al 40% se producen cuadros diarreicos por ETEC por lo que se puede considerar como una de las principales causa de diarrea en todo el mundo. Los fenotipos de ETEC, varían notablemente de país a país. Por ejemplo solo LT es lo que más se ha encontrado en brotes en todo el mundo, en Jamaica, esta toxina está presente en el 50% de los pacientes aislados con diarrea del viajero.

En India el 45% de las diarreas del viajero presentan tanto ST como LT. Los serotipos circulan en el mismo país presentándose tanto en el agua, alimentos y afectando principalmente a niños (Qadri *et al*, 2005).

### **2.6.1.3. - Detección y diagnóstico**

La detección de las ETEC se basa en la presencia de enterotoxinas LT y/o ST. En un principio el método de detección era el empleo del lazo ileocecal de conejo, y que luego fue posteriormente reemplazado por el ensayo del ratón lactante. Sin embargo estos métodos son costosos. Posteriormente se desarrollaron inmunoensayos para la detección de ST, como también los cultivos celulares en células adrenales Y1 u ovarios de hámster chino (CHO) en los cuales se analiza los patrones de adherencia a las células.

Las ETEC fueron uno de los primeros microorganismos patógenos en emplear técnicas de diagnóstico molecular (Nataro y Kaper, 1998), que incluyen el uso de sondas técnicas de PCR.

### **2.6.2.-*Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC)**

*Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) es considerada como una de las principales causas de diarrea infantil en países en desarrollo. Produce una diarrea acuosa que puede presentar vómitos y fiebre. El periodo de incubación varía de 3 a 24 horas en un individuo que ingiere en condiciones experimentales un inóculo de  $10^9$  a  $10^{10}$  UFC. Se cree que la cantidad de bacterias que infecta de manera natural a los niños es mucho menor.



Una vez que la bacteria alcanza la mucosa intestinal, comienza un mecanismo de patogenicidad complejo, que tiene como resultado la producción de diarrea. Los niños menores de dos años son la población infantil con mayor susceptibilidad a la infección y de ellos, la mayor prevalencia se ha observado en lactantes hasta de seis meses. (Nataro y Kaper, 1998).

### **2.6.2.1-Patogénesis**

EPEC induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (por sus iniciales en inglés, attaching and effacing) o adherencia y barrido. La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito. Para fines didácticos el modelo de patogénesis se divide en tres etapas:

- **Adherencia inicial**

La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis y en ella puede distinguir dos fases: la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia entre las células del huésped y las bacterias, esto ocurre debido a que las EPEC presentan los BFP (bundle forming pilus) y el flagelo.

Los BFP son fimbrias que son producidas por 14 genes codificados en el plásmido de virulencia denominado factores de adherencia o EAF. Estos factores permiten que las bacterias se agrupen entre ellas para formar microcolonias. El contacto entre la bacteria y la célula huésped, se relaciona directamente con el flagelo, sin embargo también se ha referido a otros factores como la adhesina íntima o los filamentos cortos de EspA (sistema de secreción tipo III).

- **Inyección de factores y transducción de señales**

Una vez que la bacteria está adherida, inyecta a la célula una serie de proteínas mediante el sistema de secreción tipo III, codificado en el cromosoma de EPEC, dentro de una isla de patogenicidad conocida como locus de eliminación de enterocito o LEE (por las siglas en inglés); el cual contiene los genes efectores del proceso de lesión A/E. (Vidal *et al.* 2007).

- **Contacto íntimo y formación de pedestales**

Es la última etapa de la infección por EPEC y se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula del huésped, así como por la formación de los pedestales de actina.

La unión estrecha se produce gracias a la presencia de una proteína de la membrana externa de la bacteria denominada intimina. Los pedestales se forman por debajo de donde la bacteria está adherida y se componen de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas como la actinina  $\alpha$ , la fimbrina, la miosina, la talina y la ezrina. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y la fisiología normal de la región apical de las células, lo que origina la pérdida de las microvellosidades. (Clarke *et al.*, 2003) (Vidal *et al.* 2007).

### **2.6.2.2.-Epidemiología**

La infección por EPEC es una de las causas más frecuente de diarrea en menores de 2 años en todo el mundo, pero también puede causar diarrea en adultos sanos en altas dosis (de  $10^8$  a  $10^{10}$  UFC), aunque en los niños la dosis al parecer es mucho menor. La transmisión al igual que otras infecciones intestinales es por la vía fecal oral, a través de manos contaminadas o mediante vectores que presentan fomites con las bacterias. En

niños la contaminación más frecuente ocurre cuando llevan objetos sucios a la boca; en adultos la bacteria se transmite a partir de agua o alimentos contaminados, pero no está asociado algún tipo de alimento en particular. Los reservorios de EPEC pueden ser sintomáticos o asintomáticos, los cuales son capaces de transportar la bacteria de un grupo a otro. También se han encontrado en animales cepas cuyo serotipo es semejante a las EPEC, pero que no pertenecen a EPEC que es patógena a los humanos. (Nataro y Kaper, 1998).

Su prevalencia en el mundo es variable. En el Perú se encontró una prevalencia de 7% en niños de 2 a 10 meses de edad en comunidades de bajo nivel socioeconómico en Lima (Ochoa *et al*, 2008). En otros países como México, Chile y Brasil se ha encontrado una prevalencia entre 17 a 19% en niños menores de 2 años

En China se demostró que cepas de EPEC causan diarrea en el 5% de los casos de niños menores de tres años. En Nigeria Okeke *et al* en 2000, solo el 2,1% de los casos de diarrea en niños de áreas rurales. Sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre de las diarreas causadas por EPEC en niños con un cuadro diarreico de aquellos sujetos que son asintomáticos. (Vidal *et al*, 2007).

### **2.6.2.3.- Detección y diagnóstico**

Para el diagnóstico de EPEC se utilizan las siguientes metodologías: serotipificación, ensayo de adherencia con células HEP-2, prueba de FAS (tinción fluorescente para actina) y técnicas de biología molecular.

La prueba estándar para la identificación de EPEC es el ensayo de adherencia sobre células epiteliales HEP-2. Este método permite identificar EPEC dado que las bacterias se agrupan en cúmulos en las células epiteliales en cultivo, dicha disposición se conoce como adherencia localizada.

Las sondas de DNA y los *primers* para PCR se han desarrollado y evaluado para las tres mayores características de EPEC: A/E, plásmido EAF y la ausencia de toxina Shiga. El principal factor es la presencia del *eae* que es el gen que codifica la intimina tanto en las EPEC que son típicas (aquellas que presentan el plásmido EAF) como las atípicas (carecen del plásmido EAF), proteína relacionada a la lesión A/E, aunque este gen no sólo se encuentra en este tipo de *E. coli*, también lo presentan las cepas shigatoxigénicas.

### **2.6.3.-*Escherichia coli* shigatoxigénica (STEC)**

El reconocimiento de las *Escherichia coli* shigatoxigénicas se desarrolló a partir de dos fenómenos importantes; el primero realizado por Riley en 1983, después de llevarse a cabo dos brotes epidemiológicos en Estados Unidos, en los que la enfermedad se caracterizaba por severos dolores y calambres abdominales acompañadas por diarrea acuosa y seguidos por evacuaciones muy sanguinolentas y una fiebre ligera o inexistente; el cuadro se clasificó como colitis hemorrágica (HC) y se asoció a la ingestión de hamburguesas o comidas rápidas mal cocidas. Los coprocultivos practicados a los pacientes redituaron el aislamiento de una cepa hasta entonces rara correspondiente al serotipo 0157:H7.

La segunda observación clave fue efectuada por Kamali *et al* en ese mismo año, quienes reportaron casos esporádicos de síndrome urémico hemolítico (HUS) en los que se detectaba una citotoxina y la presencia de *E coli* productora de citotoxina cuya características se asemejan a la toxina shiga de *Shigella dysenteriae* tipo I y que en otros reportes se conocía como toxina Vero, siendo un factor de virulencia importante entre la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico, responsables del daño renal como intestinal. Posteriormente se determinó que esta toxina es codificada por el bacteriófago *stxΦ* y que más de 100 serotipos diferentes de esta especie podían sintetizarla.

Desafortunadamente, el paralelismo de los trabajos que dieron lugar al descubrimiento generó varias nomenclaturas diferentes para una misma citotoxina: Stx, SLT, toxina Vero, etc, sino también del mismo agente causal: VTEC (de *verotoxigenic E coli*), STEC (de *shigatoxin producing E coli*), SLTEC (*shiga like toxin producing E coli*)

Los términos VTEC y STEC son equivalentes ya que ambos se refieren a cepas de *E coli* productoras de una o demás toxinas de la familia *stx* que confiere patogenicidad, dado a que pueden presentar otros factores de virulencia. Adicionalmente el término *E coli enterohemorrágica (EHEC)* fue acuñado para referirse a aquellas cepas que producen HC, HUS, producen *stx*, lesiones A/E y poseen un plásmido de 60MDa (Garza Velasco *et al*, 2001), por lo que pertenecen al grupo de las STEC, tales como O157: H7.

### **2.6.3.1.-Patogénesis**

Las STEC en general como se mencionó anteriormente, son un grupo amplio de *E. coli* productora de shigatoxina y que incluye la cepa O157:H7, variedad altamente patógena, que además de presentar shigatoxinas (tipo I, tipo II o ambas), posee otras características como: daño de tipo A/E (similar a las EPEC) producido por la presencia del gen *eae* (gen de la intimina), producción de enterohemolisina (gen *ehx*, codificado en el plásmido de 60MDa) y una enzima que podría estar implicada en el aumento de la capacidad de absorción de hierro (Nataro y Kaper, 1998) y la producción de la toxina EAST1 (toxina termoestable 1 de *Escherichia coli* enteroagregativa –EAEC) cuya función es desconocida.

Además presenta otras características como son, el poco crecimiento o la inhibición a 44,5° C siendo atípico en la mayoría de *E coli* (su temperatura de crecimiento óptimo es

de 37 °C), incapacidad para fermentar el sorbitol en 24 horas y reacción negativa para MUG (4-metilumbeliferi β-D-glucurónido).

### **2.6.3.2.-Epidemiología**

De todo el grupo de las STEC, la que tiene mayor importancia epidemiológica es la del serotipo O157:H7, cuyo reservorio principal es el intestino de ganado vacuno, pero también se han encontrado otras STEC en cerdos, cabras, gatos, perros, pollos, entre otros animales.

En general las STEC pueden ser transmitidas por medio de los alimentos y aguas contaminadas, en caso particular de la cepa O157:H7 por alimentos de origen bovino.

En Estados Unidos la ingestión de hamburguesas poco cocidas y carnes crudas es considerada como una causa de brotes epidémicos, también se ha encontrado en otros alimentos como: jugos de manzana sin pasteurizar, embutidos, vegetales crudos (por ejemplo lechuga) y otras carnes como las de ave, porcino, equino y ovino.

Las fuentes de agua como las aguas recreacionales, aguas de pozo, y sistemas de agua municipal también han sido implicadas en brotes. El número mínimo de dosis para la infección por *E.coli* O157:H7 se ha estimado entre 100 a 200 organismos por infección, cuyo número es similar a la de *Shigella*, de persona a persona (vía fecal oral).

Otros serotipos productores de shigatoxinas han sido implicados en el desarrollo de brotes esporádicos siendo los mas comunes los serotipos que incluye O26:H11, O103:H2, O111: NM y O113:H21, que se han reportado en varios países como Japón,

Italia, Alemania, Australia, Estados Unidos, Chile y Argentina encontrándose más frecuente en estos países que la cepa O157:H7.

En el Perú se ha reportado un brote por O157:H7 en niños menores de 4 años en 2001 en el departamento de Tacna, zona que limita con Chile, país fronterizo en el que se presenta anualmente varios casos de dicha etiología (Huapaya *et al*, 2001)

### **2.6.3.3.- Detección y diagnóstico**

El aislamiento de cepas STEC se puede obtener a partir de muestras de diarrea sanguinolentas, así como también de muestras de alimentos y aguas. Las cepas O157:H7 si bien su crecimiento no requiere de la adición de suplementos o de medios muy enriquecidos, se hace difícil distinguirlo de otras cepas de *E. coli*

Para ello se ha desarrollado el agar Mac Conkey sorbitol (SMAC), que es un medio en el cual se ha sustituido la lactosa por el D-sorbitol, que a diferencia de otras cepas no fermenta este carbohidrato.

En muestras de alimentos, la FDA (Food Drug Administration, 2009) sugiere pre enriquecimiento en el medio TSB (Caldo Tripticasa Soya) suplementado con Cefixime, Cefsulodine y Vancomicina esterilizados por filtración. Al medio sólido se le adiciona Cefixime y Telurito, debido a que el SMAC no es muy selectivo en alimentos. Además se emplea un medio que contenga 4-metilumbeliferi  $\beta$ -D-glucuronido (MUG), debido a que la cepa O157:H7 no presenta actividad glucoronidasa.

Alternativamente se puede emplear un Agar Sangre, suplementado con calcio para ver cepas enterohemolíticas. La gran mayoría cepas aisladas presentan actividad  $\alpha$  hemolisina.

Una vez realizadas las pruebas de aislamiento, se realizan pruebas de identificación, para ello se usan métodos inmunoquímicos que incluyen el empleo de anticuerpos adsorbidos a partir de partículas de látex, los cuales están dirigidos contra las shigatoxinas 1 y 2 y el antígeno O157.

Sin embargo se han encontrado cepas que pueden dar reacción positiva con este antígeno, pero sin ser sorbitol negativas. Además se han desarrollado varios métodos de ELISA y *kits* de identificación disponibles comercialmente, así como la también métodos de separación inmunomagnética (IMS).

El empleo de métodos moleculares específicamente de PCR, están diseñados para la detección de cepas productoras de *stx* los cuales son de dos tipos *stx1* y la *stx2*, también se incorporan otros *primers* para *eae*, *ehx*, *uidA* (gen mutado de glucoronidasa) o *fliC* (gen de H7, antígeno flagelar), los cuales tienen una alta sensibilidad y especificidad usando cultivos puros.

La detección se puede realizar sin necesidad de aislar al microorganismo, pero para ello la muestra debe ser preparada previamente ya que se requiere de métodos más sofisticados para impedir el efecto de otros contaminantes.

#### **2.6.4.-*Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)**

##### **2.6.4.1.-Patogénesis**

Esta categoría de *E. coli* se determinó a partir patrones de adherencia al cultivo celular HEP-2, que distaba de lo observado en las EPEC, y fue reportado por *Cravioto et al* en 1979 y cuya patogénesis aun no está bien definida.



Sin embargo en esta cepa se han encontrado algunos factores de virulencia, como la producción de citotoxinas como la EAST1 (Siglas en inglés de toxina termoestable 1 de *E. coli* enteroagregativa), la cual guarda cierta similitud con la toxina ST de las ETEC, además de estructuras como fimbrias que permiten la adherencia denominadas AAF/I y AAF/II, y la formación de biopelículas.

La infección por EAEC produce diarrea mucoide sin sangre, en algunos casos puede producir inflamación y necrosis en la mucosa intestinal.

#### **2.6.4.2.-Epidemiología**

Un número creciente de investigaciones sugiere que existe una asociación de EAEC con diarrea persistente ( $\geq 14$  días), y que se presenta más en países en desarrollo, sobre todo en poblaciones infantiles. En el Perú se han encontrado una prevalencia de 8% (Ochoa, 2006).

#### **2.6.4.3.-Detección y diagnóstico**

El método “gold estándar” para diagnosticar las EAEC es partir de los patrones de adherencia en cultivo celular Hep-2, también se emplean métodos moleculares a partir de sondas de DNA o *primers*.

#### **2.6.5.-*Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

##### **2.6.5.1.- Patogénesis**

Los primeros estudios referidos a *E. coli* enteroinvasivas fueron realizados por Dupont *et al* en 1971. Las EIEC son muy semejantes a *Shigella spp* en cuanto a sus características bioquímicas (son lactosa negativas, lisina descarboxilasa negativas y son no móviles a 37 ° C) como también en sus características genotípicas y patogénicas.

Cuando la infección se hace muy severa, la reacción se manifiesta por una ulceración en la mucosa. Los genes implicados en el proceso de invasión están presentes en un plásmido de 140-MDa que comprende a los genes de *ipa* (genes efectores de las proteínas relacionadas al proceso de invasión). La enfermedad se caracteriza por una diarrea acuosa, que precede a una disentería que contiene moco y sangre. En algunos casos presentan fiebre y la presencia de leucocitos en las heces.

#### **2.6.5.2.- Epidemiología**

Los estudio epidemiológicos suelen confundirse con casos de *Shigella spp*, usualmente los brotes son transmitidos a través de los alimentos y agua contaminadas, también suele ocurrir la transmisión de persona a persona.

#### **2.6.5.3.- Detección y Diagnóstico**

En cuanto a la detección suele haber confusión con *Shigella spp* y de otras cepas no patogénicas. Aunque presenta el perfil de *Escherichia coli*, presenta un perfil genético y fenotípico con características similares a *Shigella spp*. Para ello se desarrolla el test de Sereny, que se correlaciona con la capacidad de las cepas de invadir los tejidos epiteliales.

#### **2.6.6.-*Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC)**

El término de adherencia difusa fue usado inicialmente para un tipo de patrón de adherencia presente en las células Hep-2, diferentes al mostrado por EPEC y EAEC, en el cual no se forman microcolonias (Nataro y Kaper, 1998). Poco se sabe acerca de las

características patológicas de las DAEC y de cómo inducen diarrea, por lo que su etiología es controversial.

El grupo de las DAEC se pueden aislar tanto en personas sanas como en personas con diarrea. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos. El empleo de sondas o *primers* que derivan del fragmento del gen *DaaC*, que codifica a la fimbria F1845 que es una adhesina bacteriana, es una de las técnicas alternativas al empleo de cultivo celular. (Servin *et al*, 2005).

## **2.7.-Presencia de las *Escherichia coli* diarreogénicas en alimentos en el Perú**

Como se ha descrito anteriormente, la infección por *E.coli* diarreogénicas se transmite a través de alimentos, aguas y de personas infectadas con la bacteria. En los alimentos se ha observado que particularmente las cepas que son shigatoxigénicas (STEC) en especial O157, causante del síndrome urémico hemolítico, son las que mas frecuentemente están asociadas a transmisión por alimentos; principalmente por ingesta de carne y derivados, así como productos lácteos y verduras, y su vigilancia es de rutina tanto en laboratorios clínicos como en laboratorios de control de calidad de alimentos.

Sin embargo, los reportes de otras cepas patogénicas son escasos en nuestro medio. El trabajo realizado por León (2003) solo nos ha permitido detectar cepas de O157 H7, pero no se han descrito otras.

El riesgo de contaminación de alimentos por *E. coli* diarreogénica en el Perú es alto, debido a diversos factores ambientales como socioculturales como son: manipuladores de alimentos inexpertos, desconocimiento de buenas prácticas de higiene, manipulación y conservación inadecuada de los alimentos, inadecuada selección de personal

(ausencia de enfermedad o no portador de agentes patógenos), empleo de inadecuadas prácticas de almacenamiento (equipos de refrigeración o congelación inadecuados), además de otros factores como la falta de agua potable, la acumulación de residuos sólidos, la presencia de vectores y animales que transmiten las enfermedades, entre otros.

El cumplimiento de las condiciones higiénico-sanitarias de acuerdo a la Dirección de Salud Ambiental (DIGESA, 1998) no llega al 50% en los puestos de carne, siendo el porcentaje de aceptabilidad mayor al 70%.

### **3.- OBJETIVOS**

#### **-Objetivo General**

- Detectar la presencia de los diferentes tipos de DEC: *E. coli* shigatoxigénica (STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteroagregativa difusa (DAEC), mediante la técnica de PCR Múltiple en tiempo real validada por Guion *et al* 2008 en muestras de carne cruda de vacuno molida y picada; y en productos cárnicos derivados.

#### **-Objetivos Específicos**

- Determinar la prevalencia de los diferentes grupos de *Escherichia coli* diarreogénicas en muestras de carnes crudas de bovino (molida y picada) y en productos cárnicos que se expenden en 6 mercados de Lima Metropolitana.
- Determinar la asociación entre la presencia de cepas patógenas de *E. coli* con las condiciones higienico-sanitarias de los lugares de expendio y comercialización y el número de *E. coli* típicas.

## 4.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1.-MATERIALES

- **Material biológico (Cepas estándar)**

*Escherichia coli* enterotoxigénica: ETEC-H10407, *E. coli* enteropatógena: EPEC 2348/69, *E. coli* enteroagregativa: EAEC-042 y *E. coli* productora de toxina Shiga: STEC-91/8626, *E. coli* enteroinvasiva: EIEC-213 y *E. coli* de adherencia difusa: DAEC-5019 como controles positivos y *E coli* C600 como control negativo.

- **Material de laboratorio**

- Asa de inoculación con anillo de 3mm de alambre de nicrom
- Matraz de Erlenmeyer de 500 y 1000mL
- Micropipetas de 1.0-10 $\mu$ L , 100 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L
- Pipetas bacteriológicas de 1mL
- Pipetas bacteriológicas de 5 mL

- Placas Petri 15 x 100 mm
- Tips para micropipetas 1.0-10 $\mu$ L 100 $\mu$ L y 1000 $\mu$ L
- Tubos de fermentación Durham 75 x 10mm
- Tubos de vidrio de 20x150 mm
- Tubos de vidrio de 150 x 15mm
- Tubos Eppendorf 1.5 mL

- **Equipos**

- Balanza  $\leq$  2Kg con 0.1 gr. sensibilidad
- Baño de agua termostático con agitación de  $44.5 \pm 0.2$  ° C
- Cámara para toma de geles
- Cubeta horizontal para electroforesis Bio Rad para geles de 12.8 x 15 cm.
- Equipo detector Cromo 4 Optical Detector ICycler (MJ Research/Bio-Rad) con software Opticon Monitor para el análisis de fluorescencia.
- Fotodocumentador de geles con cámara Polaroid Gel Cam.
- Fuente de poder para electroforesis, Power Pac 300 Bio Rad
- Homogenizador de cuchilla o similar, con control por reostato (licuadora).
- Incubadora de  $35-37 \pm 0.5$  ° C.
- Microcentrífuga mayor a 15 000 rpm.
- Potenciometro Checker con electrodo reemplazable (Hanna Instruments).
- Termociclador PTC-200 (Bio Rad).

- **Medios y Reactivos**

- Agar Citrato de Simmons
- Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) según Levine
- Agar LIA (Lisina, Hierro, Agar )
- Agar Mac Conkey
- Agar Tripticasa Soja (TSA)
- Agar TSI (hierro, glucosa, sacarosa, lactosa)
- Agua Peptonada
- Bateria de Coloración Gram.
- Bromuro de Etidio (1:10)
- Buffer PCR master Mix 5x (20 mM Tris-HCl -pH 7.4 at 25°C-, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 100 mM KCl)
- Buffer de corrida (TBE 0,5x)
- Caldo EC.



- Caldo Glucosa Tamponado.
- Caldo Lauril Sulfato Triptosa.
- Caldo Triptona.
- Gel de agarosa (2%)
- Papel para medir pH, rango de 6.0 a 8.0
- Phusion Polymerase 5x (Finnzyme ) (Hot-Start DNA Polimerasa , Phusion HF Buffer 5x, Phusion GC buffer, DMSO y 50 mM MgCl<sub>2</sub> )
- *Primers* para *eaeA*, *aggR*, *daaD*, *ipaH*, *stla*, *stlb*, *st*, *stx1*, *stx2* y *It* a concentración de 0,04-0,56µM. (Guion *et al.* 2008)
- Reactivo de Eber
- Reactivo de Kovacs.
- Reactivos para Voges-Proskauer.
- Solución de KCl a 0.1mol/L
- Solución de rojo de metilo.
- SYBR green I (Cambrex Bio Science)
- Trifostatos desoxinucleótidos (dNTP)

## 4.2.-MÉTODOS

### 4.2.1. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA.-

El estudio de investigación es de carácter descriptivo, transversal y observacional y se realizó entre los meses de Junio a Octubre de 2009. Las muestras fueron carne cruda de bovino molida y/o picada y productos cárnicos crudos (chorizos crudos y salchicha de Huacho), por ser los de mayor consumo en la población. Se tomaron 121 muestras de carne cruda y productos cárnicos de 100 gramos cada una, procedentes de 6 mercados populares de Lima metropolitana los cuales fueron:

- Mercado Nuevo Unicachi de Comas
- Mercado Huamantanga de Puente Piedra
- Mercado Ciudad de Dios de San Juan de Miraflores
- Mercado Ramón Castilla de Cercado de Lima
- Mercado La Parada en la Victoria,
- Mercado Ceres y Camal de Yerbateros en Ate Vitarte

El tamaño muestral se determinó de acuerdo a la fórmula para estimar la proporción (Daniel, 1996):

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

n: Tamaño de muestras

Z<sup>2</sup>: 1.96<sup>2</sup> (al 95% de confianza)

p: Proporción de número de muestras de carne y/o productos cárnicos positivas para *Escherichia coli* que en este caso específico es 89% determinado por estudios previos (León, 2003)

q: 1-p este caso 0,11 para *Escherichia coli*

E<sup>2</sup>: 0,15<sup>2</sup> (precisión)

Reemplazando los valores, tenemos:

$$n = \frac{1.96^2 (0,89) (0,11)}{0,15^2}$$

$$\underline{\underline{n = 16,7}}$$

Para una mejor estimación se tomó entre 16 a 20 muestras por mercado, cada muestra corresponde a un lugar de expendio, es decir a un puesto de venta de carne o producto cárnico. La elección de un mercado depende del número de puestos que presenta y de la zona geográfica en que se encuentra, por ejemplo los mercados de Unicachi y Huamantanga pertenecen a dos distritos del Cono Norte, los mercados de La Parada y Ramón Castilla pertenecen a la zona central de Lima; el mercado Ceres y el camal de Yerbateros pertenecen al zona este de Lima y el mercado Ciudad de Dios, a la zona sur.

#### **4.2.2.-MUESTREO Y TRANSPORTE DE LA MUESTRA**

El muestreo se realizó en horas de la mañana (8.00 a 11.00 a.m.), colectándose 100 gramos de muestra en bolsas plásticas de primer uso, que se transportaron en un recipiente con refrigerante para mantener la temperatura interna a 4° C por un máximo de 2 horas; hasta su análisis o almacenamiento en congelación a -15 ° C en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Aguas y Ambientes de la Facultad de Ciencias Biológicas de Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **4.2.3.- ANÁLISIS FISCOQUÍMICO.-**

Se hizo el estudio fisicoquímico a cada muestras, de acuerdo a las especificaciones de la Norma Técnica Peruana NTP 201.055:2008 para Carne y Productos cárnicos (INDECOPI), que establece evaluar las siguientes características: aspecto, color, sabor, consistencia (de carácter organoléptico), pH y estado de conservación para carne cruda (Tabla N° 1).

Se realizó la medición de pH empleando un potenciómetro verificado a 7,00 y a 4,00; para ello la muestra fue homogeneizada en una solución KCl a 0.1 mol/L de acuerdo a la NTP ISO 2917-2005 y se realizó la evaluación del estado de conservación por la presencia de amoníaco, mediante la reacción de Eber (NTP 201.017-1980) .

**Tabla N° 2. Características fisicoquímicas de la carne, según la NTP 201.055:2008**

<b>Parámetro Fisicoquímico</b>	<b>Característica</b>
Aspecto	Marmóreo
Color	Rojo
Sabor	Sui géneris
Consistencia	Firme, elástica
pH	5,5 a 6,4
Reacción de Eber	Negativa

#### **4.2.4. NUMERACIÓN Y AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Escherichia coli* DIARREOGÉNICAS.**

Se efectuó en el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Aguas y Ambientes de la Facultad de Ciencias Biológicas.

Para ello se realizó el método de Numeración de Coliformes Totales, Coliformes Fecales y *Escherichia coli* mediante la técnica de Tubos Múltiples por el Número más probable (NMP), Método 1, complementando con las Pruebas de identificación de IMViC, (ICMSF, 2000). Para la ejecución se procedió de la siguiente manera:

Se tomaron 10 gramos del alimento, el cual fue diluido en 90mL de agua peptonada al 0,1% y homogeneizado en licuadora por un periodo de 2,5 a 3 minutos, a 15000-20000 rpm.

Se dejó reposar el homogeneizado por unos minutos y se tomó de la porción líquida 1mL para hacer las diluciones decimales. Dependiendo de la procedencia del alimento se realizaron hasta 5 diluciones decimales empleando agua peptonada, a partir del homogeneizado. Luego se transfirió 1mL de cada dilución a series de 3 tubos de 16 x 150mm con 10mL de caldo lauril sulfato triptosa que contienen tubos Durham invertidos, para observar la presencia de gas.

Se incubaron los tubos a 35-37 ° C por un periodo de 24 a 48 horas y posteriormente se tomó una asada con un aro de nicron de 3mm de cada tubo positivo (con gas y turbidez) y se inoculó en tubos de 16 x 150mL conteniendo caldo EC para determinar la presencia de coliformes fecales.

Los tubos inoculados se incubaron en baño termostático a una temperatura de 44.5° C por 24 ± 2 horas.

Los tubos que resultaron positivos (con gas y turbidez) fueron registrados y se inoculó una asada de cada tubo positivo en placas con agar Eosina azul de Metileno de Levine (EMB), los que se incubaron a 35° C por 24 ± 2 horas. Se seleccionaron las colonias que presentaron coloración verduzca con brillo metálico o negras y se realizaron las pruebas de identificación bioquímica (IMViC), que incluyeron:

**-Prueba de Voges Proskauer (VP).**- Se inoculó una asada al tubo de caldo glucosa tamponado y se incubó a 35° C por 24± 2 horas. Se adicionó luego 0.6 mL de α naftol y 0.2 mL de 40% KOH, luego se agitó y se dejó hasta la aparición de un anillo púrpura, que es negativo.

**-Prueba de Rojo de metilo (MR).**- Se adicionó 5 gotas de rojo de metilo, si se observa a los pocos segundos un anillo rojo aparece en la parte superior del tubo entonces es positivo.

**-Prueba del Citrato Sódico.**- Se empleó Agar Citrato de Simmons en plano inclinado. Se dejó incubar a 35° C por 48 ± 2 horas. Si se observa una coloración azul significa que es positiva la cepa aislada, siendo negativa para las *Escherichia coli*.

**-Prueba de Indol.**- Se sembró una asada al tubo con caldo triptona e incubó a 35° C por 24± 2 horas. Después de este tiempo se adiciona 0,2-0,3 mL del reactivo de Kovacs. Si la reacción es positiva aparece un anillo rojo magenta durante unos segundos.

Adicionalmente se efectuaron:

**-Prueba de TSI.-** Se sembró por puntura en Agar TSI, y se incubó a 35° C por 24± 2 horas. Los tubos completamente amarillos y que presentan burbujas de gas son característicos de *E coli* y se lee A/A H<sub>2</sub>S- gas +. Tubos con estas características fueron seleccionados.

**-Prueba de LIA.-** Se sembró por puntura en Agar LIA, e incubó a 35° C por 24± 2 horas. Si el tubo es totalmente púrpura es característico de *E coli* y se lee K/K H<sub>2</sub>S-gas +, los que presentaron estas características fueron elegidos como positivos.

El número de *E. coli* /g y fue calculado a partir de las colonias confirmadas en las pruebas bioquímicas.

Posteriormente las cepas aisladas fueron sembradas en una placa de Agar Mac Conkey por medio de la técnica de sembrado por cuadrante e incubadas de 18 a 24 horas, a 35°C y fueron identificadas molecularmente.



#### **4.4.5.- IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS GRUPOS PATOGENICOS DE *Escherichia coli***

##### **- Extracción de DNA de *E. coli*.**

Esta etapa se desarrolló en el Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Cayetano Heredia, en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición.

La extracción se realizó de acuerdo a lo descrito por Guion *et al* en 2008 y Barletta *et al* en 2009, para lo cual se toman 5 colonias típicas de *Escherichia coli* sembradas en Agar Mac Conkey por muestra y se realiza un pool, teniendo cuidado de no tomar el medio de cultivo. Se mezclan las colonias y se colocan en un tubo de Eppendorf con 100 µL de agua para PCR Finnzyme, libre de endonucleasas.

Luego el tubo fue sometido a ebullición a 100° C por 5 minutos, para la extracción del DNA. Luego, se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm por 15 minutos.

Se tomó 50µL del sobrenadante y se llevó a temperatura de -20° C para su conservación y posterior uso.

##### **- PCR Multiplex en Tiempo Real**

Se empleó una alícuota de 2 µL del lisado, que es usada como DNA molde y se le adicionó 23 µL de la mezcla maestra de PCR (Ver en la tabla N°3) que contiene 0,5 U de la enzima Phusion polymerase (Hot-Start DNA Polimerasa, Finnzyme), Phusion buffer con 200µM de Trifostatos desoxinucleósidos, 4 mM MgCl<sub>2</sub> y los *primers* previamente validados (Guion *et al*, 2008, Tabla N° 4). Luego se adicionó el agente SYBR green I, fluorocromo para el DNA. Esta técnica de PCR permite detectar hasta 8 genes de virulencia presentes en las *Escherichia coli* diarreogénicas en una sola reacción, los que se diferencian por su temperatura de denaturación (Melting temperatura, ver en la tabla N°5) y la fluorescencia emitida por el SYBR green.

Se pueden identificar los productos formados, los que son graficados mediante el software Opticon Monitor (Guion *et al*, 2008) como picos de fluorescencia (Figura N°1) después de 25 ciclos.

**Tabla N° 3. Preparación de la mezcla maestra para PCR**

Reactivo	[STOCK inicial uM]	Concentración Final [uM] Después de PCR	Cantidad por 25ul
PCR wáter	-	-	9,77
5X buffer	-	1X	5,00
50mM MgCl <sub>2</sub>	-	4mM	2,00
dNTPs	-	200uM	0,50
<i>stx1</i> F	25	0,120	0,12
<i>stx1</i> R	25	0,120	0,12
<i>stx2</i> F	25	0,080	0,08
<i>stx2</i> R	25	0,080	0,08
<i>st1a</i> F	25	0,260	0,26
<i>st1b</i> F	25	0,260	0,26
<i>st</i> universal R	25	0,260	0,26
<i>lt</i> F	25	0,360	0,36
<i>lt</i> R	25	0,360	0,36
<i>eaeA</i> F	25	0,560	0,56
<i>eaeA</i> R	25	0,560	0,56
<i>ipaH</i> F	25	0,040	0,04
<i>ipaH</i> R	25	0,040	0,04
<i>daaD</i> F	25	0,500	0,50
<i>daaD</i> R	25	0,500	0,50
<i>aggR</i> F	25	0,440	0,44
<i>aggR</i> R	25	0,440	0,44

SYBR Green	1:100	1X	0,25
Fluoresceína	1	10nM	0,25
Enzima (Phusion polymerase)	2U/ul	0,5	0,25
Volumen total de reactivos	-	-	23,00
Muestra de <b>DNA</b>	-	-	2,00

\* F Forward; R reverse.

**Tabla N° 4. Primers empleados para PCR Múltiplex en tiempo real para detectar genes de cepas de *E. coli* diarreogénicas (Según Guion *et al*; 2008)**

Gen	Orientación (*)	Secuencia <i>primer</i>	Tamaño de Amplicón (pb)	Temperatura de Fusión (T <sub>m</sub> ) del amplicón (°C)
<i>eaeA</i>	F	ATGCTTAGTGCTGGTTTAGG	248	83.4
	R	GCCTTCATCATTTTCGCTTTC		
<i>aggR</i>	F	CGAAAAAGAGATTATAAAATTAAC	100	77.2
	R	GCTTCTTCTTTTGTGAT		
<i>daaD</i>	F	TGAACGGGAGTATAAGGAAGATG	444	93.2
	R	GTCCGCCATCACATCAAAA		
<i>ipaH</i>	F	GTTCCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC	619	90.9
	R	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
<i>Stla</i>	F	TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAA	159	80.6
<i>Stlb</i>	F	TGCTAAACCAGTAGAGTCTTCAAAA	138	
<i>St(**)</i>	R	GCAGGATTACAACACAATTCACAGCAG		
<i>Stx1</i>	F	CTGGATTTAATGTCGCATAGTG	150	87
	R	AGAACGCCCACTGAGATCATC		
<i>Stx2</i>	F	GCGACTGTCTGAACTGCTCC	255	89.1
	R	TCGCCAGTTATCTGACATTCTG		
<i>Lt</i>	F	TCTCTATGTGCATACGGAGC	322	85.8
	R	CCATACTACTGATTGCCGCAAT		

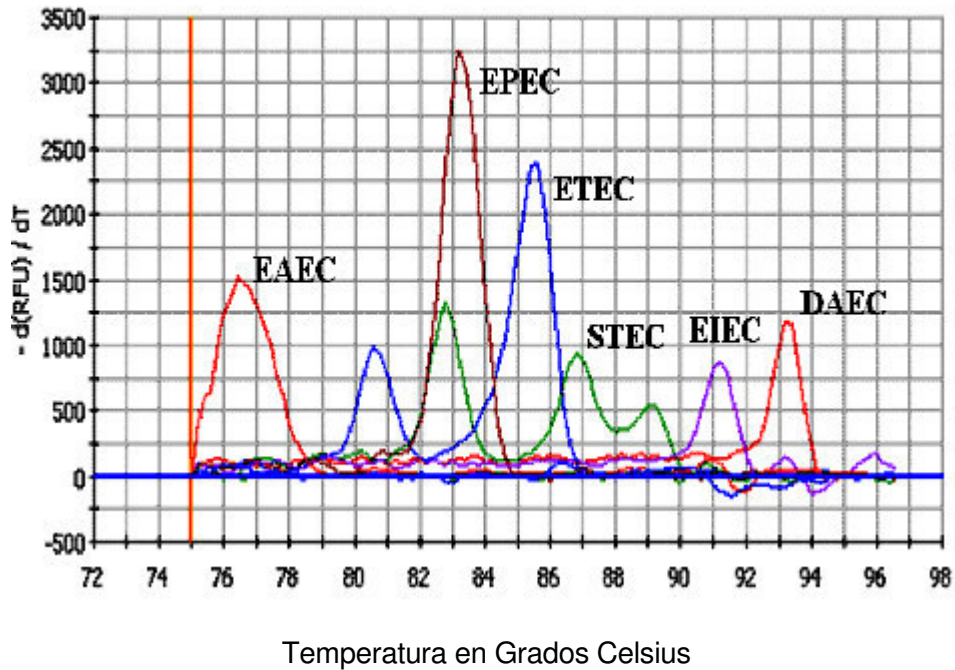
\*F Forward; R reverse

\*\* *St Primer* universal para *Stla* y *Stlb*, ambos genes presentan la misma secuencia, solo varían en la conformación estructural de las subunidades a y b

**Tabla N° 5. Temperatura de denaturación de los genes de Cepas control empleadas en PCR Múltiplex en tiempo real\***

DEC <sup>a</sup>	Cepa <sup>b</sup>	Gen	Temperatura de denaturación (T <sub>m</sub> )	
			Promedio (°C)	DS (desviación estandar)
EAEC	42	<i>aggR</i>	77,07	0,68
ETEC	H10407	<i>st</i>	81,45	0,27
		<i>lt</i>	85,88	0,34
EPEC	2348/69	<i>eaeA</i>	83,93	0,31
STEC	91-8026	<i>eaeA</i>	83,83	0,34
		<i>stx1</i>	87,37	0,32
		<i>stx2</i>	89,65	0,33
EIEC	213	<i>ipaH</i>	91,54	0,26
DAEC	6L33	<i>daaD</i>	93,81	0,4

\*Modificado de Guion *et al.* 2008; <sup>a</sup> DEC, *E. coli* diarreogénicas; <sup>b</sup> Cepas empleadas como controles para el PCR en tiempo real.



**Figura N° 1.** PCR múltiplex en tiempo real para *E. coli* diarregénicas: Picos de fluorescencia generados en una curva de denaturación, correspondientes a cada gen amplificado: EAEC: *E. coli* enteroagregativa (*aggR*); ETEC: *E. coli* enterotoxigénica (*st* y/o *lt*); EPEC: *E. coli* enteropatogénica (*eaeA*); STEC: *E. coli* shigatoxigénicas (*eaeA*, *stx1*, *stx2*); EIEC: *E. coli* enteroinvasiva (*ipaH*) y DAEC: *E. coli* de adherencia difusa (*daaD*).

- **Condiciones de PCR Múltiplex en tiempo real**

Cada ensayo contenía *primers* previamente validados (Guion *et al*, 2008); enzima Phusion (Finnzyme) de alta fidelidad; buffer Phusion (1X); desoxiribonucleótidos trifosfatados, DNTp (200uM); MgCl<sub>2</sub> (4mM); SYBR Green (1x) (Cambrex Bio Science) y Fluoresceína (10nM).

El proceso incluyó una denaturación inicial de 98° C por 30 s. El protocolo estableció realizar incubaciones a 98° C por 20s, 60° C por 20s, 72° C por 30 s, 75° C por 10 s. Después de 25 ciclos, se programó una curva de denaturación (*melting curve*) con un recambio de 2,5° C/s entre 73° C y 95° C, con una captura de la señal de fluorescencia cada 0.2° C.

#### **4.4.6.- Análisis de las condiciones higiénico-sanitarias.**

Se empleó una ficha de inspección higiénico-sanitaria en las que se consideraba las condiciones de expendio. Las variables que se evaluaron fueron: lugar del puesto de venta, mostrador de expendio, utensilios utilizados, agua y desagüe, manejo de los residuos sólidos, presencia de vectores y de animales domésticos, manipuladores, aplicación de medidas de protección y conservación de las carnes. Se tomó como base las fichas utilizadas por la Dirección General de Salud Ambiental, cuya valoración total del cumplimiento del 100% de los requerimientos mínimos era de 64 puntos.

Posteriormente las fichas fueron analizadas con el paquete estadístico SPSS 17.0 para determinar el porcentaje de *Escherichia coli* diarreogénicas con respecto a cada tipo de alimento. Se determinó los OR (*Odds ratio*) para la asociación entre el NMP/g de *Escherichia coli* típicas, con las condiciones higiénicas sanitarias y la presencia de *Escherichia coli* diarreogénicas (León, 2003).

## **5. RESULTADOS**

Se analizaron 121 muestras: 57 de carne molida, 43 de carne picada y 21 de embutidos. 109 muestras fueron extraídas de 6 mercados y un camal; y 12 muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Agua y Ambientes de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

### **5.1.-ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LAS MUESTRAS.**

La evaluación de las muestras se realizó de acuerdo a los criterios establecidos por la NTP 201.055:2008, se encontró que el 80% de las características correspondían a las de carne fresca.

El pH de las muestras osciló entre 4.9 y 7.3, y el 20% estuvo fuera del rango aceptable. Respecto a la producción de amonio (reacción de Eber), todas las muestras fueron negativas. (Ver en el anexo N°3)

La evaluación de las características físico-químicas de los productos evaluados no fue significativa para evidenciar presencia de alteración o deterioro.

### **5.2.-NUMERACIÓN y AISLAMIENTO DE CEPAS DE *E. coli* DIARREOGÉNICAS.-**

De las 121 muestras evaluadas, el 92,6% (112) presentaron *Escherichia coli*. El 9,9% (9) presentó conformidad con los criterios microbiológicos establecidos por la Norma Técnica Sanitaria 071 de DIGESA (< 50 NMP/g. Ver los resultados en el anexo N° 3).

### **5.3.-IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS GRUPOS PATOGENICOS DE *E. coli*.-**

De las muestras positivas (112), se aislaron y analizaron en promedio 7 colonias por muestra, obteniéndose un total de 783 cepas. Solo 7 (5,78%) muestras fueron positivas para DEC, 4 (3,30%) pertenecen al grupo *E. coli* enteropatógena (EPEC) y 3 (2,47%), a *E. coli* shigatoxigénicas (STEC).

Las cepas de EPEC se caracterizaron por presentar el gen *eaeA* y las cepas STEC presentaron los siguientes genes: una *stx1* y *stx2*, otra *stx1* y la última *stx1* y *eaeA*. Las muestras positivas se obtuvieron de carne molida y picada (Tabla N° 6).

Para verificar la presencia de los genes en las cepas positivas, se hizo un PCR convencional empleando *primers* en forma independiente y luego una electroforesis, donde se observó las bandas de amplificación para los genes: *eaeA* (248pb), *stx1* (150 pb) y *stx2* (255pb).

En la PCR múltiple en tiempo real, se evidenció la presencia de cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénica de tipo 1 (STEC) mediante la formación de picos de fluorescencia generados por los genes *eaeA* y *stx1*. El primer pico pertenece a *eaeA* ( $T_m=83,83$  °C) y el segundo a *stx1* ( $T_m=87,37$  °C). En la fotografía de la electroforesis se observó las bandas producidas de los genes *eaeA* y *stx1* respectivamente (Figura 2).



En el caso de la cepa de *E. coli* shigatoxigénica de tipo 2 (STEC) además del pico generado por los genes *stx1*, se evidenció un segundo pico de fluorescencia generado por los genes de *stx2* ( $T_m=89,65$  °C). En la electroforesis, se observó la banda correspondiente a *stx2* (Figura 3).

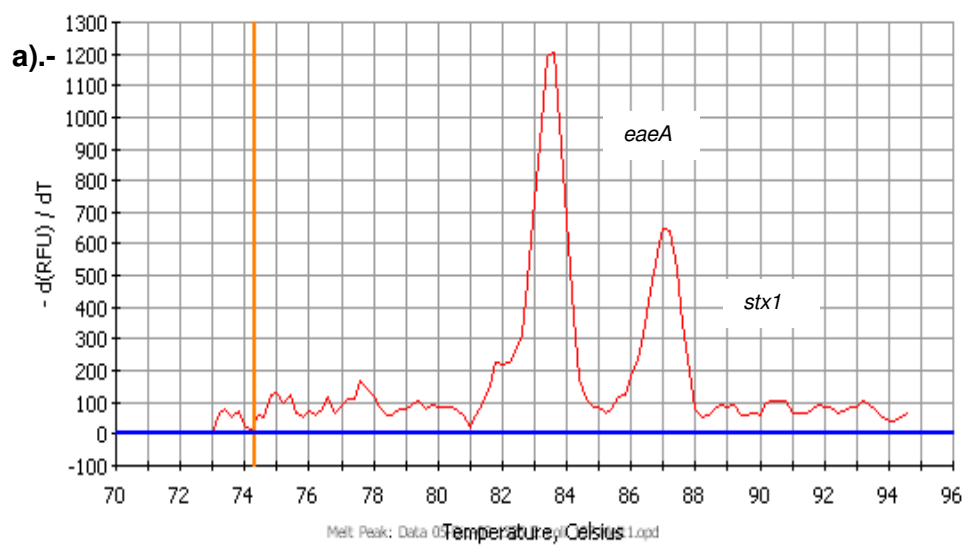
En las cepas de *E coli* enteropatógenicas (EPEC) sólo se observó un pico característico de fluorescencia generado por el gen *eeA* ( $T_m=83,93$  °C) y la banda característica en electroforesis (Figura 4).

No se encontraron otros tipos de *Escherichia coli* diarreogénicas.

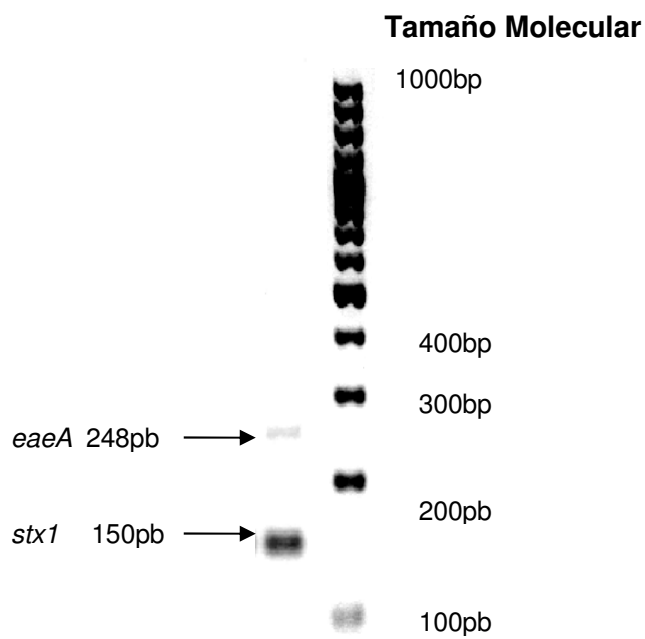
**Tabla Nº 6: Muestras positivas de *Escherichia coli* diarreogénicas**

*Código	Tipo de muestra	Procedencia	NMP/g de <i>E. coli</i> típicas	Nº Colonias que se analizaron	Resultado PCR
PF1018	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	$150 \times 10^3$	9	STEC <i>stx1</i> , <i>stx2</i>
PF3004	Carne molida	Mercado Caquetá-Rimac	$15 \times 10^3$	12	EPEC <i>eeA</i>
PF3010	Carne molida	Mercado Caquetá-Rimac	930	3	EPEC <i>eeA</i>
PF3012	Carne picada	Mercado Caquetá-Rimac	$43 \times 10^3$	12	EPEC <i>eeA</i>
PF5021	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	$15 \times 10^3$	2	STEC <i>eeA</i> <i>stx1</i>
PF5022	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	$7,5 \times 10^3$	3	STEC <i>stx1</i>
PF1035	Carne picada	Otros *	$1,5 \times 10^3$	9	EPEC <i>eeA</i>

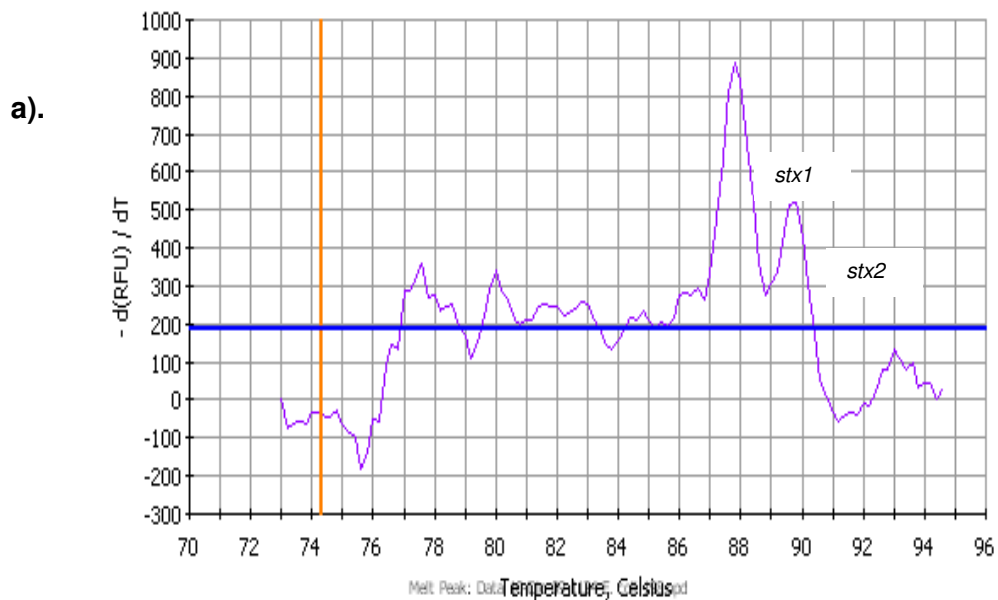
\* La muestra ha sido proporcionada por el Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Aguas y Ambientes y se asignó ese código.



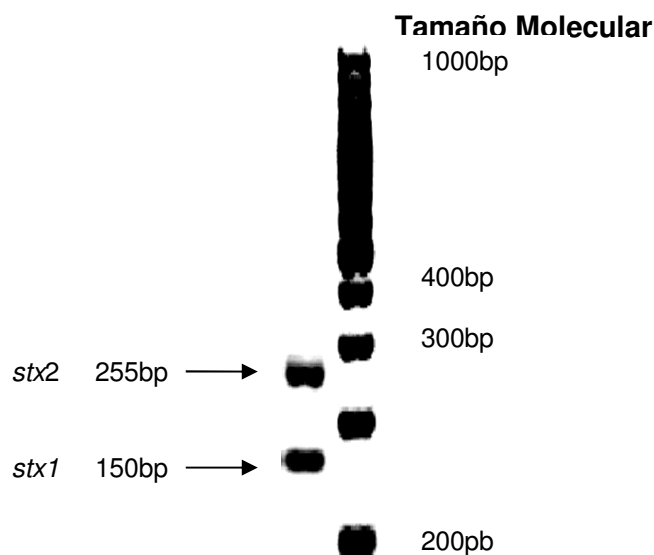
b).-STEC *stx1 eaeA*



**Figura N° 2.** a) Picos de fluorescencia generados por los genes *eaeA* y *stx1* en el PCR múltiplex en tiempo real, lo que nos indican la presencia de cepas de *Escherichia coli* shigatoxigénica de tipo 1 (STEC). El primer pico pertenece al gen *eaeA* (248pb y  $T_m = 83,83$  °C) y el segundo a *stx1* (150bp y  $T_m = 87,37$  °C). b) Electroforesis de los genes *eaeA* y *stx1* respectivamente (Realizado en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición del Instituto Alexander von Humboldt-UPCH).

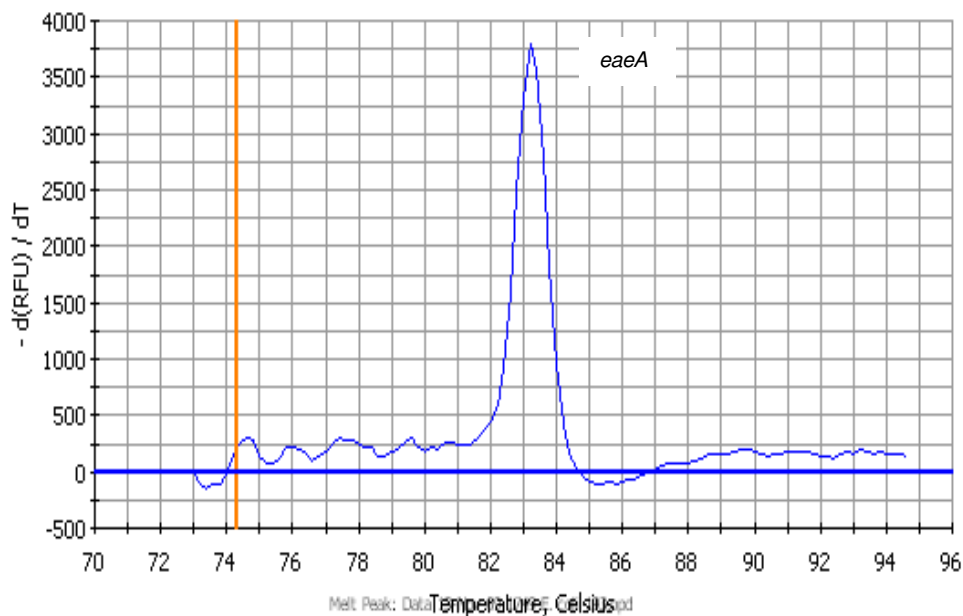


b).-STEC *stx1*, *stx2*

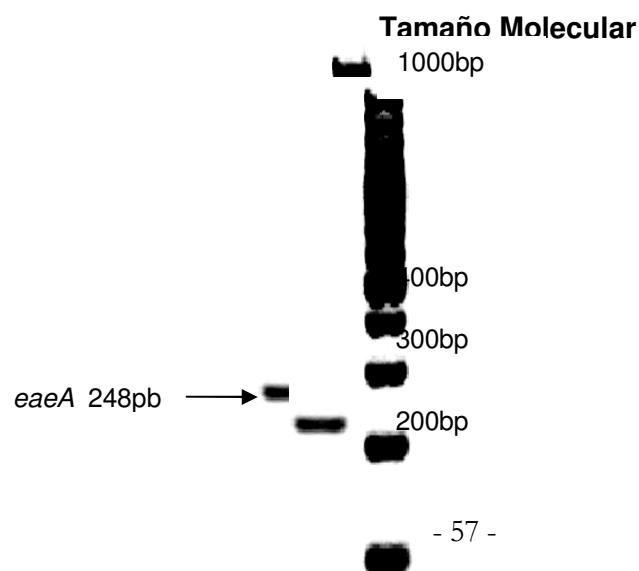


**Figura Nº 3:** a) Picos de fluorescencia generados por *stx1* y *stx2*, lo que nos indica la presencia de una STEC que presenta las dos shigatoxinas. El primer pico corresponde a *stx1* (150pb,  $T_m=87,37$  °C) y el segundo a *stx2* (255pb,  $T_m=89,65$  °C). b) Electroforesis de los genes *stx1* y *stx2* respectivamente. (Realizado en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición del Instituto Alexander von Humboldt-UPCH)

a)



b).- EPEC *eaeA*



**Figura N° 4. a)** Pico de fluorescencia generado por el gen *eaeA* ( $T_m = 83,93$  °C) que permiten caracterizar a cepas de *E coli* enteropatógenicas (EPEC). **b)** Electroforesis del gen *eaeA*. (Realizado en el Laboratorio de Enfermedades Entéricas y Nutrición del Instituto Alexander von Humboldt-UPCH).

#### 5.4.- ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES HIGIÉNICO-SANITARIAS.

Durante la toma de muestra se realizó la evaluación del nivel de cumplimiento de las condiciones higiénico-sanitarias de los puestos de expendio, en los 109 puestos y se encontró que el 3,66% (4) cumple con el 75% de las condiciones higiénico-sanitarias evaluadas (Tabla N° 7).

**Tabla N° 7. Puestos de expendio que cumplen los requerimientos mínimos higiénico-sanitarios.**

*Cumplimiento	Puestos	Frecuencia %	Limites de confianza 95%
más de 75% (≥48 puntos)	4	3,66	(35.4%-54.8%)
50%-74% (32-47puntos)	47	43,11	(0.2%-6.5%)
menos 50% (<32 puntos)	58	53,21	(43.4%-62.8%)
Total	109	100,00%	

\*Se tomó como referencia 64 puntos para 100%. (Ver en anexo N°2)

El 53,21% (58) no cumple con las condiciones mínimas (menos del 50%) para su expendio, observándose una asociación significativa entre la presencia de *Escherichia coli* diarreogénicas y las deficientes condiciones higiénico-sanitarias. En estos lugares la probabilidad de encontrar *E. coli* diarreogénicas es de hasta de 4.7 veces (valor de *Odds ratio*) respecto a las que cumplen con las condiciones higiénico-sanitarias, independiente de que la carne sea molida o picada, tal como lo muestra la Tabla N° 8.

**Tabla N° 8: Asociación entre el cumplimiento de requisitos mínimos de expendio y la presencia de *Escherichia coli* diarreogénicas.**

Cumplimiento	N (109)	Muestras de carne positivas con <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas	Frecuencia de contaminación (%)	OR *	Índice de confianza 95%
más de 75%	4	0			
50-75%	47	1	2,1	0.9	(0,8-1,87)
<b>Menos de 50%</b>	<b>58</b>	<b>5</b>	<b>8,6</b>	<b>4,7</b>	<b>(0,53-41,8)</b>

\*OR: *Odds ratio*

Podemos observar que existe una fuerte asociación entre las muestras que presentan un elevado nivel de contaminación de *E. coli* diarreogénicas con las que presentan un número elevado de *E. coli* "típicas" ( $\geq 10^4$  NMP/g). La probabilidad de encontrar una *E. coli* diarreogénica es mayor (3,2 de valor de *Odds ratio*), respecto a las muestras que presentan un número menor de *E. coli* típica. (ver tabla N° 9).

**Tabla N° 9: Asociación entre el Número Mas Probable de *Escherichia coli* y la presencia de *Escherichia coli* diarreogénicas.**

NMP/g	N(121)	Muestras positivas con <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas	Frecuencia de contaminación (%)	OR	Índice de confianza 95%
<b>10<sup>4</sup></b>	<b>38</b>	<b>4</b>	<b>3.3</b>	<b>3,2</b>	<b>(0,6-15,0)</b>
10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	16	2	1.7	2,9	(0,5-16,3)
10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	29	1	0.8	0,5	(0,1-4,5)
<10 <sup>2</sup>	30	0	0	0	0

Respecto al riesgo de contaminación, hemos encontrado diferencias significativas entre las carnes crudas y los embutidos (chorizo crudo y salchicha de Huacho). La contaminación fue mayor en la carne cruda, independiente de su presentación; sea molida o picada (Tabla N° 10).

**Tabla N° 10: Muestras positivas para *E. coli* diarreogénicas por tipo de alimento**

Tipo de alimento	N	Muestras positivas: <i>E. coli</i> diarreogénicas	Porcentaje (%)
<b>Carne molida</b>	57	3	5,17
<b>Carne picada</b>	43	4	9,09
<b>Chorizo crudo</b>	14	0	0
<b>Salchicha de Huacho</b>	7	0	0
<b>Total</b>	121	7	5,78

## **6.-DISCUSIÓN**

En la investigación encontramos que de las 121 muestras analizadas, el 5,78% (7) fueron *E. coli* diarreogénicas, de las cuales el 3,30% (4) eran EPEC y el 2,47% (3) eran STEC; las que fueron detectadas empleando la técnica de PCR múltiplex en tiempo real y fueron verificadas mediante una PCR convencional.

En el 2003, Santana León trabajó con muestras de carne de vacuno, queso fresco y verduras en los mercados de Lima metropolitana y encontró que las cepas predominantes de *E. coli* son STEC, reportando una prevalencia de 12,3%. Realizó la caracterización molecular a 35 muestras que contenían *E. coli* diarreogénicas.



Durante su estudio incluye cepas de EPEC como si fuesen STEC, puesto que detecta únicamente el factor de virulencia *eaeA* y no *stx1* o *stx2* en las muestras. La prevalencia de STEC se evalúa mediante los casos de diarrea, los cuales son poco frecuentes en nuestro medio y normalmente no son detectados.

El número de cepas aisladas (7) en nuestra investigación fue menor, pero del total de muestras analizadas, se identificaron dos STEC: una que presentó los genes *stx1* y *eaeA*, patrones que se asemejan a una *E coli* O157:H7, y otra que tenía los genes *stx1* y *stx2* pero no el gen *eaeA*.

Comparando nuestros resultados con los hallados en países de la región, el número es menor a lo encontrado en países como Argentina donde la prevalencia es alta (400 casos nuevos por año) o en Uruguay donde ocurren entre 10 y 15 casos nuevos al año (Varela *et al*, 2008). La frecuencia elevada se debe principalmente a que estos países son productores de carne y tienen una alta tasa de consumo de carne de res.

El porcentaje de STEC que encontramos fue de 2,47% (3/121) en muestras de carne molida y picada, éste dato es similar al reportado por Varela *et al* (2008) en Uruguay cuyo valor fue 1,8% (4/220).

El 3,3% (4) de las muestras positivas para EPEC, presentaron solo el gen *eaeA*. Este grupo es frecuentemente encontrado como causante de diarreas en niños menores de 3 años en nuestro medio (Ochoa *et al*, 2008) y tiene una prevalencia de 7,8% (38/551), por lo que es posible inferir que un porcentaje importante de infecciones puede transmitirse a través del consumo de carne molida o picada contaminada.

En el estudio realizado por Xia *et al* (2010) en muestras de productos cárnicos durante los años 2002 a 2007, identificaron cepas de STEC y hallaron cepas “atípicas” de EPEC.; por lo que se podría considerar a la carne como una fuente potencial de EPEC. Sin embargo, no podemos descartar que las cepas atípicas sean también STEC, que hayan perdido la capacidad de producir *stx1* o *stx2*; debido a que esta característica es producida por un bacteriófago.

En nuestro trabajo no se encontraron otras DEC, a pesar que en un estudio realizado en Colombia se reportaron cepas positivas en alimentos para EAEC y STEC, lo que sugiere que los alimentos son una de las formas de mayor diseminación en la comunidad (Rúgeles *et al*, 2010).

En otra investigación efectuada por Chomvarin *et al* (2005) se identificaron distintos tipos de cepas diarreogénicas presentes en alimentos cocidos y sin cocer en Khon Kaen, Tailandia, empleando caracterización serológica y PCR múltiple; encontraron 11 cepas DEC positivas de 186 muestras analizadas, no se encontraron factores de virulencia.

Asimismo Yang *et al* (2007) realizaron un estudio comparativo empleando detección molecular y serotipificación. De 137 cepas confirmadas de DEC por la PCR múltiplex en tiempo real, 15 cepas (10,9%) presentaban factores de virulencia y no tenían relación con la serología. Esto nos indica que la detección de DEC por PCR es comparativamente mejor que la detección serológica..

La prueba de PCR múltiplex en tiempo real es ostensiblemente mas rápida, barata (el costo por muestra es menor a los \$2,00) y es de alta sensibilidad y especificidad, comparada con otras pruebas (Guion *et al*, 2008; Rúgeles *et al*, 2010); por lo que su utilización en países como el nuestro es recomendable.

Respecto a los resultados relacionados a las condiciones higiénico-sanitarias de los centros de expendio nos muestran que el 3,6% cumple con el 75% de las condiciones higiénico-sanitarias (según el puntaje obtenido en la calificación de la ficha técnica de inspección, donde puntaje total fue de 64), siendo casi similar en todos lo mercados visitados.

Se observa además, que hay una probabilidad alta de presentar *Escherichia coli* diarreogénicas (de hasta 4,7 veces), en aquellos establecimientos que no cumplen con los requisitos mínimos (menor del 50%), independiente de la forma de la carne (molida o picada), por lo tanto se convierte en un factor preponderante en las infecciones por DEC.

En cuanto a la asociación entre el número más probable (NMP) de *E. coli* típicas frente a la presencia *E. coli* diarreogénicas, se puede observar que en las muestras que

sobrepasan los 10,000 NMP/g, la probabilidad de encontrar *E coli* diarreogénicas es de hasta 3,2 veces más, que en otros productos.

Esto último corrobora lo descrito por León (2003) y coincide con lo establecido por DIGESA- Ministerio de Salud (Resolución Ministerial N° 591-2008-MINSA “Criterios microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad de los alimentos y Bebidas de Consumo Humano”), en los cuales establece 50 UFC ó NMP/g como máximo permisible para carne cruda picada, molida y productos derivados como embutidos crudos.

Se requiere tomar medidas necesarias (establecer un sistema de seguridad e inocuidad como un plan HACCP, que incluya buenas prácticas de manipulación, de almacenamiento y adecuado saneamiento de ambientes) durante la comercialización de estos productos, para disminuir el riesgo de ocurrencia de este tipo de infecciones.

## 7.-CONCLUSIONES

1.- Existe una prevalencia de *E. coli* diarreogénicas del 5,78% (7), de la cual el 3,31% (4) corresponde al tipo EPEC (*E. coli* enteropatógena) y el 2,47% (3) a *E. coli* shigatoxigénicas (STEC), en muestras de carne cruda y productos derivados en los seis mercados estudiados.

2. No se encontraron otros tipos de *E. coli* diarreogénicas.

3. De las cepas de *E. coli* enteropatógena (EPEC) que se aislaron todas presentaron el gen *eaeA*, mientras que las cepas de *E. coli* shigatoxigénicas (STEC) (3), una presentó los genes para *stx1* y *stx2*, otra los genes *eaeA* y *stx1* y la tercera sólo el gen *stx1*.

3.-La identificación molecular de las cepas empleando la metodología de PCR múltiple en Tiempo real validada, demostró ser eficaz para la identificación de cepas de *E. coli* diarreogénicas; por lo que es recomendable su uso en países en vías de desarrollo.

4.-Los productos cárnicos que presentaron *E. coli* diarreogénicas no mostraron ninguna alteración fisicoquímica.

5.-El riesgo de contaminación por consumo de carne cruda con *E. coli* diarreogénica es mayor en comparación al consumo de productos cárnicos procesados (embutidos).

6. Existe asociación entre las deficientes condiciones sanitarias, el número de *Escherichia coli* típicas ( $> 10^4$  NMP/g) y la presencia de *Escherichia coli* diarreogénicas.

7.- La probabilidad de encontrar una cepa de *Escherichia coli* diarreogénicas en establecimientos que no cumplen con las condiciones higiénico-sanitarias es elevada (hasta 4,7 veces) respecto a aquellas que cumplen con las condiciones higiénico-sanitarias.

## 8.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS M. y MOSS M., *Microbiología de los Alimentos*. 1era edición inglesa. Trad. Ramis Zaragoza-España. Edit. Acribia S.A. 1995. 478 p.
- BARLETTA F., OCHOA T., ECKER L., GIL A., LANATA C., CLEARY T., Validation of a five-colony pool analysis using Multiplex Real Time PCR for detection of diarrheagenic *E.coli*. *Journal Clinical Microbiology* 2009. 47(6):1915-1917 p. en línea <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/47/6/1915?view=long&pmid=19357211>.
- BLANCO, J., BLANCO M., BLANCO, J. (2002). *Escherichia coli* patógeno para seres humanos y animales. Publicación del Laboratorio de Referencia de *E.coli* de la Universidad de Santiago de Compostela. Lugo, España. Disponible en [www.lugo.usc.es/~ecoli/E.coli2.html](http://www.lugo.usc.es/~ecoli/E.coli2.html)
- BENTLEY R. y MEGANATHAN R. Biosynthesis of Vitamin K (Menaquinone) in Bacteria. *Microbiological reviews*.1982, 46(3):241-280. Disponible <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281544/>
- BLATTNER F., PLUNKETT III G., BLOCH C., PERNA N., BURLAND V., RILEY M., COLLADO-VIDES J., GLASNER J., RODE C., MAYHEW G., GREGOR J., DAVIS N. W, HEATHER A. K., MICHAEL A. G., DEBRA J. R.,

BOB M., YING S. The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* 1997. 277: 1453-1462. Disponible en <http://www.sciencemag.org/>.

- CLARKE S., HAIGH R., FREESTONE P. P. E., WILLIAMS H. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen, *Clinical Microbiology Reviews*. 2003 16(3): 365–378. Disponible en línea en <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/16/3/365>.
- CHOMVARIN C., RATCHTRACHENCHAI, O., CHANTARASUK Y., SRIGULBUTR S., CHAICUMPAR K., NAMWAT, W. y OTIMANUSVANIJ D., Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from food in Khon Kaen, Thailand,. 2005. *Southeast Asian Journal Tropical Medical Public Health* 36 (4) 931-939. Disponible en [www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2005\\_36\\_4/19-3488.pdf](http://www.tm.mahidol.ac.th/seameo/2005_36_4/19-3488.pdf).
- CRAVIOTO, A., R. J. GROSS, S. M. SCOTLAND, Y B. ROWE. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes.1979. *Current Microbiology*. 3:95–99.
- DANIEL, W. (1996). *Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud*. 5a ed. Limusa. México D. F. 878p
- DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD AMBIENTAL (DIGESA-Ministerio de Salud). Investigación de la Presenta de *Escherichia coli* O157:H7 en Productos Cárnicos y Otros Alimentos Expendidos en la Ciudad de Lima. Informe. Lima 1998.
- DIRECCIÓN GENERAL DE SALUD AMBIENTAL (DIGESA-Ministerio de Salud). Resolución Ministerial N° 591-2008-MINSA “Criterios microbiológicos



de Calidad Sanitaria e Inocuidad de los alimentos y Bebidas de Consumo Humano” 2008.

- DUPONT, H. L., FORMAL S. B., HORNICK R. B., SNYDER M. J., LIBONATI J. SHEAHAN P., D. G., LABREC E. H., AND KALAS J. P. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. 1971. *New England Journal of Medicine*. 285:1–9.
- ESPY M. J, UHL J. R, SLOAN L. M., BUCKWALTER S. P., JONES M. F., VETTER E. A., YAO J. D. C., WENGENACK N. L., ROSENBLATT J. E., COCKERILL III F. R., SMITH T. F. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 2006 19 (1) 165–256. Disponible en <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/19/1/165?view=long&pmid=16418529>.
- FOOD DRUG ADMINISTRATION (FDA) Chapter 4<sup>a</sup>  
Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), 2009.  
Disponible en <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070080>.
- GARZA VELASCO R., LAGOS ESCAMILLA L. Y MEJÍA CHÁVEZ A. La importancia clínica de los padecimientos ocasionados por ECEH O157:H7 y su diagnóstico de laboratorio, *Lab -acta*, 13(2): 51-59, 2001. Disponible en <http://Depa.Pquim.Unam.Mx/Bacteriologia/Arti.Htm>.
- GUION C, OCHOA T, WALKER C, BARLETTA F, CLEARY T. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. 2008. *Journal Clinical Microbiology*. ;46(5):1752-7. Disponible en <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/46/5/1752?view=long&pmid=18322059>

- HUAPAYA B., HUGUET J., SUÁREZ V., TORRES Y., MONTOYA Y., SALAZAR E., SAKURAY S., TEJADA C., GAMBIRAZIO C., GÓMEZ J. Primer Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 enterohemorrágica en el Perú. *Revista Médica Experimental* 2001, 18(1):38-39. Disponible en [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342001000100009&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342001000100009&script=sci_arttext)
- INGLEDEW J, POOLE K, The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Reviews*, 1984.48(3):222-271. Disponible en <http://mmlbr.asm.org/cgi/reprint/48/3/222?view=long&pmid=6387427>
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). *Microorganismos de los alimentos 1: Su significado y métodos de enumeración*. (2000). 2a Ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España).
- INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (INDECOPI). NTP ISO 2917-2005 CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS. Medición de pH. Método de referencia. 2da. Edición.
- INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (INDECOPI). NTP 201.055:2008 CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS. Definiciones, clasificación y requisitos de carcasas y carne de bovinos.
- INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE LA PROTECCIÓN DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL (INDECOPI). NTP 201.017:1980 CARNE Y PRODUCTOS CARNICOS. Determinación del estado de conservación. Reacción de Eber.

- LEÓN S. "Prevalencia de *E.coli* 0157:H7 en carne de vacuno, queso fresco y verduras en los Mercados de Lima Metropolitana y Condiciones Higiénico Sanitarias Asociados a su Ocurrencia. 2003".Asesor Alejandro Llanos Cuentas Tesis Magíster Salud Pública. UPCH, LIMA-Perú.
- MADIGAN, M.T., MARTINKO J.M., PARKER J. *Brock Biología de los Microorganismos* (10ª edición). Prentice-Hall International. Madrid. 2004.
- MUNIESA, M. JOFRE, J. Occurrence of phages infecting *Escherichia coli* O157:H7 carrying the *Stx 2* gene in sewage from different countries. *FEMS Microbiology Letters* 2000.183:197-200 disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2000.tb08957.x/pdf>
- NANINGA, N, Morphogenesis of *Escherichia coli*, *Microbiology and Molecular Reviews* 1998, 62 (1):110-129, disponible en <http://mibr.asm.org/cgi/content/abstract/62/1/110>.
- NATARO J. y KAPER J. Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998. 11(1):142–201.
- OCHOA T, BARLETTA F, CONTRERAS C, MERCADO E, New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. 2008. *Transactions of the Real Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102(9):852-856.
- OCHOA T. Diarrea producida por *Escherichia coli*. *Revista Peruana de Enfermedades Infecciosas y Tropicales*. 2006, 5 (2)17-21.
- OCHOA T, RUIZ J, MOLINA M, DEL VALLE L, VARGAS M, GIL A, ECKER L, BARLETTA F, HALL E, CLEARY T, y LANATA C. F. Age-related susceptibility to infection with diarrheogenic *Escherichia coli* among infants from periurban areas in Lima, Peru. *American Journal Tropical. Medicine and Hygiene* 2009 81(2):1694-702.

- OKEKE IN, LAMIKANRA A, STEINRUCK H, KAPER JB. Characterization of *Escherichia coli* strains from cases of childhood diarrhea in provincial southwestern Nigeria. *Journal Clinical Microbiology*. 2000; 38(1):7-12.
- QADRI F, SVENNERHOLM A. M, FARUQUE A. S. G. y SACK B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005,18 (3):465–483
- RAPPELLI P, MADDAU G, MANNU F, COLOMBO MM, FIORI PL, CAPPUCCINELLI P. Development of a set of multiplex PCR assays for the simultaneous identification of enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohemorrhagic and enteroinvasive *Escherichia coli*. 2001. *The new microbiologica: Official Journal of the Italian Society for Medical, and Clinical Microbiology (SIMMOC)*. 24(1):77-83. Disponible resumen en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11209846>.
- RODRIGUEZ ANGELES G., Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. 2002. *Salud Pública de México*, 44, (5):465-474. Disponible en <http://www.insp.mx/salud/index.html>.
- RÚGELES L C, BAI J, MARTÍNEZ A J, VANEGAS M C, GÓMEZ-DUARTE O G Molecular characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from stools samples and food products in Colombia. *International Journal of Food Microbiology* 2010 15; 138(3):282-286. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science>.

- SERVIN A. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*, *Clinical Microbiology Reviews* 200518(2), 264-292 disponible en <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/18/2/264?view=long&pmid>.
- SNYDER, L. and CHAMPNESS, W. *Molecular genetics of bacteria*. 2nd ed. Washington, DC: ASM Press, 2003. 566 p. ISBN. 978-1555812041
- TOMA C., LU Y., HIGA N., NAKASONE N., CHINEN I., BASCHKIER A., RIVAS M., IWANAGA M.. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. 2003 *Journal of Clinical Microbiology*. 41 (6):2669-2671.  
Disponible en <http://jcm.asm.org/cgi/content/full/41/6/2669?view=long&pmid=12791900>.
- VARELA G, CHINEN I, GADEA, P E. MILIWEBSKY, M.I. MOTA, S. GONZÁLEZ, G. GONZÁLEZ, M.J. GUGLIADA, C. C. CARBONARI; G. ALGORTA, M. BERNADÁ, R. SABELLI, L. PARDO, M. RIVAS, F. SCHELOTTO, *Revista Argentina de Microbiología*. 2008. 40(2): 1518-1522, 2008. Detection and characterization of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* from clinical cases and food in Uruguay. Disponible en [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412008000200005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S032575412008000200005&script=sci_arttext).
- VARGAS M, GASCÓN J, GALLARDO F, JIMENEZ DE ANTA MT, VILA J. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. 1998. *Clinical Microbiology and Infection*. 4(12):682-688. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864275>.
- VIDAL J., CANIZÁLEZ-ROMÁN A., GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ J., NAVARRO-GARCÍA F., Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia*

*coli* enteropatógena *Salud Pública de México* 2007. 49 (5), 376-386. Disponible en [http://www.insp.mx/rsp/\\_files/File/2007/Septiembre%20Octubre/7-patogen.pdf](http://www.insp.mx/rsp/_files/File/2007/Septiembre%20Octubre/7-patogen.pdf)

- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), Emerging Food Borne diseases. Mayo 2005. Fact sheet N°125. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/en/>.
  
- XIA X., MENG J., MCDERMOTT P. , AYER S. , BLICKENSTAFF K., TRAN T., ABBOTT J., ZHENG J., Y ZHAO S., Presence and Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Other Potentially Diarrheagenic *E. coli* in Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(6):1709-1717. Disponible en <http://aem.asm.org/cgi/content/abstract/76/6/1709>.
- YANG J., WU F, TSAI J., MU J., LIN L., CHEN K., KUO S., y CHIANG C., Comparison between O Serotyping Method and Multiplex Real-Time PCR To Identify Diarrheagenic *Escherichia coli* in Taiwan. *Journal of Clinical Microbiology* 2007, Vol. 45(11): 3620–3625.

## **ANEXO N ° 1**

### **Protocolo PCR múltiple en tiempo real.**

El sistema de PCR múltiple en tiempo real estandarizado por Guion *et al* en 2008 detecta genes de virulencia de EAEC, ETEC, EPEC, STEC, EIEC y DAEC, basado en la temperatura de denaturación de los productos amplificados (amplicones), que son captados gracias a la fluorescencia emitida por el SYBR Green durante el proceso del PCR.

#### **PROCEDIMIENTO**

- Irradiar con luz ultravioleta los materiales para la preparación del Master mix (tips, pipetas, placa de 96 pozos, etc.) por 15 minutos.
- Preparar el Master mix. Colocar los reactivos en el siguiente orden: agua PCR, buffer, MgCl<sub>2</sub>, DNTPs, sondas, fluoroforos y finalmente la enzima.
- Dispensar 23 uL del Master mix en los pozos de la placa.
- Colocar 2 uL de la muestra de ADN a analizar, además de las muestras control, evitando la formación de burbujas y sellar la placa con la tapa óptica.
- Centrifugar la placa antes de colocar en el termociclador, y programar el software para el análisis de datos de la corrida.

- Una vez culminada la corrida de PCR, almacenar la placa con los amplicones a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta confirmar los resultados.

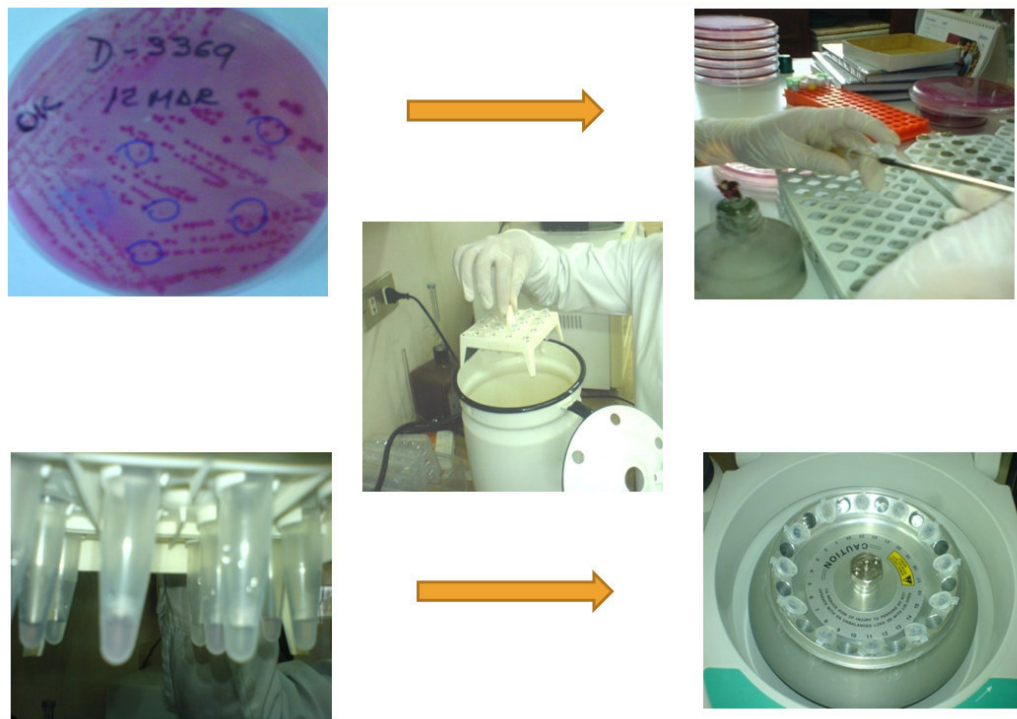


**Figura N°5:** Equipo para hacer el PCR en tiempo real (Biorad)

### **Extracción de DNA**

1. A partir de una placa Mac Conkey, donde se sembró previamente una muestra, se seleccionan 5 colonias lactosa positivas al azar.
2. Colocar  $100\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  PCR en eppendorf de  $1.5\text{mL}$  según sea la cantidad de placas.
3. Por colonia coger un aplicador e introducirlo en el eppendorf, realizando así un pool de las colonias por placa.
4. Hervir por 5 minutos.
5. Incubar a Temperatura ambiente por 15 minutos.
6. Centrifugar por 15 minutos a  $13\,000\text{ rpm}$ .
7. Extraer  $50\mu\text{L}$  y guardar en micro tubos de  $600\mu\text{L}$  a Temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .





**Figura N°6:** Secuencia para la extracción de ADN a partir de placas Mc Conkey.

**ANEXO N ° 2**

## FICHA TÉCNICA DE INSPECCIÓN SANITARIA PARA LUGARES DE EXPENDIO DE CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

Datos generales

Nombre del mercado

Nombre del puesto

1.- Ambiente y enseres

**Puntaje ( )**

Presenta agua potable Si (4)                      No (0)

Exterior e interior del puesto limpio y ordenado Si(4)                      No (0)

Superficie de limpieza

Estado Bueno(4) Regular(2) Malo (0)

Instrumental de faenado limpio y en buen estado Si (4)                      No (0)

Paños, esponjas o secadores limpios y en buen estado Si (4)                      No (0)

Presencia de vectores, roedores y excrementos Si (0)                      No (4)

Disposición correcta de basura (tacho o bolsa)

Sin tacho o bolsa (0)    con tacho y sin tapa (2)    con tacho y tapa (4)

Presenta desagüe Si (4)                      No (0)

2.-Buenas Practicas de manipulación y conservación

Presenta equipos de refrigeración o congelación Si (0)                      No (4)

Las carnes en exhibición (de no contar con equipo de conservación) se encuentran en lugares aislados y ventilados Si (4)                      No (0)

Las carcasas están colgadas Si (4)                      No (0)

Las carcasas están en el piso Si (0)                      No (4)

En otra superficie: Indicar

Tiene el material de limpieza y desinfección separado de los alimentos Si (4)                      No (0)

3.- Personal

Presenta vestimenta adecuada (mascarilla, gorro, guardapolvo, manos sin alhaja) Si (4)                      No (0)

Se lava las manos frecuentemente con jabón o desinfectante Si (4)                      No (0)

Presenta alguna enfermedad herida o daño en las manos Si (0)                      No (4)

Puntaje total 64 cumple al 100%

**ANEXO N°3**

**Resultados Microbiológicos y Físicoquímicos de las Carnes y Productos Cárnicos Analizados  
y su calificación de acuerdo a las Normas de DIGESA**

Código	Muestra	Procedencia	NMP/g	Colonias para PCR	Puntaje Ficha técnica	resultado	Tipo de DAE <sup>1</sup>	pH	Reacción de Eber	Calificación según DIGESA <sup>2</sup>
PF1001	Chorizo crudo	Mercado Unicachi-Comas	20	3	32	Negativo		6,8	Negativo	Conforme
PF1002	Chorizo crudo	Mercado Unicachi-Comas	14	3	34	Negativo		6,9	Negativo	Conforme
PF1003	Carne molida	Mercado Unicachi-Comas	150000	3	24	Negativo		6,1	Negativo	No conforme
PF1004	Carne molida	Mercado Unicachi-Comas	64000	4	24	Negativo		6,6	Negativo	No conforme
PF1005	Carne molida	Mercado Unicachi-Comas	70000	4	26	Negativo		6,6	Negativo	No conforme
PF1006	Carne picada	Mercado Unicachi-Comas	20000	5	26	Negativo		6,1	Negativo	No conforme
PF1007	Chorizo crudo	Mercado Unicachi-Comas	46000	5	34	Negativo		6,6	Negativo	No conforme
PF1010	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	<3	0	60	Negativo		5,4	Negativo	Conforme
PF1012	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	460000	6	32	Negativo		5,2	Negativo	No conforme
PF1013	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	90000	5	34	Negativo		4,9	Negativo	No conforme
PF1014	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	150000	9	28	Negativo		5,1	Negativo	No conforme
PF1015	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	150000	8	32	Negativo		5,2	Negativo	No conforme
PF1016	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	<3	0	36	Negativo		4,9	Negativo	Conforme
PF1017	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	150	5	38	Negativo		5,1	Negativo	No conforme
PF1018	Carne molida	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	150000	9	30	Positivo	STEC stx1, stx2		Negativo	No conforme
PF1019	Chorizo crudo	Mercado Huamantanga-Puente Piedra	<3	0	30	Negativo		5,5	Negativo	Conforme
PF1020	Chorizo crudo	Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	36	5		Negativo				Conforme

PF1021	Chorizo crudo	Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	43	5		Negativo				Conforme
PF1022	Chorizo crudo	Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	75	3		Negativo				No conforme
PF1023	Salchicha de Huacho	Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	430	4		Negativo				No conforme
PF1024	Chorizo crudo	Laboratorio de Control de Calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	4300	3		Negativo				No conforme
PF1025	Chorizo crudo	Laboratorio de control de calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	1100	5		Negativo				No conforme
PF1026	Chorizo crudo	Laboratorio de control de calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	43	4		Negativo				Conforme
PF1027	Chorizo crudo	Laboratorio de control de Calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	93	5		Negativo				No conforme
PF1028	Carne picada	Laboratorio de control de calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	93	5		Negativo				No conforme
PF1029	Carne picada	Laboratorio de control de calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	1500	5		Negativo				No conforme
PF1034	Chorizo crudo	Laboratorio de control de calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	64	5		Negativo				No conforme
PF1035	Carne picada	Laboratorio de control de calidad de Alimentos, Agua Y Ambientes	1500	5		Positivo	<b>EPEC eaeA</b>			No conforme
PF2001	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	6400	8	42	Negativo		5,3		No conforme
PF2002	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	210	11	44	Negativo		5,7		No conforme
PF2003	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	36	3	40	Negativo		6,3		Conforme
PF2004	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	7500	10	32	Negativo		6		No conforme
PF2005	Carne picada	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	230	6	32	Negativo		5,6		No conforme
PF2006	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	140	5	32	Negativo		6,1		No conforme

PF2007	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	23000	12	32	Negativo		6	Negativo	No conforme
PF2008	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	240000	4	34	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF2009	Carne picada	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	28000	4	32	Negativo		5.8	Negativo	No conforme
PF2010	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	3600	5	28	Negativo		6	Negativo	No conforme
PF2011	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	43000	0	30	Negativo		6	Negativo	No conforme
PF2012	Carne picada	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	9300	10	24	Negativo		6.6	Negativo	No conforme
PF2013	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	21000	8	32	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF2014	Carne picada	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	43000	12	42	Negativo		6.4	Negativo	No conforme
PF2015	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	150	10	38	Negativo		6.9	Negativo	No conforme
PF2016	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	21000	6	38	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF2017	Carne picada	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	140	5	30	Negativo		6.7	Negativo	No conforme
PF2018	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	2100	12	42	Negativo		6.4	Negativo	No conforme
PF2019	Carne molida	Mercado Cooperativo Ciudad de Dios San Juan de Miraflores	<3	0	40	Negativo		6.5	Negativo	Conforme
PF3001	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	1500	9	42	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF3002	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	930	10	20	Negativo		6.8	Negativo	No conforme
PF3003	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	1500	8	28	Negativo		6.7	Negativo	No conforme
PF3004	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	15000	12	36	Positivo	EPEC	6.5	Negativo	No conforme
PF3005	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	110000	12	38	Negativo	eeaeA	6.8	Negativo	No conforme
PF3006	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	23000	10	32	Negativo		6.7	Negativo	No conforme

PF3007	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	75000	8	24	Negativo		6.8	Negativo	No conforme
PF3008	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	930	10	16	Negativo		6.8	Negativo	No conforme
PF3009	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	2400	25	40	Negativo		6.6	Negativo	No conforme
PF3010	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	930	3	26	Positivo	EPEC eaeA	6	Negativo	No conforme
PF3011	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	1100	5	30	Negativo		6.7	Negativo	No conforme
PF3012	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	43000	12	24	Positivo	EPEC eaeA	6.9	Negativo	No conforme
PF3013	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	930	5	40	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF3014	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	230	7	26	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF3015	Salchicha de Huacho	Mercado Caqueta-Rimac	430	12	40	Negativo		5.8	Negativo	No conforme
PF3016	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	2400	5	20	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF3017	Carne molida	Mercado Caqueta-Rimac	23000	3	40	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF3018	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	230	5	20	Negativo		6.2	Negativo	No conforme
PF3019	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	230	5	36	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF3020	Carne picada	Mercado Caqueta-Rimac	110000	5	32	Negativo		7.2	Negativo	No conforme
PF4001	Carne molida	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	92	5	34	Negativo		6.1	Negativo	No conforme
PF4002	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	230	5	28	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF4003	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	36	5	32	Negativo		6.2	Negativo	Conforme
PF4004	Carne molida	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	360	1	32	Negativo		5.7	Negativo	No conforme
PF4005	Carne molida	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	380	5	34	Negativo		6.1	Negativo	No conforme
PF4006	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	2100	7	36	Negativo		6	Negativo	No conforme
PF4007	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	930	3	44	Negativo		6.1	Negativo	No conforme
PF4008	Carne molida	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	930	4	40	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF4009	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	92	5	34	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF4010	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	280	6	36	Negativo		5.7	Negativo	No conforme
PF4011	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	290	3	44	Negativo		5.9	Negativo	No conforme
PF4012	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	11000	5	40	Negativo		6.2	Negativo	No conforme
PF4013	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	4600	4	36	Negativo		5.6	Negativo	No conforme

PF4014	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	750	5	40	Negativo		6.7	Negativo	No conforme
PF4016	Carne molida	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	140	5	38	Negativo		5.7	Negativo	No conforme
PF4017	Carne picada	Mercado Ramón Castilla Cercado de Lima	2100	4	42	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF5001	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	<3	13	32	Negativo		6.4	Negativo	Conforme
PF5002	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	210	9	28	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF5003	Carne molida	Mercado La Parada-La Victoria	9300	17	28	Negativo		5.7	Negativo	No conforme
PF5004	Carne molida	Mercado La Parada-La Victoria	150000	13	28	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF5005	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	11000	5	26	Negativo		6.8	Negativo	No conforme
PF5006	Salchicha de Huacho	Mercado La Parada-La Victoria	72	12	28	Negativo		5.5	Negativo	No conforme
PF5007	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	72	12	28	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF5008	Carne molida	Mercado La Parada-La Victoria	15000	5	30	Negativo		6.5	Negativo	No conforme
PF5009	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	30	5	26	Negativo		7.3	Negativo	Conforme
PF5010	Salchicha de Huacho	Mercado La Parada-La Victoria	92	14	28	Negativo		5.7	Negativo	No conforme
PF5011	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	46000	5	26	Negativo		6.6	Negativo	No conforme
PF5019	Carne molida	Mercado La Parada-La Victoria	430	8	34	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF5020	Carne molida	Mercado La Parada-La Victoria	7500	9	26	Negativo		6.2	Negativo	No conforme
PF5021	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	15000	2	26	Positivo	STEC eaeA, stx1	5.9	Negativo	No conforme
PF5022	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	7500	3	28	Positivo	STEC stx1	6.7	Negativo	No conforme
PF5023	Carne molida	Mercado La Parada-La Victoria	92	5	28	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF5024	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	24000	14	26	Negativo		6.1	Negativo	No conforme
PF5025	Carne picada	Mercado La Parada-La Victoria	430	5	30	Negativo		6.2	Negativo	No conforme
PF6001	Carne molida	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	430	8	48	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF6002	Carne picada	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	230	6	42	Negativo		6.3	Negativo	No conforme
PF6003	Chorizo crudo	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	46000	5	46	Negativo		6.7	Negativo	No conforme
PF6004	Carne molida	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	24000	13	46	Negativo		6.3	Negativo	Conforme
PF6005	Salchicha de Huacho	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	<3	0	46	Negativo		5.3	Negativo	No conforme
PF6006	Carne molida	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	21000	12	22	Negativo		6.6	Negativo	No conforme

PF6007	Carne molida	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	11000000	13	26	Negativo	5.7	Negativo	No conforme
PF6008	Carne molida	Camal de Yerbateros Ate Vitarte	110000	6	28	Negativo	6.1	Negativo	No conforme
PF6009	Carne picada	Mercado Ceres Ate Vitarte	110000	5	32	Negativo	5.5	Negativo	No conforme
PF6010	Carne molida	Mercado Ceres Ate Vitarte	110000	5	26	Negativo	6.2	Negativo	No conforme
PF6011	Carne molida	Mercado Ceres Ate Vitarte	930	6	24	Negativo	6.1	Negativo	No conforme
PF6012	Carne picada	Mercado Ceres Ate Vitarte	<3	0	26	Negativo	5.9	Negativo	Conforme
PF6013	Carne picada	Mercado Ceres Ate Vitarte	4600	15	24	Negativo	6	Negativo	No conforme
PF6014	Carne picada	Mercado Ceres Ate Vitarte	92	6	24	Negativo	6.6	Negativo	No conforme
PF6015	Salchicha de Huacho	Mercado Ceres Ate Vitarte	92	5	26	Negativo	5.6	Negativo	No conforme
PF6016	Carne molida	Mercado Ceres Ate Vitarte	930	9	28	Negativo	5.9	Negativo	No conforme
PF6017	Salchicha de Huacho	Mercado Ceres Ate Vitarte	<3	0	28	Negativo	4.6	Negativo	Conforme
PF6018	Carne molida	Mercado Ceres Ate Vitarte	92	5	26	Negativo	6.1	Negativo	No conforme
PF6019	Carne molida	Mercado Ceres Ate Vitarte	15000	5	24	Negativo	5.5	Negativo	No conforme
PF6020	Chorizo crudo	Mercado Ceres Ate Vitarte	<3	0	22	Negativo	6.9	Negativo	Conforme

**1.-DAE: *Escherichia coli* diarreogénica**

**2.-DIGESA “Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los Alimentos y Bebidas” RM N° 615-2003-SA/DM, 30 de mayo del 2003**