

A scanning electron micrograph (SEM) of E. coli bacteria, showing their characteristic rod-like shape and flagella. The image is rendered in shades of blue and purple, with a dark background. The bacteria are scattered across the frame, with some in sharp focus and others blurred in the background.

Universidad Nacional de Asunción
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud
Maestría en Ciencias Biomédicas

Proyecto de tesis:

“*E. coli* en productos cárnicos”

Bq. Natalia Rojas

Alumna de Maestría en Ciencias Biomédicas

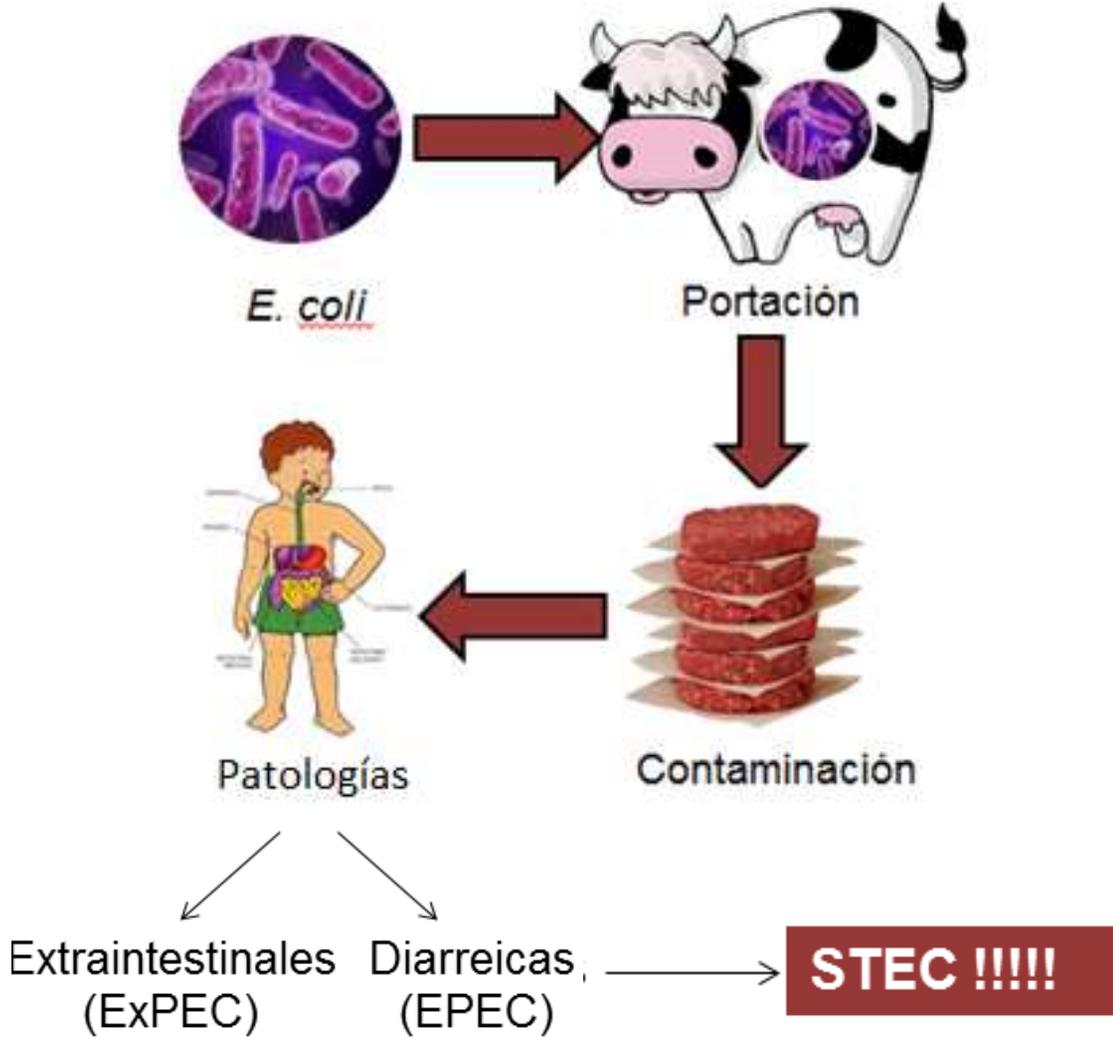
Dra. Rosa Guillén

Tutora de Tesis

**Laboratorio de Biología Molecular y
Biotecnología**

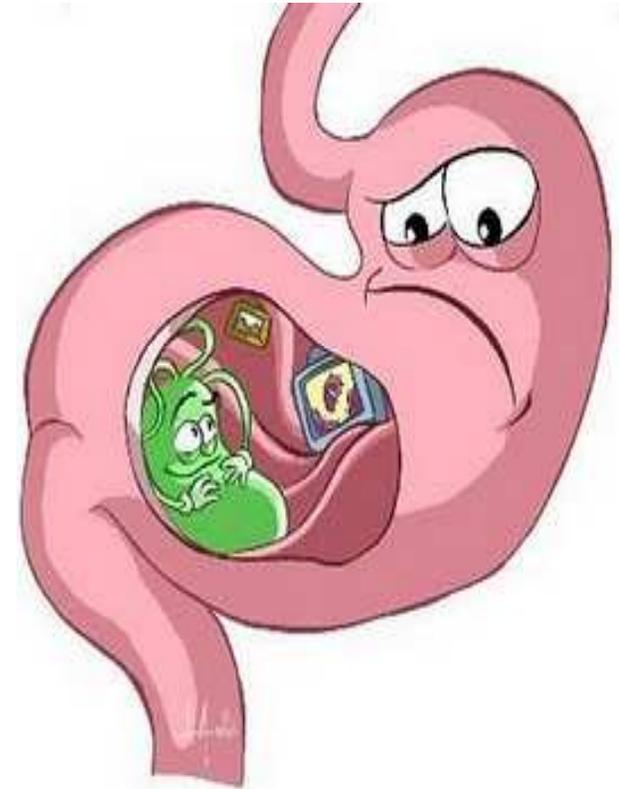
2016

Problemática



Cuadro clínico de infecciones por STEC

- Infecciones asintomáticas
- Diarrea acuosa
- Colitis hemorrágica
- Síndrome urémico hemolítico



Situación en Latinoamérica

En Argentina y otros países de Sudamérica, el SUH es una de las principales causas pediátricas de insuficiencia renal aguda y de insuficiencia renal crónica.

Argentina posee la tasa más alta de SUH a nivel mundial, con 11 casos cada 100.000 niños menores de 5 años.

Situación en Latinoamérica

Estudios revelan que en Latinoamérica existe un alto porcentaje de portación de STEC en ganado bovino.

70% de bovinos portadores de STEC.

Brusa. 2013, Botkin. 2012, Ferreira. 2014, etc.

Situación en Latinoamérica

Estudios han revelado que una de las principales fuentes de transmisión de la STEC a humanos son los productos cárnicos.

En Latinoamérica 25 % de contaminación.
Brusa 2013 y 2015, Nguyen. 2011, etc.

Situación en Paraguay

El Servicio Nacional de Calidad y Salud Animal (SENACSA) es responsable del programa de control de patógenos en la cadena productiva de carne .

No se cuenta aún con datos sobre la presencia de STEC en productos cárnicos, ni con su perfil de virulencia

Situación en Paraguay

EXPORTACIONES PARAGUAYAS			
EN MILES DE DÓLARES			
Rubros	03/11	03/12	Variación interanual
Fibras de algodón	1.042	2.193	110,00%
Semilla de soja	411.036	395.962	-3,70%
Aceites vegetales	58.302	80.801	38,60%
Harinas	96.089	74.373	-22,60%
Cereales	119.359	162.868	36,50%
Carnes	224.550	152.558	-32,10%
Madera	26.095	24.794	-5,00%
Otros*	215.284	195.769	-9,10%
TOTALES	1.151.757	1.089.318	-5,40%

* Productos no tradicionales

Fuente: Banco Central del Paraguay

2011 y 2013. Rechazos de cargamentos por parte de Rusia. Con una pérdida de 937.500 USD

Malas prácticas de higiene



Programa de carnicerías saludables



Objetivo

Conocer la frecuencia y circulación ambiental de bacterias patógenas como la *E. coli* productor de toxina Shiga en carne bovina molida y muestras ambientales en las carnicerías.

¿Por qué se analiza carne molida y no cortes?

- La mayor manipulación de este tipo de producto.
- El tipo de comidas que se realiza con estos productos.
- La manera en que se realiza la cocción

Sistema de clasificación de carnicerías:

B – EVALUACION: Marcar para cada ítem analizado, en el casillero de “Clasificación”, SI, NO o No Aplicable (N.A) según corresponda.

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	N.A
B.1	SITUACIÓN Y CONDICIONES DE LA EDIFICACIÓN			
1.1	Ausencia de basura, objetos en desuso, animales, insectos y roedores, en el área interna y en los alrededores.	4	0	4
1.2	Pisos adecuados:	1	0	1
	1.2.1 No hay deterioro, se han efectuado las reparaciones necesarias, no hay grietas ni agujeros. 1.2.2. Se encuentra en condiciones de limpieza (sin restos de comida, no resbaladizos, sin suciedad)	1	0	1
1.3	Cielo rasos y techos:	1	0	1
	1.3.1. Sin, grietas, pintura descascarada, etc. 1.3.2. Sin suciedad, telas de araña, etc.	1	0	1
1.4	Paredes y divisorias:	1	0	1
	1.4.1. Permanece el acabado liso, azulejado completo sin faltantes, no hay rajaduras ni grietas. 1.4.2. Se encuentran limpias, sin suciedad, materia grasa adherida, manchas, etc	1	0	1
1.5	Puertas y ventanas: 1.5.1. Se encuentran en buen estado de conservación	1	0	1
1.6	Protección contra insectos y roedores: En todas las aberturas telas mosquiteras, cortinas o puertas con cierre a resorte.	4	0	4
1.7	Iluminación: La adecuada según el sector, con protección y de acuerdo a las indicaciones.	1	0	1
1.8	Ventilación: Ambiente y temperatura adecuada, no hay olores desagradables.	1	0	1

Ítem	Descripción	Calificación		
		SI	NO	N.A
B.2	EQUIPOS Y HERRAMIENTAS			
2.1	2.1.1.- Se mantiene el estado de conservación y funcionamiento de artefactos, utensilios y demás elementos.	2	0	2
	2.1.2.- Se encuentran limpios, sin suciedad, sin restos de alimentos u otras materias.	4	0	4
2.2	Utensilios			
	2.2.1.- Se encuentran en buen estado de conservación y en cantidad suficiente.	2	0	2
	2.2.2.- Se encuentran limpios	4	0	4
2.3	Mobiliario			
	2.3.1.- En Cantidad suficiente, ajustado a normativa y en buen estado de conservación.	2	0	2
	2.3.2.- En buen estado de limpieza	4	0	4
2.4	Equipos de refrigeración – congelación	8	0	8
	2.4.1.- En Cantidad suficiente, ajustado a normativa y en buen estado de conservación. Con termómetro.			
	2.4.2.- En buenas condiciones de higiene	8	0	8
2.5	Limpieza y desinfección adecuadas Utiliza detergentes y desinfectantes aprobados	8	0	8
2.6	Colocación de herramientas y equipos en lugar apropiado, en forma ordenada y protegidos de la contaminación	8	0	8
	CB2= Calificación del Bloque 2 TS2= Total de las calificaciones "SI" obtenidas TNA= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas. K2= 50 (Constante del Bloque 2) I 2= 15 Importancia del Bloque 2 Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS2 y TNA 2	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 0 auto;"> $TS2 \times 15$ $CB2 = \frac{\quad}{50 - TNA2}$ </div>		

Ítem	Descripción	CALIFICACION		
		SI	NO	N.A
B.3	PERSONAL EN EL AREA DE PRODUCCIÓN/ MANIPULACIÓN/ VENTA			
3.1	Indumentaria	2	0	2
	3.1.1.- Ajustada a normativa.			
	3.1.2.- Limpia y adecuadamente conservada	8	0	8
3.2	Aseo personal: Se evidencia cumplimiento de normas.	8	0	8
3.3	Hábitos personales: Adecuados y ajustados a las indicaciones del CAA	4	0	4
3.4	Estado de salud: Libretas Sanitarias, ausencia de evidencia de enfermedades	10	0	10
	CB3= Calificación del Bloque 3 TS3= Total de las calificaciones "SI" obtenidas TNA= Total de las calificaciones "No aplicable" obtenidas. K3= 32 (Constante del Bloque 3) I 1= 25 Importancia del Bloque 3 Concluida la Auditoría del presente cuadro, se procederá a resolver la ecuación, agregando a la fórmula el total de TS3 y TNA3	$CB3 = \frac{TS3 \times 25}{32 - TNA3}$		

La puntuación final se obtiene mediante la sumatoria de la calificación de cada bloque:

$$CB1+CB2+CB3$$

Clasificación:

- **Carnicerías de alto riesgo:** son aquellas con una alta probabilidad de vender productos contaminados al consumidor.
- **Carnicerías de mediano riesgo:** son aquellas con una moderada probabilidad de vender productos contaminados al consumidor.
- **Carnicerías de bajo riesgo:** son aquellas con una baja probabilidad de vender productos contaminados al consumidor.

Que buscamos?

``Caracterización del perfil de virulencia de aislados de *Escherichia coli* productores de la toxina shiga (STEC) de materia fecal de ganado bovino y carne molida en el año 2016``

Objetivo general

- Estandarizar una técnica de PCR a tiempo real para la detección de factores de virulencia propios de STEC (*stx1* y *stx2*).
- Caracterizar el perfil de virulencia de aislados STEC de carne molida de diferentes carnicerías minoristas del departamento central en el año 2016.

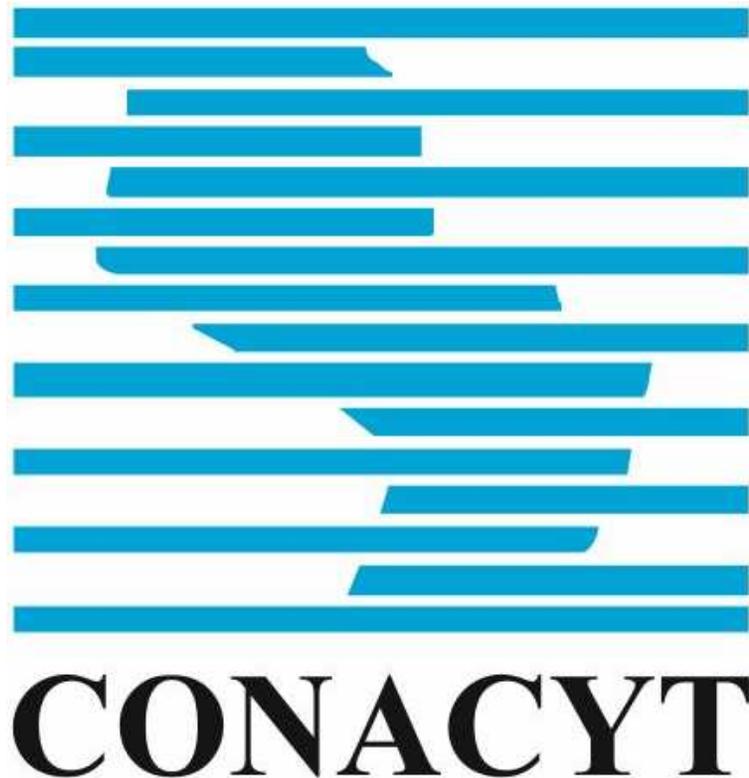
Objetivos específicos

- Analizar la presencia de STEC en carne molida de carnicerías minoristas de la zona del mercado de abasto por PCR a tiempo real.
- Validar los resultados obtenidos por detección directa en carne molida mediante aislamiento microbiológico de STEC y caracterización del perfil de virulencia.

Para que?

- Conocer la situación en Paraguay
- Evaluar de factores de riesgos
- Identificar fallas en buenas prácticas
- Realizar posteriormente intervenciones educativas

Programa Nacional de vinculación de Científicos y Tecnólogos



Estancia en la FCV-UNCPBA

Departamento de Inmunoquímica y Biotecnología

Encargada: Dra. Nora Lía Padola



Aislamiento de *E. coli* a partir de Carne

Cultivo de carne en medio enriquecido



Eliminación de restos de alimentos



Concentración bacteriana



Extracción de ADN

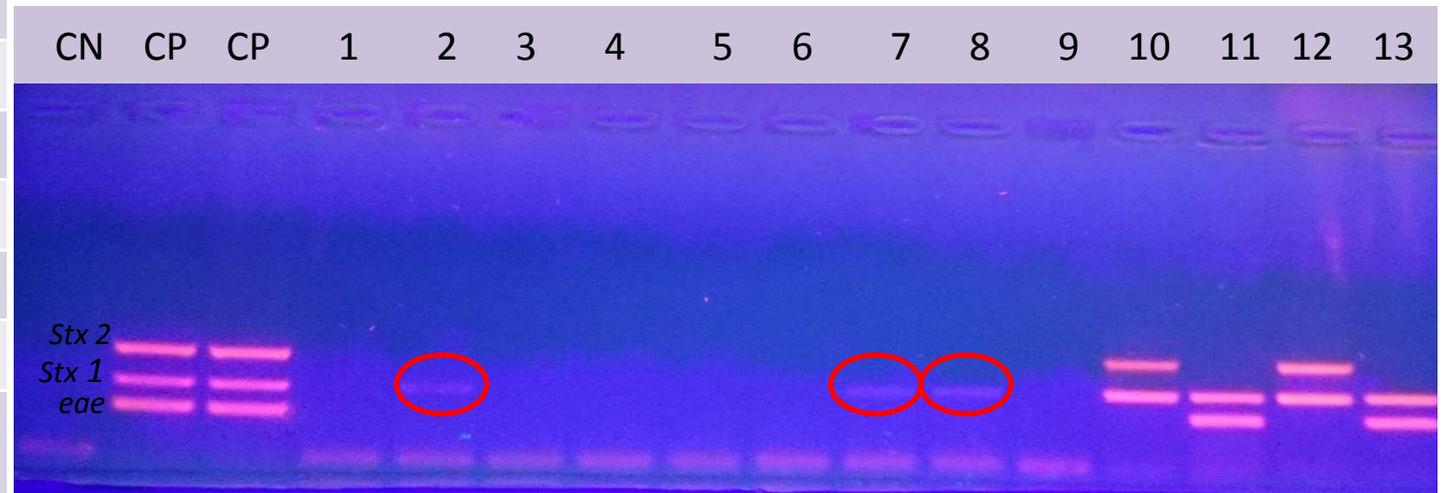


PCR en búsqueda de los genes *stx1*, *stx2*, *eae*

Resultados

Muestra	Resultados
1. Hamburguesa 1	NEGATIVO
2. Hamburguesa 2	POSITIVO (<i>stx1</i>)
3. Hamburguesa 3	NEGATIVO
4. Hamburguesa 4	NEGATIVO
5. Hamburguesa 5	NEGATIVO
6. Molida Carnicería A	NEGATIVO
7. Molida Carnicería B	POSITIVO (<i>stx1</i>)
8. Molida común Super A	POSITIVO (<i>stx1</i>)
9. Molida especial Super A	NEGATIVO
10. O26:H11+ Hamburguesa	POSITIVO
11. O130:H11+ molida	POSITIVO
12. O26:H11 (<i>stx1</i> , <i>stx2</i> , <i>saa</i> , <i>hlyA</i>)	POSITIVO (<i>stx1</i> , <i>stx2</i>)
13. O130:H11 (<i>stx1</i> , <i>eae</i> , <i>hlyA</i>)	POSITIVO (<i>stx1</i> , <i>eae</i>)

Muestra
1. Hamburguesa 1
2. Hamburguesa 2
3. Hamburguesa 3
4. Hamburguesa 4
5. Hamburguesa 5
6. Molida Carnicería A
7. Molida Carnicería B
8. Molida común Super A
9. Molida especial Super A
10. O26:H11+ Hambur.
11. O130:H11+ molida
12. O26:H11
13. O130:H11



De 5 establecimientos analizados 3 tenían a la venta productos cárnicos contaminados con STEC

Lo que queremos hacer



Muestras de carne molida fresca



Análisis microbiológico



Población accesible: Aislados de *E. coli* provenientes de carnicerías del mercado de abasto



Extracción de ADN y estandarización de una técnica de PCR a tiempo real para stx1 y stx 2



Análisis de datos

Agradecimientos

- Equipo de Bacteriología Molecular IICS-UNA
- Equipo de Inmunoquímica y Biotecnología
FCV-UNCPBA
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

GRACIAS

