

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia



“Aislamiento y caracterización de bacterias de la familia enterobacteriaceae y *Staphylococcus spp.* presentes en la carne molida comercializada en supermercados ubicados en el distrito de Miraflores, Lima-Perú: Evidencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y meticilino resistencia”

Tesis para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

Valeria Romina Cortez Sandoval

Bachiller en Medicina Veterinaria y Zootecnia

**LIMA – PERÚ
2017**

A Dios por darme la fuerza para llegar hasta este punto y por darme la vida para lograr mis objetivos, además de su infinito amor y bondad. A mis padres por el apoyo incondicional y por darme ejemplos de constancia y perseverancia en mi superación personal. A mi hermano, por su constante amor, por protegerme, cuidarme y ser un ejemplo a seguir en todos los aspectos de mi vida, y para que se pueda sentir siempre orgulloso. A mis asesores, especialmente a los Drs. Carlos Shiva, y Eduardo Jiménez por el esfuerzo, perseverancia y dedicación para alcanzar los objetivos planteados en un inicio.

AGRADECIMIENTOS

A los profesores, jurados y asesores que con su dedicación, paciencia y consejos fueron de gran apoyo para lograr este gran paso.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UPCH, por brindarme sus instalaciones, indispensables para la ejecución de esta investigación.

ABSTRACT

The aim of the study is to demonstrate the production of β -lactamases of extended spectrum (ESBL) for *enterobacteriaceae*, and methicillin-resistance by *Staphylococcus spp.*, both previously isolated and identified in ground beef sold by supermarkets district of Miraflores.

There were about 50 gr. of ground beef processed from 10 stores of the 5 supermarkets located in the district of Miraflores, the samples were processed in the Laboratory of Nutrition and Food Safety FAVEZ-UPCH. Dilutions for bacterial dissemination in different agars (Mannitol Salt Agar and EMB Agar) were performed by isolating the expected colonies. Then through biochemistry with API 20E® kits *enterobacteriaceae* species were classified, and also those of *Staphylococcus spp.* through coagulase test (Test Coagulase Bactident®). The strains were frozen to reactivate them after the process to realize the testing susceptibility; for *enterobacteriaceae* two methods were used, the first one to determine the suspected ESBL strains (simple diffusion method in agar) and the second one to reaffirm that were effectively ESBL (double disc method).

Of total *enterobacteriaceae* isolated, 11/38 (28.94%) were resistant to antibiotics (CTX, CAZ, CRO, ATM, CPD) by simple diffusion method (considering the strains, suspected of producing BLEE), resulting in a positive double disc method 6/38 (15.79% of the total isolates), to the antibiotics (CTX, CAZ, CRO, ATM, CPD, AMC). Regarding *Staphylococcus spp.*, of all of isolates, 3/22 (13.64%) were methicillin-resistance.

Key words: enterobacteriaceae, ESBL, Staphylococcus spp, methicillin-resistance, ground beef

RESUMEN

El objetivo del estudio es evidenciar la producción de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por enterobacterias, y la meticilino-resistencia por *Staphylococcus* spp., ambos previamente aislados e identificados en la carne molida comercializada por supermercados del distrito de Miraflores.

Se procesaron 50 gr. aprox. de carne molida de 10 tiendas de 5 supermercados ubicados en el distrito de Miraflores, las muestras se procesaron en el Laboratorio de Nutrición e Inocuidad Alimentaria FAVEZ-UPCH. Se realizaron diluciones seriadas para el recuento bacteriano en diferentes agares (Manitol Salado y EMB) aislando las colonias esperadas. Posteriormente a través de la bioquímica con Kits API 20E® se clasificaron las especies de enterobacterias, y en el caso de *Staphylococcus* spp. a través de las pruebas de catalasa, oxidasa y coagulasa (Test Bactident® Coagulase). Las cepas fueron congeladas para reactivarlas después de todo el proceso para realizar las pruebas de susceptibilidad; para las enterobacterias se utilizaron dos métodos, el primero para determinar las cepas sospechosas de producir BLEE (método de difusión simple en agar) y el segundo para confirmar si eran productores de BLEE (método de doble disco).

Del total de enterobacterias aisladas, 11/38 (28.94%) resultaron resistentes a los antibióticos (CTX, CAZ, CRO, ATM, CPD), bajo el método de difusión simple (considerando a las cepas, sospechosas de producir BLEE); resultando positivas al método de doble disco 6/38 (15.79% del total de cepas aisladas), a los antibióticos (CTX, CAZ, CRO, ATM, CPD, AMC). Con respecto a *Staphylococcus* spp., del total de cepas aisladas, 3/22 (13.64%) fueron meticilino-resistentes.

Palabras clave: enterobacterias, BLEE, Staphylococcus spp, meticilino-resistente, carne molida

INTRODUCCIÓN

En la industria de los alimentos cárnicos, la calidad microbiológica de la carne es fundamental para proveer a los consumidores alimentos inocuos y que no afecten a la salud pública; esto es debido a la potencial presencia de microorganismos patógenos para el ser humano (*Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, etc.), los cuales pueden encontrarse en distintos eslabones de la cadena productiva, tanto por contaminación de la carne como por enfermedades de los animales. (CODEX, 2005; SENASA, 2012; FAO, 2007; Food Safety Authority of Ireland, 2014).

En la ganadería el manejo principalmente va dirigido a mantener la calidad de la carne en el animal vivo, en cuanto a conformación, y características organolépticas del tejido muscular que pueden variar por el tipo de manejo que se tenga con los animales en el ante-mortem (CODEX, 2005; SENASA, 2012; FAO, 2007). Cuando los animales desembarcan en el matadero correspondiente, este deberá ejecutar sus funciones bajo el Decreto Supremo N° 015-2012-AG “Reglamento Sanitario del Faenado de Animales de Abasto”. La contaminación de la carne se da en el matadero, a partir del momento en que se desolla al animal y ya no existe la primera barrera de protección, por lo cual las bacterias empiezan a contaminar la carne (CODEX, 2005; SENASA, 2012).

En los siguientes procesos post-desollado quedan las patas y cola aún con piel, lo cual predispone a la contaminación del tejido muscular adyacente; el proceso de evisceración también es un factor predisponente a la contaminación de la carne, pues el contenido de las vísceras puede caer sobre el tejido cárnico (SENASA, 2012).

Los equipos, máquinas e instalaciones son construidos y mantenidos de manera que se reduzca en la mayor medida posible la contaminación de la carne (tanto en el matadero como en las tiendas de los supermercados) y que los trabajadores puedan ejercer su función de forma higiénica. Sin embargo, mientras la carne pase por más procesos, la carga microbiana de los equipos, instalaciones, herramientas y manos de los trabajadores, será mayor sobre la carne. Es por eso que bacterias como *Staphylococcus spp*, y enterobacterias, son indicadores de higiene en toda la cadena productiva (CODEX, 2005; SENASA, 2012; FAO, 2007; Jay *et al.*, 2005). En el caso de la carne molida, se ha demostrado que ésta contiene mayor carga bacteriana que las carnes no trituradas, como los filetes (Jay *et al.*, 2005). Investigaciones en EE.UU encontraron prevalencia positiva a *E. coli* 0157:H7 del 17% sobre un total de 296 muestras de carne molida, mientras en 900 muestras de carne deshuesada no se encontró la cepa (Jay *et al.*, 2005). Debido a esto es que se realizan controles de carga microbiana sobre las manos, equipos e instalaciones, además de asegurar la calidad utilizando agua potable a distintas temperaturas y presiones, controlando los niveles de temperatura ambiental, humedad y pH de la carne para evaluar si está en los rangos adecuados; es por eso que se debe llevar a cabo una limpieza y desinfección eficaces durante las operaciones y entre ellas. Los mataderos deben presentar sistemas de aseguramiento de la calidad para asegurar productos inocuos a los supermercados, como los HACCP (CODEX, 2005; SENASA, 2012; Jay *et al.*, 2005). Los mataderos y los supermercados, al obtener su producto final, tienen que asegurarse de que la carga microbiana deba presentar los mismos criterios microbiológicos suscritos en la RM.N°591-2008.NTS-N° 071-MINSA/DIGESA-V.01. 6; 6.2; X.6 Carnes crudas, picadas y molidas (DIGESA, 2008). Por otro lado, las bacterias crecen gracias a los factores extrínsecos e intrínsecos de los alimentos. Los factores intrínsecos son el pH, actividad de agua, capacidad tampón, valor Eh (potencial redox), componentes nutricionales, constituyentes antimicrobianos y estructuras biológicas; los extrínsecos incluyen la temperatura, humedad relativa, ácidos atmosféricos (SENASA, 2012; FAO, 2007; Jay *et al.*, 2005).

El estafilococo dorado (*Staphylococcus aureus*), es un microorganismo que generalmente desencadena enfermedades de tipo nosocomial, y su gran diseminación ha permitido que se encuentren cepas en ambientes no hospitalarios, provocando problemas de salud pública; el principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina. Sin embargo, también se detalla resistencia de *Staphylococcus spp.* (coagulasa negativo) (OMS, 2004; Zayas-Tamayo *et al.*, 2013; Echevarría e Iglesias, 2003; López, 2013).

En 1928, se encontró que la penicilina actuaba efectivamente contra *S. aureus*. Al pasar los años la resistencia sobre la penicilina fue incrementando, pudiendo llegar hasta un 60% de frecuencia; en consecuencia se empezaron a utilizar las penicilinas naturales. En 1959, la resistencia llegaba al 90%; debido a esto, se obtuvo proveniente de las penicilinas naturales, la Meticilina, primera molécula semisintética, la cual tiene la propiedad de evadir la acción de β -lactamasas. Otra molécula derivada muy importante de mencionar es la Oxacilina (OMS, 2004; Echevarría e Iglesias, 2003). La Meticilina, Oxacilina y β -lactámicos como cefalosporinas de primera, segunda, y tercera generación, macrólidos, lincosamidas y cotrimoxazol, han sido antibióticos utilizados en primera instancia, ante infecciones por *S.aureus* (OMS, 2004; Echevarría e Iglesias, 2003; López, 2013).

Un grupo importante de *Staphylococcus spp.* son los *Staphylococcus* Resistentes a Meticilina (pueden ser coagulasa negativo o positivo). La bacteria presenta varios genes que codifican la modificación de la estructura de las proteínas ligadoras a penicilina (PBP2a), evitando que la penicilina pueda adherirse a la estructura en la cual se ejerce la acción de bloquear las transpeptidasas, cuya función es sintetizar la pared bacteriana; este es el principal motivo por el cual se ejerce resistencia frente a los β -lactámicos, además de cefalosporinas de tercera y cuarta generación y carbapenems. La resistencia también se extiende a lincosamidas y quinolonas, lo que hace los tratamientos más limitados. Otro mecanismo de resistencia importante es la

hiperproducción de β -lactamasas, en donde la bacteria responde a β -lactámicos pero no a Imipenem; a este grupo se les cataloga como *Staphylococcus* con resistencia límite a Oxacilina (López, 2013; Echevarría e Iglesias, 2003; Zayas-Tamayo *et al.*, 2013; Horna *et al.*, 2015). Los métodos para detectar *Staphylococcus spp.* meticilino-resistentes, incluyen el crecimiento en Agar suplementado con Oxacilina, la difusión en disco de Cefoxitina, el test de aglutinación en látex para la detección de la PBP2a y el método estándar a través de técnicas de PCR (OMS, 2004; López, 2013; Echevarría e Iglesias, 2003).

Otro gran problema en salud pública, que ya se ha mencionado, también bajo infecciones nosocomiales, es la existencia de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) presentes en las enterobacterias, principalmente *E.coli* y *Klebsiella pneumoniae* (García-Hernández *et al.*, 2011; Seral *et al.*, 2010; Oliver y Cantón, 2005; Blanc, 2007; Díaz *et al.*, 2009; Perozo y Castellano, 2009). Las BLEE son enzimas resistentes a todos los β -lactámicos, ejerciendo un efecto hidrolítico, principalmente en penicilinas y cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos, con excepción de carbapenémicos, cefamicinas y combinaciones de β -lactámicos con inhibidores de β -lactamasas; los principales inhibidores son el Ácido Clavulánico, Tazobactam y Sulbactam (García-Hernández *et al.*, 2011; Seral *et al.*, 2010; Oliver y Cantón, 2005; Blanc, 2007; Díaz *et al.*, 2009; Perozo y Castellano, 2009).

Las β -lactamasas son mediadas generalmente por plásmidos y derivados de otras enzimas con menor espectro hidrolítico, las llamadas β -lactamasas cromosómicas. Cuando el mecanismo es la hiperproducción, se obtienen características similares a las β -lactamasas clásicas, mediados por bacterias como *Citrobacter diversus*, *Klebsiella oxytoca*, *Yersinia enterocolitica* y especies del género *Kluyvera*; este último posee un nuevo tipo de BLEE que está teniendo una gran relevancia (CTX-M) (García-Hernández *et al.*, 2011; Seral *et al.*, 2010; Oliver y Cantón, 2005; Blanc, 2007; Díaz *et al.*, 2009; Perozo y Castellano, 2009). El mecanismo de resistencia es dado por la capacidad

de transferencia y conjugación de los plásmidos, lo cual permite la diseminación de la codificación plasmídica, desde una bacteria donadora a una receptora. Por otro lado, las BLEE portan genes de resistencia transmisibles, conllevando a resistencias cruzadas frecuentes, y pueden adquirirlo antibióticos como aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol.

La primera BLEE aislada fue la SHV-2, en Alemania en 1983; esta se identificó a partir de una cepa de *K. ozaenae*. En 1989, se descubrieron las cefotaximasas CTX-M-1 (de naturaleza plasmídica), en una cepa de *E.coli* y otra de *Salmonella*, también de *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter*; las cefotaximasas se caracterizan por ser altamente resistentes de alto nivel a cefuroxima, cefotaxima y cefepima. Se considera que las cefotaximasas CTX-M plasmídicas derivan de las penicilinasas cromosómicas naturales de *Kluyvera* spp. (García-Hernández *et al.*, 2011; Seral *et al.*, 2010; Oliver y Cantón, 2005; Blanc, 2007; Díaz *et al.*, 2009; Perozo y Castellano, 2009) Hoy en día se conocen cientos de variedades de BLEE; las más importantes son TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 y CTXM-32. Los métodos de detección incluyen análisis de sensibilidad microbiana a través de un antibiograma que permita detectar fenotipos compatibles con las BLEE (Díaz *et al.*, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvieron 50 gr. aprox. de carne molida proveniente de recortes de res, de 10 tiendas de 5 cadenas de supermercados del distrito de Miraflores, de Lima, Perú; posteriormente, en el Laboratorio de Nutrición e Inocuidad Alimentaria FAVEZ-UPCH, se realizaron dos diluciones por cada muestra. En la primera se diluyó 1 gr de carne molida en 9 ml de agua destilada, y en la segunda se tomó 1 ml de la primera dilución y también se diluyó en 9 ml de agua destilada (Maturin *et al.*, 2001).

De cada dilución se obtuvo 0.1 ml y con ayuda de un asa de Digralesky se sembró en Agares Manitol Salado (Becton, Dickinson and Company, 2013. BD™ Mannitol Salt Agar) y EMB (Becton, Dickinson and Company, 2013. BD™ EMB Agar), obteniendo las colonias esperadas (enterobacterias y *Staphylococcus spp.*) entre las 24 y 48 horas. Posteriormente, se utilizó caldo BHI (Becton, Dickinson and Company, 2013. BD™ Brain Heart Infusion Agar), para continuar con el proceso de clasificación de *Staphylococcus* con el Test Bactident® Coagulase (Merck KGaA, 2006. Bactident® Coagulase), obteniendo dos cepas positivas a detección de enzima coagulasa. La revisión y detección se dio a las 4 horas post-incubación y se confirmó a las 24 horas. Por otro lado, se utilizaron kits API 20E® (BioMérieux® sa. API.20E, 2002) para la caracterización de las enterobacterias aisladas, empleando reactivos específicos.

Para el análisis de susceptibilidad se utilizó el agar Muller Hinton (Becton, Dickinson and Company, 2013. BD™ Mueller Hinton II Agar), y se estandarizó el inóculo bacteriano a una escala 0.5 de Mac Farland, que equivale a entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/ml; para ello se analizó en un espectrofotómetro usando un filtro de 625 nanómetros, para garantizar la reproducibilidad del antibiograma, tanto para las enterobacterias como para los *Staphylococcus* aislados (Maturin *et al.*,

2001). En el caso de las enterobacterias, se hizo un primer antibiograma (método de difusión simple) para detectar las bacterias sospechosas de producir BLEE; posteriormente, se realizó un segundo antibiograma (método de doble disco) indicador de positividad a BLEE (Perozo y Castellano, 2009; Malbrán, 2012). En ambos casos se incubaron durante 24 horas. En el caso de los *Staphylococcus* aislados, se realizó un solo antibiograma (método de difusión simple), también bajo incubación durante 24 horas (Perozo y Castellano, 2009; Malbrán, 2012).

Los antibióticos utilizados en enterobacterias para el método de difusión simple fueron: Cefotaxima (CTX) 30 µg, Ceftazidima (CAZ) 30 µg, Ceftriaxona (CRO) 30 µg, Aztreonam (ATM) 30 µg y Cefpodoxima (CPD) 10 µg. Para el método de doble disco, se utilizaron los mismos antibióticos además de Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) 30 µg. (Perozo y Castellano, 2009) Por otro lado, los antibióticos utilizados en *Staphylococcus spp.* para el método de difusión simple fueron: Cefoxitina (FOX) 30 µg, Amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) 30 µg, Gentamicina (CN) 10 µg, Clindamicina (DA) 2 µg y Oxacilina (OX) 1 µg. (Perozo y Castellano, 2009)

RESULTADOS

Se muestrearon en 10 tiendas de los 5 supermercados del distrito de Miraflores, obteniendo los siguientes recuentos:

Cuadro 1. Recuento bacteriano por supermercado expresado en unidades formadoras de colonias por gramo de carne (UFC/g)

Identificación	Enterobacterias		<i>Staphylococcus spp</i>		
	Primera muestra	Segunda muestra	Primera muestra	Segunda muestra	
Supermercado 1	Tienda 1	$1,8 \times 10^3$	$6,5 \times 10^3$	$6,1 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$
	Tienda 2	$2,12 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	3×10^3	$4,8 \times 10^3$
	Tienda 3	$6,7 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3$	$3,5 \times 10^3$
	Tienda 4	$3,8 \times 10^3$	600	100	900
Supermercado 2	Tienda 5	$3,8 \times 10^4$	-	6×10^3	-
	Tienda 6	$1,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	10×10^2	800
Supermercado 3	Tienda 7	$1,02 \times 10^4$	$1,39 \times 10^4$	500	300
Supermercado 4	Tienda 8	$2,2 \times 10^4$	$8,5 \times 10^4$	700	$7,5 \times 10^3$
Supermercado 5	Tienda 9	$7,1 \times 10^4$	2×10^4	$1,7 \times 10^3$	3×10^3
	Tienda 10	$1,13 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	0	0

Del total de *Staphylococcus spp*, se aisló una cepa coagulasa positivo y fermentadora de manitol salado. Por otro lado, 2 cepas provenientes del Supermercado 1 (tienda 3 y tienda 4) fueron meticilino-resistentes, así como 1 cepa del Supermercado 4 (tienda 8), obteniendo 3/22 (13.64%) cepas meticilino-resistente.

Cuadro 2. *Staphylococcus spp* meticilino resistentes aislados en la carne molida

n° muestras	Coagulasa +	MR**	No MR***
Supermercado 1			x
Supermercado 1			x
Supermercado 1			x
Supermercado 1			x
Supermercado 1			x
Supermercado 1			x
Supermercado 1		x	
Supermercado 1			x
Supermercado 1		x	
Supermercado 1			x
Supermercado 2			x
Supermercado 2			x

Supermercado 2	x	x
Supermercado 2		x
Supermercado 3		x
Supermercado 4	x	
Supermercado 4		x
Supermercado 4		x
Supermercado 5		x
Supermercado 5		x
Supermercado 5		x
Supermercado 5		x
TOTAL	3	19

* Bacterias aisladas: **22**

**MR: Meticilino-resistente.

***No MR: No Meticilino-resistente.

En cuanto a enterobacterias, se aisló con mayor frecuencia *Serratia liquefaciens* (8/38), seguida de *Escherichia vulneris* (5/38), *Pantoea spp* (4/38), *Enterobacter cloacae* (3/38), *Klebsiella pneumoniae spp. ozaenae* (3/38), *Serratia fonticola* (3/38), *Serratia orodifera* (2/38), *Citrobacter freundii* (1/38), *Salmonella pullorum* (1/38), *Raoultella ornithinolytica* (1/38), *Serratia marcescens* (1/38), *Yersinia enterocolitica* (1/38), *Citrobacter youngae* (1/38), *Cronobacter spp* (1/38), *Citrobacter braakii* (1/38), *Enterobacter amnigenus* (1/38) y *Enterobacter aerogenes* (1/38).

Cuadro 3. Enterobacterias aisladas en la carne molida

Identificación	Nº de aislamientos
<i>Serratia liquefaciens</i>	8
<i>Escherichia vulneris</i>	5
<i>Pantoea spp</i>	4
<i>Enterobacter cloacae</i>	3
<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>	3
<i>Serratia fonticola</i>	3
<i>Serratia Orodifera</i>	2
<i>Citrobacter freundii</i>	1
<i>Salmonella pullorum</i>	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1
<i>Serratia marcescens</i>	1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1
<i>Citrobacter youngae</i>	1
<i>Cronobacter spp</i>	1
<i>Citrobacter braakii</i>	1

<i>Enterobacter amnigenus</i>	1
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
TOTAL	38

Las enterobacterias que se aislaron en cada supermercado, fueron sometidas a una prueba de difusión en agar simple para detectar las sospechosas productoras de BLEE, dando como resultado positivas 11/38 (28.94%). Posteriormente, por medio de la prueba de doble disco en agar, dieron positivo para BLEE 6/38 (15.79% del total).

Cuadro 4. Enterobacterias aisladas sospechosas y productoras de BLEE

n° muestras	Enterobacteria	Sospechoso*	BLEE**
Supermercado 1		x	x
Supermercado 2	<i>Enterobacter cloacae</i>	x	x
Supermercado 4			
Supermercado 1	<i>Citrobacter freundii</i>	x	x
Supermercado 1	<i>Serratia Orodifera</i>		
Supermercado 3			
Supermercado 1	<i>Salmonella pullorum</i>		
Supermercado 1	<i>Escherichia vulneris</i>		
Supermercado 4		x	
Supermercado 1			
Supermercado 2	<i>Pantoea spp</i>	x	
Supermercado 5			
Supermercado 1	<i>Serratia fonticola</i>	x	
Supermercado 4			
Supermercado 1	<i>Raoultella ornithinolytica</i>		
Supermercado 1	<i>Klebsiella pneumoniae ssp ozaenae</i>		
Supermercado 1	<i>Serratia marcescens</i>	x	x
Supermercado 1	<i>Yersinia enterocolitica</i>	x	x
Supermercado 1		x	
Supermercado 2			
Supermercado 3	<i>Serratia liquefaciens</i>		
Supermercado 4			
Supermercado 5			
Supermercado 1	<i>Citrobacter youngae</i>		
Supermercado 2	<i>Cronobacter spp</i>	x	
Supermercado 3	<i>Citrobacter braakii</i>	x	x
Supermercado 4	<i>Enterobacter amnigenus</i>		

Supermercado 4	<i>Enterobacter aerogenes</i>		
TOTAL	38 cepas	11	6

* Sospechoso: Metodología de difusión simple en agar

** BLEE: Metodología de doble disco (Cepa productora de β -lactamasas de espectro extendido)

DISCUSIÓN

No hemos encontrado estudios similares al nuestro en lo que corresponde al recuento de *Staphylococcus spp* en carnes molidas, debido a que solo es un indicador de manipulación y no es causal de intoxicaciones; es debido a esto que los estudios se enfocan en *Staphylococcus aureus*. En comparación con estudios internacionales, Huber *et al.* en el año 2011, evidenciaron que de 111 muestras de carne molida, el 32.4% presentó *Staphylococcus spp* meticilino-resistente y coagulasa negativo (MR-CNS), mientras que en nuestro estudio se evidenció un 13.64% de MR-CNS, con un total de 22 cepas. La importancia de la presencia de MR-CNS reside en la potencial transferencia de genes de resistencia, sobre todo a *Staphylococcus aureus*, conllevando a problemas más serios sobre la salud pública (Hanssen *et al.*, 2006); es por eso que, si bien en nuestro estudio se evidencia un bajo porcentaje de MR-CNS, el riesgo de transferencia es latente. Adicionalmente, se han encontrado genes de resistencia en *Staphylococcus aureus* similares tanto en carne como en humanos enfermos (Velasco *et al.*, 2015), lo que podría extrapolarse también para MR-CNS. Cabe mencionar que MR-CNS también se ha aislado en animales de ganado (Huber *et al.*, 2011).

Con respecto a enterobacterias productoras de BLEE en la carne, numerosos estudios mencionan como principal productor a *E. coli* (Ojer-Usoz *et al.*, 2013; Hakki y Özpınar, 2016), agente que no se aisló en este estudio. En esta investigación se determinó como enterobacterias productoras de BLEE a *Enterobacter cloacae* (Super.1 y Super.2), *Citrobacter freundii* (Super.1), *Serratia marcescens* (Super.1), *Yersinia enterocolitica* (Super.1) y *Citrobacter braakii* (Super.3). Existe una coincidencia con respecto al género *Serratia* y *Citrobacter*, con el estudio de Ojer-Usoz *et al.*, 2013; ya que se menciona como segundo agente con mayor prevalencia a *Serratia fonticola* (1.9%), después de *E. coli*, posteriormente de *C. koserii* (2.8%), además de *E. cloacae* (0.9%), bajo el método de difusión de doble disco. Estos son datos importantes, ya que, los genes de resistencia

mediados por plásmidos de una especie pueden transferirse a otras muy cercanas a él (Philippon *et al.*, 1994).

Geser *et al.* en el año 2012, determinaron la presencia de cepas productoras de BLEE presentes en heces en bovinos sanos, en leche proveniente de vacas con mastitis y en carne molida (de res y cerdo), no aislando ninguna cepa productora de BLEE en la carne, mientras en las heces de bovinos, sí. En las heces de ganado vacuno se determinó un 13.7% de muestras con producción de BLEE, y en becerros 25.3%. En la leche que provenía de vacas con mastitis se determinó un 1.25%. Todas las BLEE provenían de *E.coli*, menos 1 de becerro que provenía de *Citrobacter youngae*. A pesar de que en nuestro estudio no se aisló este último agente como productor de BLEE, si se evidenció producción de BLEE en *Citrobacter freundii* y *Citrobacter braakii*.

Por otro lado, Jouini *et al.* en el año 2007, caracterizaron seis cepas productoras de BLEE en *E. coli* proveniente de la carne de res, mientras en muestras fecales de animales sanos (provenientes de establos de la misma zona geográfica de los supermercados), no se encontraron cepas productoras de BLEE. Por tanto, sería recomendable realizar un estudio de aislamiento de enterobacterias productoras de BLEE en heces del ganado procedente de los mataderos que proveen la carne molida a los supermercados del distrito de Miraflores, y así poder relacionar y discutir resultados.

Se han aislado microorganismos indicadores de contaminación y patógenos en instrumental de faena, encontrándose en algunos estudios *Proteus spp.* (53.9%) en primer lugar, además de *Citrobacter spp.* (9%) y *Enterobacter spp.* (1.2%), así como *Salmonella spp.* en carne molida resistente a cefalexina (Tassew *et al.*, 2010), lo que sugiere que como primer indicador de

contaminación pueden encontrarse enterobacterias distintas a *E. coli*. En nuestro estudio se encontró con mayor frecuencia el género *Serratia*.

Según la NTS-N°071, en 25 gr. no debe haber *Salmonella spp.* Sin embargo, se aisló *Sallmonella pullorum* en 1 gr. de carne molida de la tienda #3 del supermercado 1; es decir, el lote de donde proviene la carne no se debió comercializar. Jensen *et al.* en el año 2006, mencionan que entre 2002 y 2004 se aislaron Salmonellas no productoras de BLEE en carne molida en Dinamarca. La presencia de la bacteria indica también un manejo deficiente en la higiene, o que productos de origen avícola hayan estado junto a la carne molida en algún momento o haya habido contaminación cruzada. Cabe mencionar que la presencia de palomas en los corrales de los mataderos pueda ser un factor desencadenante de la presencia de la bacteria.

La presencia de *Yersinia enterocolitica* en la carne, sugiere la probable presencia de la bacteria en los cerdos portadores, en mataderos en donde también se benefician reses, o en trabajadores portadores; además de ser una cepa productora de BLEE, es conocida como no patógena; sin embargo, algunas cepas del biotipo 1A pueden ser patógenas (Paixao *et al.*, 2013), conllevando a potenciales daños sobre la salud pública.

Existe una implicancia probable de la colonización bacteriana proveniente del tracto gastrointestinal, sobre el tracto urinario. En 2016 Galván *et al.*, demostraron la presencia de BLEE en *E. coli* aislada de cultivos de orina en el servicio de microbiología de un laboratorio privado en Lima. El 86.5% de urocultivos positivos a *E. coli* correspondieron al género femenino; así mismo, de los aislamientos productores de BLEE, 88.7% pertenecían a mujeres. La mayoría de las mujeres afectadas eran mayores de 65 años. Cabe resaltar que el rango de edad de los pacientes estaba comprendido entre 20 y 100 años. La colonización del tracto urinario puede deberse a malos hábitos de limpieza de las mujeres, que puede conllevar a multiplicación bacteriana conllevando a estados

de salud más graves, además de la diseminación de genes de resistencia, en caso se trate de enterobacterias productoras de BLEE.

CONCLUSIONES

1. Se aisló *Staphylococcus aureus* en una tienda del Supermercado 2, no metilino-resistente; y tres cepas de *Staphylococcus spp.* metilino-resistentes en dos tiendas del Supermercado 1 y una en el supermercado 4.
2. En todos los supermercados se aislaron enterobacterias, de las cuales se identificaron 38, y de estas, 6 fueron productoras de BLEE, provenientes de los Supermercados 1, 2 y 3
3. La especie con mayor frecuencia de aislamiento fue *Serratia liquefaciens* (8/38), seguida de *Escherichia vulneris* (5/8), *Pantoea spp* (4/38), *Enterobacter cloacae* (3/38), *Klebsiella pneumoniae spp ozaenae* (3/38) y *Serratia orodifera* (3/38)

BIBLIOGRAFÍA

1. Becton, Dickinson and Company. (2013). BD™ EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar), Modified. Agosto 2016, de Becton, Dickinson and Company Sitio web: <https://www.bd.com/resource.aspx%3FIDX%3D8765>
2. Becton, Dickinson and Company. (2013). BD™ Mannitol Salt Agar. Agosto, 2016, de Becton, Dickinson and Company. Sitio web: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8771>
3. Becton, Dickinson and Company. (2013). BD™ Brain Heart Infusion (BHI) Agar. Agosto, 2016, de Becton, Dickinson and Company. Sitio web: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8800>
4. BioMérieux® sa. API.20E. (2002). Identification system for *Enterobacteriaceae* and other non-fastidious Gram-negative rods. Agosto, 2016, de BioMérieux, Inc. Sitio web: <http://faculty.fiu.edu/~makemson/MCB3020Lab/API20eInstructions.pdf>
5. Blanc V. (2007). Caracterización de cepas y de plásmidos de *Enterobacteriaceae* portadoras de betalactamasas de espectro extendido. Agosto, 2016, de Universidad Autónoma de Barcelona. Sitio web: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/3908/vbp1de1.pdf?sequence=1>
6. *Codex Alimentarius*. (2005). Código de prácticas de higiene para la carne (CAC/RCP 58/2005 Rev. 11-55). Agosto, 2016, de CODEX.

7. Díaz M, Hernández J, Martínez-Martínez L, Rodríguez-Baño J, Pascual A. (2009). *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles: segundo estudio multicéntrico (proyecto GEIH-BLEE 2006). *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27(9), pp.503-510.
8. DIGESA. (2008). NTS N°071 - MINSA/DIGESA-V.01. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano. Agosto, 2016, de MINSA Sitio web: http://www.digesa.sld.pe/norma_consulta/RM%20615-2003MINSA.pdf
9. Echevarría J, Iglesias D. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered*, 14(4), pp.195-203
10. FAO. (2007). Buenas prácticas para la industria de la carne. *FAO Producción y Sanidad Animal*, 2, pp.1-22
11. Food Safety Authority of Ireland. (2014). Guidance Note No. 3. Guidelines for the Interpretation of Results of Microbiological Testing of Ready-to-Eat Foods Placed on the Market (Revision 1). *FSAI*, 3, pp.15-20.
12. Galván F, Agapito J, Bravo N, Lagos J, Tamariz J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de β -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Rev Med Hered*, 27(1), pp.22-29
13. García-Hernández A, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, Ruiz J, Yagüe G, Herrero J, Gómez J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro

- extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp. Quimioter*, 24(2), pp.57-66.
14. Geser N, Stephan R, Hächler H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, 8(21), pp.1-9
15. Hakkı I, Özpınar H. (2016). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. *Brazilian Journey Of Microbiology*, 47, pp.444-451.
16. Hanssen A, Ericson J. (2006). SCCmec: In *Staphylococci*: genes on the move genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 46, pp.8-20.
17. Horna G, Astocondor L, Jacobs J, Garcia C, (2015). Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Rev Esp Quimioter*, 28(2), pp.98-100.
18. Huber H, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Zweifel C, Stephan R. (2011). Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative *staphylococci* from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. *BMC Veterinary Research*, 7(6), pp.1-7.
19. Jay J, Loessner M, Golden D. (2005). *Modern Food Microbiology*. Seventh Edition. Spring Street, New York, NY 10013. USA: Series Editor.

20. Jensen L, Hasman H, Agersø Y, Emborg H, Aarestrup F. (2006). First description of an oxyimino-cephalosporin-resistant, ESBL-carrying *Escherichia coli* isolated from meat sold in Denmark. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), pp.79-794.
21. Jouini A, Vinue L, Slama K, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C. (2007). Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum β -lactamases and associated resistance genes in *Escherichia coli* strains of food samples in Tunisia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60, pp.1137–1141.
22. López L. (2013). Caracterización microbiológica y molecular de *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (SARM) aislado de muestras de alimentos de origen cárnico en la ciudad de Cartagena. Agosto, 2016, de Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos. Sitio web: <http://www.bdigital.unal.edu.co/11872/1/33199209.2014.pdf>
23. Maturin L, Peeler J. (2001). Aerobic Plate Count. Bacteriological Analytical Manual (BAM). Setiembre, 2016, de USA Food and Drug Administration (FDA) Sitio web: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
24. Malbrán C. (2012). Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por dilución. *Servicios Antimicrobianos - INEI – ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”*, 32 (2), 1-48.
25. Merck KGaA. (2006). Merck Microbiology Manual 12th Edition. Bactident® Coagulase. For the detection of the enzyme coagulase developed by *Staphylococcus aureus*. Agosto, 2016, de Merck KGaA Sitio web: <http://www.analytics-shop.com/media/Hersteller/Kataloge/millipore->

26. Ojer-Usoz E, González D, Vitas A, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano M. (2013). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science-Elsevier*, 93, pp.316–321.
27. Oliver A, Cantón A. (2005) Enterobacterias productoras de β -lactamasas plasmídicas de espectro extendido, 2016, de Servicios de Microbiología. Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca, y Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. Sitio web: <http://docplayer.es/13979417-Enterobacterias-productoras-de-v-lactamasas-plasmidicas-de-espectro-extendido.htm>
28. Organización Mundial de la Salud. (2004). *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente. Informe Ateneo General. Agosto, 2016, de Facultad de Medicina, Universidad de la República. Montevideo Sitio web: <http://docplayer.es/14542287-Staphylococcus-aureus-meticilino-resistente.html>
29. Paixão R, Moreno L, De Gobbi D, Raimundo D, Hofer E, Matté M, Porfida T, de Moura V, Pereira B, Moreno A. (2013). Characterization of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A Strains Isolated from Swine Slaughterhouses and Markets. Hindawi Publishing Corporation *The Scientific World Journal*, 2013, pp.1-6.
30. Perozo A, Castellano M. (2009). Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia Enterobacteriaceae. *Kasmera*, 37(1) pp.25- 37.
31. Philippon. A, Arlet G, Lagrange P. (1994). Origin and impact of plasmid mediated extended-

espectrum beta-lactamases. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: European Society Of Clinical Microbiology*, 13(1), pp.17-29.

32. SENASA. (2012). Decreto Supremo N°015-2012-AG. Reglamento sanitario del faenado de animales de Abasto. Agosto, 2016, de MINAG. Sitio web: <http://www.senasa.gob.pe/senasa/wp-content/uploads/2014/10/Decreto-Supremo-N%C2%BA-015-2012-AG.pdf>

33. Seral C, Pardos M, Castillo F. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 28 (1), pp.12-18.

34. Tassew H, Abdissa A, Beyene G, Gebre-Selassie S. (2010). Microbial flora and food borne pathogens on minced meat and their susceptibility to antimicrobial agents. *Ethiop. J. Health. Sci*, 20(3), pp.137-43.

35. Velasco V, Buyukcangaz E, Sherwood J, Stepan R, Koslofsky R, Logue C. (2015). Characterization of *Staphylococcus aureus* from Humans and a Comparison with Isolates of Animal Origin, in North Dakota, United States. *PLoS ONE*, 10(10), pp.1-15.

36. Zayas-Tamayo A, Barreras-García G, Álvarez E. (2013). Detección mediante el Sistema DIRAMIC de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y comparación con otros métodos utilizado en la práctica clínica. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(2), 1-9

