

Detección de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en carne de pollo de mercados de abasto de un distrito de Lima, Perú

Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBL) isolated from retail chicken meat in a district of Lima, Peru

Valeria Cortez-Sandoval^{1,2}, Rosa González², Daphne Ramos^{1,3}

RESUMEN

El objetivo del estudio fue detectar genes de resistencia a β -lactámicos de espectro extendido (BLEE) procedentes de enterobacterias aisladas en muestras de carne de pollo obtenidas en mercados de abasto del distrito de Santiago de Surco, Lima, Perú. Se obtuvieron 34 muestras para el procedimiento microbiológico. El aislamiento se realizó utilizando agar EMB y TSA. Para la caracterización bioquímica de género y especie se utilizó el kit EnteroPluri-Test® Liofilchem. El análisis de susceptibilidad antimicrobiana se realizó con el método Kirby-Bauer como cribado y el método de Jarlier para la confirmación. Las enterobacterias confirmadas fueron evaluadas mediante diagnóstico molecular para genes de resistencia a β -lactámicos de espectro extendido. El PCR en punto final se utilizó para la amplificación de genes CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9, y un PCR dúplex en punto final para la amplificación de genes TEM y SHV. Se identificaron 34 cepas de enterobacterias, siendo 20/34 sospechosas de producir enzimas BLEE bajo el método Kirby-Bauer, y 12/34 cepas confirmadas de producir BLEE bajo el método de Jarlier. Las enterobacterias fueron *Salmonella choleraesuis* (n=1), *Escherichia coli* (n=8), *Serratia*

¹ Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

² Laboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

³ E-mail: dramosd@unmsm.edu.pe

Recibido: 17 de marzo de 2021

Aceptado para publicación: 10 de enero de 2022

Publicado: 29 de junio de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

odorifera (n=1) y *Klebsiella ozaenae* (n=2). La identificación de cepas multidrogoresistentes (MDR) fue de 13/34, siendo *E. coli* (n=8), *Klebsiella ozaenae* (n=3), *Serratia odorifera* (n=1) y *Salmonella choleraesuis* (n=1). Todas (12/12) las cepas fenotípicamente resistentes para BLEE fueron positivas a la detección de genes BLEE. La mayor frecuencia correspondió al gen CTX-M-1 (12/12), seguido del gen TEM (10/12) y el gen CTX-M-9 (2/12). No se detectaron genes CTX-M-2 ni SHV. Se concluye que la carne de pollo vendida por mercados de abasto del distrito de Santiago de Surco contiene enterobacterias (BLEE) con al menos un gen de resistencia.

Palabras clave: Enterobacteriaceae, genes, BLEE, PCR, CTX-M, TEM

ABSTRACT

The aim of this study was to determine extended spectrum β -lactam resistance genes (ESBL) from enterobacteria isolated in chicken meat samples obtained in markets in the Santiago de Surco district, Lima, Peru. In total, 34 samples were obtained for the microbiological procedure. Isolation was done using EMB and TSA agar. For the biochemical characterization of genus and species, the EnteroPluri-Test® Liofilchem kit was used. The antimicrobial susceptibility analysis was performed with the Kirby-Bauer method as screening and the Jarlier method for confirmation. Confirmed Enterobacteriaceae were evaluated by molecular diagnostics for extended spectrum β -lactam resistance genes. An end-point PCR was used for the amplification of CTX-M-1, CTX-M-2 and CTX-M-9 genes, and a duplex end-point PCR was used for the amplification of TEM and SHV genes. Results showed that 34 strains of enterobacteria were identified, with 20/34 suspected of producing ESBL enzymes under the Kirby-Bauer method, and 12/34 strains confirmed to produce ESBL under the Jarlier method. The enterobacteria were *Salmonella choleraesuis* (n=1), *Escherichia coli* (n=8), *Serratia odorifera* (n=1) and *Klebsiella ozaenae* (n=2). The identification of multidrug resistant strains (MDR) was 13/34, being *E. coli* (n=8), *Klebsiella ozaenae* (n=3), *Serratia odorifera* (n=1) and *Salmonella choleraesuis* (n=1). All (12/12) the phenotypically resistant strains for ESBL were positive for the detection of ESBL genes. The highest frequency corresponded to the CTX-M-1 gene (12/12), followed by the TEM gene (10/12) and the CTX-M-9 gene (2/12). No CTX-M-2 or SHV genes were detected. It is concluded that chicken meat sold by markets in the Santiago de Surco district contains enterobacteria (ESBL) with at least one resistance gene.

Key words: Enterobacteriaceae, genes, ESBL, PCR, CTX-M, TEM

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son principalmente de origen animal, en donde las enterobacterias deben presentar un recuento bacteriano suficiente para producir la infección (OMS, 2021). Sin embargo, el impacto en la salud pública no solamente radica en el desarrollo de las enfermedades, sino también en

la manifestación de resistencia a los antibióticos, entre ellos los β -lactámicos (Ochoa *et al.*, 2009; Granda *et al.*, 2019). Diversas investigaciones indican que la transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos se puede realizar a través del consumo de alimentos como carne mal cocida, contacto con heces de animales o por contacto directo con personas portadoras de la bacteria (Marshall y Levy, 2011; Shrestha *et al.*, 2017).

La resistencia antibiótica de las enterobacterias, principalmente de *Escherichia coli*, a tetraciclinas o cotrimoxazol, ha sido reportada en humanos sanos y enfermos (Kola *et al.*, 2012). Estos antibióticos junto con los β -lactámicos suelen utilizarse regularmente como promotores de crecimiento y para tratamientos en granjas avícolas (Kola *et al.*, 2012). Es importante enfatizar que la gran capacidad de diseminación de genes de resistencia mediante plásmidos ha permitido resistencia cruzada frente a distintos antibióticos (Seral García *et al.*, 2010). En países europeos se demostró que el 19% de *Escherichia coli* productora de BLEE aislada de humanos presentó genes BLEE, cuyos plásmidos fueron genéticamente indistinguibles de aislamientos de origen avícola (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011).

El consumo *per capita* de carne de pollo en el Perú en marzo de 2019 fue de 4.2 kg/hab/mes (MINAG, 2019). Esta demanda exige que los sistemas productivos avícolas sean más eficientes; sin embargo, la producción intensiva ha conllevado a utilizar antibióticos frente a distintos desafíos en aves, principalmente broilers y ponedoras, lo cual ha generado resistencia antibiótica (De Briyne *et al.*, 2014). Esto indica, además, que la contaminación de enterobacterias productoras de BLEE también podría ser de origen animal (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018), pues las heces son el principal reservorio de transmisión de genes BLEE (Shrestha *et al.*, 2017).

En ese contexto, el objetivo del estudio fue evidenciar la presencia de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido en carne de pollo expendidas en mercados de abasto del distrito de Santiago de Surco en Lima, Perú.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio observacional descriptivo se desarrolló en mercados de abasto del distrito de Santiago de Surco de Lima Metropolitana

entre marzo y abril de 2019. El procesamiento se llevó a cabo en el Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental (procedimiento microbiológico y bioquímico) y en Laboratorio de Patología Aviar (extracción de ADN y diagnóstico molecular) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), Lima, Perú.

Considerando los hallazgos detectados en investigaciones (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018; Cortez Sandoval y Shiva, 2019) de enterobacterias realizadas en distritos de Lima y que el distrito de Santiago de Surco tiene un control sanitario riguroso a nivel de mercados de abasto por la gestión municipal que actualmente prioriza la vigilancia sanitaria y la salud pública (A. Mansilla, Lima, comunicación personal), se consideró relevante detectar la presencia de enterobacterias con genes BLEE en mercados de abasto que tengan un control sanitario riguroso como lo presenta este distrito. El tamaño de muestra fue definido mediante la fórmula de detección de enfermedad o prevalencia límite (Thrusfield, 1990), con un nivel de confianza del 95% y prevalencia límite de 10.9% (Ojer-Usoz *et al.*, 2013) para la detección de los genes menos frecuentes (TEM y SHV) de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en muestras positivas a enterobacterias obtenidas de muestras de carne de pollo. El tamaño de muestra calculado fue de 26; no obstante, se obtuvieron muestras adicionales a fin de garantizar el número mínimo de muestras ante la eventualidad de pérdidas.

Se estableció una base de datos con la lista de mercados de abasto brindada por la Municipalidad de Santiago de Surco (Exp. 1155562019). Se excluyeron los mercados que no contaban con puestos de carne de pollo, quedando disponibles 25 mercados. El muestreo se realizó de manera aleatoria, mediante un sistema computarizado (Tyrrer y Heyman, 2016). De estos, nueve (los más grandes) fueron seleccionados para realizar el muestreo en dos puestos, mientras que en

los restantes se muestreó un solo puesto por mercado, registrándose un total de 34 muestras. La colección de muestras fue realizada con intervalo de 2 días.

Los operarios en la mayoría de los puestos de los mercados contaban con mandil de plástico y guantes. Las mesas donde se cortaba la carne eran de loseta y en algunos casos se usaban tablas de madera con desperfectos a manera de grietas. Las bandejas donde se almacenaban los cortes para la venta eran de fierro enlazado y, en algunos casos, contaban con bandejas con materiales adecuados desde el punto de vista sanitario. Sin embargo, solo en algunos recintos se observó que se mantenía la cadena de frío. Las herramientas para trozar la carne y utensilios eran adecuadas. Algunos mercados se ubicaban en espacios abiertos no techados. También se observó presencia de plagas (dípteros) en algunos establecimientos.

Las piezas de pollo (ala y pierna) se encontraban trozadas al momento de la compra (toma de muestra). Estas fueron colectadas siguiendo las recomendaciones de Santos *et al.* (2020) y Weese *et al.* (2010). Las muestras fueron adquiridas mediante una transacción económica cancelando por ello el costo correspondiente al peso de las piezas adquiridas. Las muestras fueron empacadas directamente en bolsas de plástico por el vendedor, de manera que se asegure el canal tradicional de venta al por menor en el puesto de venta. A su vez, los productos adquiridos se depositaron en bolsas estériles y trasladadas al laboratorio bajo condiciones de refrigeración (5 °C) para el procedimiento microbiológico y bioquímico.

El procedimiento microbiológico utilizado fue un protocolo para el aislamiento de enterobacterias descrito por la Comisión Internacional de Especificaciones para Alimentos (ICMSF, 1978), con algunas modificaciones. Se realizó un homogenizado de los cortes en Stomacher® 400 Circulator a 270 rpm por 3 min, se tomó 10 g de carne homogenizada y se colocó en 90 ml de agua destilada

en bolsas estériles para una nueva homogenización con el mismo equipo por 2 min. De la dilución, se sembró 0.1 ml en agar EMB (Agar Eosina y Azul de Metileno) para obtener las colonias características y en TSA (Agar Tripticasa Soya) para las pruebas bioquímicas. En ambos casos, los cultivos fueron incubados a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 24 ± 2 h. Se seleccionó una colonia de enterobacterias al azar por cada cultivo correspondiente a cada homogenizado. Se realizó la tinción Gram, y la prueba de oxidasa a partir de un cultivo bacteriano en TSA. Ambas pruebas se realizaron para confirmar la detección de bacilos Gram y oxidasa negativos y asegurar el aislamiento de enterobacterias. Luego, se utilizó el kit EnteroPluri-Test® (Liofilchem) para la caracterización bioquímica de enterobacterias, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La susceptibilidad antimicrobiana se realizó bajo el método de Kirby-Bauer en agar Müller Hinton. La inoculación de la bacteria se efectuó habiendo llevado la turbidez a 0.5 en la escala de Mc Farland (CLSI, 2015). Debido a la característica principal de las BLEE (sensibilidad disminuida frente a cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam), los discos antibióticos utilizados fueron los β -lactámicos: cefotaxima (CTX) 30 μg , ceftazidima (CAZ) 30 μg , ceftriaxona (CRO) 30 μg , aztreonam (ATM) 30 μg y cefpodoxima (CPD) 10 μg , según el protocolo propuesto por autores de referencia y la CLSI (Seral García *et al.*, 2010; CLSI, 2015; Perozo Mena *et al.*, 2017). Las placas de Müller Hinton cultivadas fueron incubadas por 16 ± 2 h a $35 \pm 2^\circ \text{C}$, con el fin de detectar mediante este método de cribado a enterobacterias sospechosas de producir BLEE (CLSI, 2015; Perozo Mena *et al.*, 2017).

Las cepas que resultaron ser resistentes al método de cribado fueron seleccionadas para confirmar el fenotipo de resistencia mediante el método de Jarlier, también llamado método del doble disco (método confirmatorio) (Ojer-Usoz *et al.*, 2013; Perozo

Cuadro 1. Secuencias de cebadores utilizados para la detección de genes BLEE

Gen	Cebador	Secuencia	Productos PCR (pb)
SHV	SHV-F	5' AGGATTGACTGCCTTTTTG 3'	392
	SHV-R	5' ATTTGCTGATTTCGCTCG 3'	
TEM	TEM-C	5' ATCAGCAATAAACCAGC 3'	516
	TEM-H	5' CCCC GAAGAACGTTTTTC 3'	
CTX-M-1	CTX-M-1-F	5' AAAAATCACTGCGCCAGTTC 3'	415
	CTX-M-1-R	5' AGCTTATTCATCGCCACGTT 3'	
CTX-M-2	CTX-M-2-F	5' CGA CGC TAC CCC TGC TAT T 3'	552
	CTX-M-2-R	5' CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG 3'	
CTX-M-9	CTX-M-9-F	5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG 3'	205
	CTX-M-9-R	5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC 3'	

Mena *et al.*, 2017; EUCAST, 2018). El método de doble disco fue realizado en agar Müller Hinton, bajo las mismas condiciones del método de cribado utilizando los mismos antibióticos con adición de un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 30 µg, debido a la sensibilidad disminuida de las BLEE también frente al ácido clavulánico (Seral García *et al.*, 2010; Perozo Mena *et al.*, 2017; EUCAST, 2018). El disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) 30 µg se colocó en el centro del antibiograma y los demás discos a 30 mm de distancia (EUCAST, 2018). Los resultados positivos fueron mediados por la manifestación de un efecto de sinergia (también llamado efecto huevo, de cola de pez o de corcho de champagne) entre los discos de amoxicilina/ácido clavulánico y los discos circundantes (Ojer-Usoz, 2013; Perozo Mena *et al.*, 2017; EUCAST, 2018). Las enterobacterias positivas al método del doble disco fueron seleccionadas para el análisis molecular mediante PCR en punto final para la detección de los genes de resistencia codificantes para el fenotipo de producción de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Seral García *et al.*, 2010; Ojer-Usoz, *et al.*, 2013; Perozo Mena *et al.*, 2017).

Para la identificación de los genes BLEE, fueron realizadas reacciones de PCR en punto final. Para eso, se realizó la extracción del ADN bacteriano a partir de colonias previamente aisladas utilizando el kit de extracción GeneJet Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific™) según las instrucciones del fabricante.

Para la detección de los genes CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9 se realizó un PCR simple en punto final para cada gen (Woodford *et al.*, 2006) y para la detección de genes TEM y SHV se realizó el PCR dúplex, según protocolo descrito por Colom *et al.* (2003). Las secuencias de los cebadores se detallan en la Cuadro 1. Los ensayos de PCR se realizaron con un volumen final de reacción de 25 µl, con la siguiente composición: 12.5 µl de DreamTaq Green MasterMix, 2 µl de ADN templado y 0.25 µM de cebadores específicos de cada reacción. Cepas aisladas de bacteriemias de neonatos humanos fueron usadas como controles positivos y agua PCR fue usada como control negativo en todas las reacciones de PCR.

Las condiciones de amplificación fueron una modificación de las metodologías-

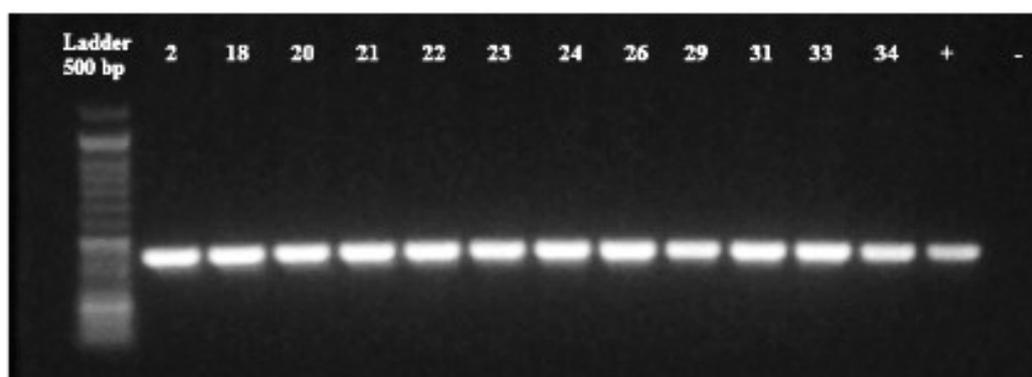


Figura 1. Detección de genes CTX-M-1 (12/12) (415 bp). Control positivo (+), control negativo (-). Muestras: 2 (*Salmonella choleraesuis*), 18 (*Escherichia coli*), 20 (*Escherichia coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*Escherichia coli*), 23 (*Escherichia coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*Escherichia coli*), 29 (*Escherichia coli*), 31 (*Escherichia coli*), 33 (*Escherichia coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Todas las muestras resultaron positivas

descritas por Colom *et al.* (2003) y Woodford *et al.* (2006). Las reacciones para detección de CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9 consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 30 ciclos de desnaturalización de ADN a 95 °C por 30 s, hibridación a 52 °C por 40 s, extensión a 72 °C por 1 min, y una elongación final a 72 °C por 10 min. Para el PCR para la detección de los genes TEM y SHV, las condiciones de amplificación fueron desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, seguido de 32 ciclos de desnaturalización de ADN a 95 °C por 30 s, hibridación a 52 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min, y una elongación final a 72 °C por 10 min.

Los productos del PCR fueron analizados mediante electroforesis en 2% de gel de agarosa (Ultrapure Agarosa™) con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y 1X de buffer TBE™. El gel fue fotografiado bajo luz ultravioleta usando un transiluminador (Clear View, Cleaver Scientific).

RESULTADOS

Todas las muestras fueron positivas a la detección de enterobacterias por cultivo bacteriano y superaron el límite de criterios microbiológicos de *Escherichia coli* para carnes crudas picadas y molidas, según la NTS-071 de la R.M. 591-2008/MINSA/DIGESA-V-01. Asimismo, en el Cuadro 2 se puede observar que hubo presencia de *Salmonella* spp en las muestras de carne. Se identificaron 34 cepas de enterobacterias, de las cuales 20/34 fueron sospechosas de producir enzimas BLEE bajo el método de Kirby-Bauer, en tanto que 12/34 fueron cepas confirmadas bajo el método de doble disco de producir BLEE. Estas últimas cepas fueron seleccionadas para los ensayos de PCR en punto final y correspondieron a una cepa de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*, ocho cepas de *Escherichia coli*, una cepa de *Serratia odorifera* y dos cepas de *Klebsiella ozaenae*.

Cuadro 2. Perfil de resistencia antimicrobiana y multidrogoresistencia (MDR) de enterobacterias aisladas en carne de pollo vendida en expendio (expresado en milímetros de halo de inhibición)

Nº	Bacteria	Aztreonam (AT)	Cefotaxima (CTX)	Ceftazidima (CAZ)	Cefpodoxima (PX)	Ceftriaxona (CTR)	MDR
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	40	34	32	32	36	
2	<i>Salmonella choleraesuis</i>	26	14	26	0	15	1
3	<i>Citrobacter freundii</i>	34	30	27	24	30	
4	<i>Citrobacter freundii</i>	32	28	26	18	32	
5	<i>Salmonella paratyphi</i>	30	28	26	24	29	
6	<i>Serratia licuefanciens</i>	42	36	38	28	40	
7	<i>Escherichia coli</i>	34	28	30	22	30	
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	34	30	17	36	
9	<i>Serratia licuefanciens</i>	37	29	28	22	31	
10	<i>Klebsiella ozaenae</i>	16	29	22	26	34	
11	<i>Citrobacter freundii</i>	28	38	26	19	32	
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>	38	38	32	34	38	
13	<i>Pantoea agglomerans</i>	36	32	29	23	34	
14	<i>Citrobacter amanolaticus</i>	38	34	22	24	36	
15	<i>Escherichia coli</i>	41	19	31	31	39	
16	<i>Escherichia coli</i>	37	34	17	28	42	
17	<i>Escherichia coli</i>	42	30	11	30	40	
18	<i>Escherichia coli</i>	16	0	11	0	10	1
19	<i>Klebsiella ozaenae</i>	33	23	34	0	14	1
20	<i>Escherichia coli</i>	19	9	19	0	14	1
21	<i>Serratia odorifera</i>	21	10	20	0	16	1
22	<i>Escherichia coli</i>	12	0	12	0	0	1
23	<i>Escherichia coli</i>	21	9	20	0	13	1
24	<i>Klebsiella ozaenae</i>	19	9	18	0	13	1
25	<i>Pantoea agglomerans</i>	36	34	30	26	36	
26	<i>Escherichia coli</i>	29	18	30	0	20	1
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	25	25	23	28	
28	<i>Klebsiella ozaenae</i>	34	34	30	26	36	
29	<i>Escherichia coli</i>	17	8	18	0	9	1
30	<i>Serratia rubideae</i>	40	38	32	30	36	
31	<i>Escherichia coli</i>	31	22	21	0	24	1
32	<i>Escherichia coli</i>	35	35	34	28	38	
33	<i>Escherichia coli</i>	18	8	16	0	10	1
34	<i>Klebsiella ozaenae</i>	26	15	27	0	17	1



Figura 2. Detección de genes CTX-M-9 (2/12) (205 bp). Control positivo (+), control negativo (-). Muestras: 2 (*Salmonella choleraesuis*), 18 (*Escherichia coli*), 20 (*Escherichia coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*Escherichia coli*), 23 (*Escherichia coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*Escherichia coli*), 29 (*Escherichia coli*), 31 (*Escherichia coli*), 33 (*Escherichia coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Las muestras positivas fueron las cepas 2 (*Salmonella choleraesuis*) y 34 (*Klebsiella ozaenae*)

Las cepas resistentes a múltiples antibióticos (MDR) se reportaron en función a la sensibilidad a los antibióticos probados en cada cepa por el método Kirby-Bauer, donde 13/34 fueron positivas (Cuadro 2), siendo ocho cepas de *Escherichia coli*, tres de *Klebsiella ozaenae*, una de *Serratia odorifera* y una de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*. Por otro lado, en 12 cepas de las 34 enterobacterias aisladas se detectaron genes BLEE por el método molecular, siendo CTX-M-1 el gen con mayor frecuencia (12/12), seguido de TEM (10/12) y CTX-M-9 (2/12) (Figuras 1-3). No se detectó la presencia de genes CTX-M-2 ni SHV.

DISCUSIÓN

Todas las muestras de carne de pollo fueron positivas para la detección de enterobacterias. La NTS N.º 071 aprobada por R.M. 591-2008/MINSA/DIGESA-V-01 no indica un criterio microbiológico específico para enterobacterias en carne de pollo. Sin embargo, si bien el objetivo del estudio no

es establecer un recuento bacteriano, se comparó el recuento de UFC/g de enterobacterias con el límite de UFC/g del punto X.6 Carnes crudas picadas y molidas para *Escherichia coli* ($50 - 5 \times 10^2$). El recuento de enterobacterias resultó estar por encima del límite microbiológico, lo cual podría indicar contaminación fecal originaria de algún punto de la cadena productiva por ausencia de buenas prácticas de manipulación durante el eviscerado, falta de refrigeración del producto durante la venta y malas prácticas de higiene del manipulador (Rouger *et al.*, 2017). Así mismo, los cortes que se realizan en la carne favorecen la salida de líquido intracelular (elevada actividad de agua) y compuestos proteicos, los cuales actúan como medio de cultivo para la proliferación de bacterias que se encuentran en la carne (Saenz-García *et al.*, 2020; Rosas, 2007). Todas las cepas de *Escherichia coli* seleccionadas para la detección molecular de genes BLEE fueron positivas a la detección de al menos un gen. Si bien la prevalencia de aislamiento para *Escherichia coli* en Lima fue de 95.3% (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018), estudios en ciu-

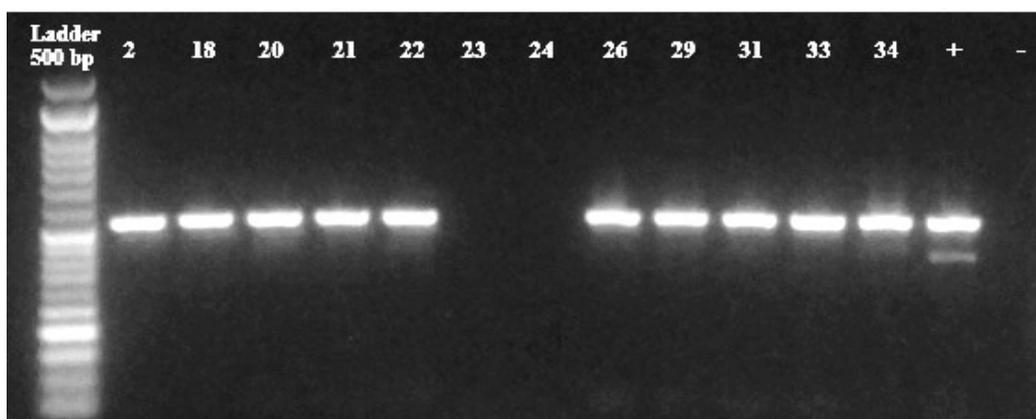


Figura 3. Detección de TEM (516 bp) y SHV (392 bp). Control positivo (+), control negativo (-). Muestras: 2 (*Salmonella choleraesuis*), 18 (*Escherichia coli*), 20 (*Escherichia coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*Escherichia coli*), 23 (*Escherichia coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*Escherichia coli*), 29 (*Escherichia coli*), 31 (*Escherichia coli*), 33 (*Escherichia coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Todas las muestras resultaron positivas para el gen TEM con excepción de las cepas 23 (*Escherichia coli*) y 24 (*Klebsiella ozaenae*) (83.3%). Ninguna muestra fue positiva para el gen SHV

dades europeas como Navarra, España, indican prevalencias del 59.0% (Vitas *et al.*, 2018) y en ciudades asiáticas como Sylhet, Bangladesh de 63.5% (Rahman *et al.*, 2020). Asimismo, Ruiz-Roldán *et al.* (2018) detectaron 59.4% (19/32) de *Escherichia coli* productora de BLEE en aislamientos en carne de pollo en mercados de Lima metropolitana, en tanto que en el presente estudio se encontró que todas las cepas fueron productoras de BLEE.

Estudios como el de Ojer-Usoz *et al.* (2013) y el de Ruiz-Roldán *et al.* (2018) han podido detectar prevalencias altas de *E. coli* y otras enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo por encima de otras carnes. Si bien no se puede descartar la contaminación cruzada durante la manipulación en mataderos o puestos de mercados, la alta prevalencia de BLEE en enterobacterias también podría deberse al uso indiscriminado de antimicrobianos en granjas avícolas, una problemática que a través del tiempo se ha

agudizado debido a la explotación intensiva de animales de producción (Smet *et al.*, 2010; Aarestrup, 2015). Esta hipótesis no debe quedar aislada si se considera el consumo per cápita de carne de pollo (4.2 kg/hab/mes) de la población peruana (MINAG, 2019) y la crianza intensiva de pollos.

Si bien el recuento de enterobacterias resultó elevado, la relativa baja frecuencia de *E. coli* (38%, 13/34) podría explicarse por la rigurosidad de las municipalidades en cumplir las Buenas Prácticas de Manipulación (BPM), Buenas Prácticas de Higiene (BPH) e inspecciones sanitarias en mercados de distritos como Santiago de Surco, tal como indica la R.M. 282-2003; característica que puede verse afectada en otros distritos como los citados en el estudio de Ruiz-Roldán *et al.* (2018). Así mismo, los mataderos también deben estar regulados por la autoridad competente (DS N° 029-2007-AG/SENASA-PERÚ), debido a que también pueden ser fuente de diseminación de enterobacterias productoras de BLEE.

Un hallazgo resaltante del estudio fue la detección de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* y *Salmonella enterica* serovar *paratyphi*, ambas patógenas; considerando que cualquier especie de *Salmonella* spp es un contaminante en la carne de acuerdo con la RM. N° 591-2008-/MINSA/DIGESA-V-01 y por tanto debe de estar ausente. La OMS (2018) atribuye al género *Salmonella* spp la capacidad de generar enfermedad no solamente por serovares como *typhi* o *paratyphi*, sino también por serovarietades clasificadas como específicas para animales, debido a que se ha reportado que serovares como *enteritidis*, *typhimurium* y *choleraesuis*, entre otros, han generado enfermedades en humanos, desde leves a graves sintomatologías gastrointestinales, fiebres e incluso sepsis (Chiu *et al.*, 2004; OMS, 2018).

Los genes de mayor frecuencia fueron CTX-M-1 (12/12; 100%) y TEM (10/12; 83.3%). En esta línea, Kola *et al.* (2012) hallaron 41.2% (77/187) de muestras de carne de pollo en Alemania con el gen CTX-M-1 y 8.6% (16/187) para el gen TEM-52. En el Perú no se reporta la presencia de BLEE en heces de aves de corral; sin embargo, se reportan aislamientos de *E. coli* provenientes de órganos y vísceras de ave (Gordillo *et al.*, 2019), en donde el gen de mayor prevalencia fue el CTX-M-1 (90.3%) seguido del gen SHV (8.1%). Por otro lado, el gen CTX-M-2 ha sido descrito como un genotipo de campo avícola (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011), lo que sugiere que la contaminación de la carne puede darse por heces de animales de explotaciones avícolas.

El estudio de Ojer-Usoz *et al.* (2013) realizado en España, indica que existe una mayor prevalencia (84.0%) de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo sobre otras carnes como la de cerdo (55.0%) y res (59.0%). Asimismo, se indicó que los genes de mayor prevalencia detectados en la carne fueron los tipos CTX-M (Ojer-Usoz *et al.*, 2013). Información que fue contrastada con reportes que indican la predo-

minancia de CTX-M en aislamientos de origen animal y aislamientos clínicos (Smet *et al.*, 2010). Esto indica la posibilidad de que aquellas infecciones en humanos por enterobacterias productoras de BLEE podrían tener un origen alimentario a través de la carne de pollo, pues se ha demostrado que las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse al hombre a través del consumo de carne mal cocida (Hoffmann *et al.*, 2017; Langsrud *et al.*, 2020). Sin embargo, en el Perú hacen falta mayores estudios a nivel epidemiológico para poder detectar algún tipo de correlación o asociación concreta.

Un estudio reciente en el Perú indica que el 92% de cepas *Salmonella enterica* serovar *infantis* aisladas de muestras de heces de infantes atendidos en hospitales de Lima fueron cepas productoras de BLEE (Granda *et al.*, 2019). Asimismo, Zamudio *et al.* (2011) reportaron que *Salmonella enterica* serovar *infantis* es el tercer serovar más frecuentemente encontrado en huevos y carne de ave. Si bien en el presente estudio no se detectó este serovar, Granda *et al.* (2019) indicaron que la mayor prevalencia de genes BLEE detectados en los hospitales fue para el gen CTX-M-65 perteneciente al grupo CTX-M-9.

CONCLUSIONES

La carne de pollo vendida en mercados del distrito de Santiago de Surco contiene enterobacterias productoras de BLEE, con al menos un gen de resistencia.

LITERATURA CITADA

1. Aarestrup FM. 2015. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Phil Trans R Soc B* 370: 20140085. doi: 10.1098/rstb.2014.0085

2. **Chiu CH, Su LH, Chu C. 2004.** *Salmonella enterica* serotype *chole-raesuis*: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. *Clin Microbiol Rev* 17: 311-322 doi: 10.1128/CMR.17.2.311-322.2004
3. **CLSI. 2015.** Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-fifth informational supplement. USA: Clinical Laboratory Standards Institute.
4. **Colom K, Perez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R. 2003.** Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV y blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 223: 147-151. doi: 10.1016/S0378-1097-(03)00306-9
5. **Cortez Sandoval V, Shiva C. 2019.** Detección de enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en carne molida de supermercados de un distrito de Lima, Perú. *Salud Tecnol Vet* 1: 1-7. doi: 10.20453/stv.v7i1.3561
6. **De Briyne N, Atkinson J, Pokludová L, Borriello SP. 2014.** Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec* 175: 325. doi: 10.1136/vr.102462
7. **[EUCAST] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018.** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations 2018. V.2.0 Septembre. [Internet]. Disponible en: https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2018/12/CASFMV2_SEPTEMBRE2018.pdf
8. **Gordillo FC, Koga I., Peña N. 2019.** Detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productoras de β-lactamasas de espectro extendido aisladas de aves de abasto en Perú. *Biotempo* 16: 181-186. doi: 10.31381/biotempo.v16i2.2528
9. **Granda A, Riveros M, Martínez-Puchol S, Ocampo K, Laureano-Adame L, Corujo A, Reyes I, et al. 2019.** Presence of extended-spectrum β-lactamase, CTX-M-65 in *Salmonella enterica* serovar *infantis* isolated from children with diarrhea in Lima, Peru. *J. Pediatr Infect Dis* 14: 194-200. doi: 10.1055/s-0039-1685502
10. **Hoffmann S, Devleesschauwer B, Aspinall W, Cooke R, Corrigan T, Havelaar A, et al. 2017.** Attribution of global foodborne disease to specific foods: findings from a World Health Organization structured expert elicitation. *PLoS One* 12(9): e0183641. doi: 10.1371/journal.pone.0183641
11. **[ICMSF] The International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Association of Microbiological Societies. 1978** Microorganisms in foods 1: Their significance and methods of enumeration. 2nd ed. Toronto, Canada: University of Toronto Press. 434 p.
12. **Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kühn K, Schulz K, Balau V, et al. 2012.** High prevalence of extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother* 67: 2631-2634. doi: 10.1093/jac/dks295
13. **Langsrud S, Sorheim O, Skuland SE, Almili VL, Jensen MR, Grovlen MS, et al. 2020.** Cooking chicken at home: common or recommended approaches to judge doneness may not assure sufficient inactivation of pathogens. *PLoS One* 15(4): e0230928. doi: 10.1371/journal.pone.0230928
14. **Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Stuart J, Voets GM, Van Den Munchhof MP, Van Essen-Zandbergen A, Platteel T, et al. 2011.** Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* 17: 873-80. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03497
15. **Marshall BM, Levy SB. 2011.** Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24: 718-733. doi: 10.1128/CMR.00002-11

16. **[MINAG] Ministerio de Agricultura. 2019.** Boletín estadístico mensual de la producción y comercialización avícola marzo 2019. [Internet]. Disponible en: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=noticias/produccion-y-comercializacion-avicola-marzo-2019>
17. **[MINSAL] Ministerio de Salud. 2008.** Resolución Ministerial N.º 591-2008. [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/normas-legales/247682-591-2008-minsa>
18. **Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, Ecker L, et al. 2009.** High frequency of antimicrobial resistance of diarrheagenic *E. coli* in Peruvian infants. *Am J Trop Med Hyg* 81: 296-301.
19. **Ojer-Usoz E, González D, Vitas AI, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano M de L. 2013.** Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* 93: 316- 321. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.09.009
20. **[OMS] Organización Mundial de Salud. 2018.** Salmonella (no tifoidea). [Internet]. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))
21. **[OMS] Organización Mundial de Salud. 2021.** Enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). [Internet]. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:2015-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=es
22. **Perozo Mena A, Marín M, Maribel C, Ling Toledo, E, Núñez D, Messaria G, Villasmil J, et al. 2017.** Detección de betalactamasas de espectro extendido en Enterobacteriaceae en un Centro de Salud de Maracaibo, Venezuela. *Kasmera* 45: 88-99.
23. **Rahman MM, Husna A, Elshabrawy HA, Alam J, Runa NY, Badruzzaman AT, Banu NA, et al. 2020.** Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* from chicken meat. *Sci Rep* 10: 21999. doi: 10.1038/s41598-020-78367-2
24. **Rosas MR. 2007.** Contaminaciones alimentarias. *Offarm* 26(6): 95-100.
25. **Rouger A, Tresse O, Zagorec M. 2017.** Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. *Microorganisms* 5: 50. doi: 10.3390/microorganisms5030050
26. **Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, Durand D, et al. 2018.** Presencia de Enterobacterias y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 35: 425-32. doi: 10.17843/rpmesp.2018.353.3737
27. **Saenz-García CE, Castañeda-Serrano P, Mercado Silva EM, Alvarado CZ, Nava GM. 2020.** Insights into the identification of the specific spoilage organisms in chicken meat. *Foods* 9: 225. doi: 10.3390/foods9020225
28. **Santos PD, Widmer KW, Rivera WL. 2020.** PCR-based detection and serovar identification of *Salmonella* in retail meat collected from wet markets in Metro Manila, Philippines. *PLoS One* 15(9): e0239457. doi: 10.1371/journal.pone.0239457
29. **[SENASA] Servicio Nacional de Sanidad Agraria. 2007.** Decreto Supremo N.º 029-2007-AG. Aprueban reglamento del sistema sanitario avícola. [Internet]. Disponible en: <https://www.senasa.gob.pe/senasa/legislacion-3/>
30. **Seral García C, Pardos de la Gándara M, Castillo García FJ. 2010.** Extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 12-18. doi: 10.1016/S0213-005X(10)70003-3
31. **Shrestha A, Bajaracharya AM, Subedi H, Turha RS, Kafle S, Sharma S, Neupane S, et al. 2017.** Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bac-

- teria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. BMC Res Notes 10: 574. doi: 10.1186/s13104-017-2917-x
32. **Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, et al. 2010.** Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health, FEMS Microbiol Rev 34: 295-316. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00198.x
 33. **Thrusfield M. 1990.** Epidemiología veterinaria. Zaragoza, España: Ed. Acribia. 335 p.
 34. **Tyrer S, Heyman B. 2016.** Sampling in epidemiological research: issues, hazards and pitfalls. BJPpsych Bull 40: 57-60. doi: 10.1192/pb.bp.114.050203
 35. **Vitas AI, Naik D, Perez-Etayo L, González D. 2018.** Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae through the consumption of chicken and sushi products. Int J Food Microbiol 269: 80-86. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.01.026
 36. **Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. 2010.** Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken. Lett Appl Microbiol 50: 362-365. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x
 37. **Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. 2006.** Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J Antimicrob Chemother 57: 154-5. doi: 10.1093/jac/dki412
 38. **Zamudio ML, Meza A, Bailón H, Martínez-Urtaza J, Campos J. 2011.** Experiencias en la vigilancia epidemiológica de agentes patógenos transmitidos por alimentos a través de electroforesis en campo pulsado (PFGE) en el Perú. Rev Peru Med Exp Salud Pública 28: 128-135 doi: 10.17843/rpmesp.2011.-281.467