



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Identificación de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de  
espectro extendido de enterobacterias aisladas en  
muestras de carne de pollo en expendio, en mercados  
de Santiago de Surco, Lima**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias  
Veterinarias con mención en Sanidad Avícola

**AUTOR**

Valeria Romina CORTEZ SANDOVAL

**ASESOR**

Dra. Daphne Doris RAMOS DELGADO

Lima, Perú

2023



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

---

Cortez V. Identificación de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido de enterobacterias aisladas en muestras de carne de pollo en expendio, en mercados de Santiago de Surco, Lima [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria/Unidad de Posgrado; 2023.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	Valeria Romina Cortez Sandoval
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47945671
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0002-0822-8814">https://orcid.org/0000-0002-0822-8814</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Daphne Doris Ramos Delgado
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	07607293
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-3176-804X">https://orcid.org/0000-0003-3176-804X</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Rosa Isabel González Veliz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10300467
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Juan José Siuce Moreno
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	42807429
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Luis Miguel Jara Salazar
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	43235088

<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	Calidad e inocuidad de alimentos
Grupo de investigación	Salud pública y salud ambiental
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de San Marcos. PCONFIGI. Resolución 03556-R-19. A19080421 (Código de proyecto).
Ubicación geográfica de la investigación	Ubicación: Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental y Laboratorio de patología aviar. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: San Borja Dirección: Av. Circunvalación Cuadra 28 Latitud: -12.08157 Longitud: -76.98773
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Obligatorio. Ejemplo: Marzo 2019 – Diciembre 2019
URL de disciplinas OCDE	Salud pública, Salud ambiental <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.03.05</a>  Biología celular, Microbiología <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</a>  Bioquímica, Biología molecular <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</a>



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS EN MODALIDAD VIRTUAL PARA OPTAR  
EL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS VETERINARIAS CON  
MENCIÓN EN SANIDAD AVICOLA

En la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 09:00 horas del día martes 09 de mayo del 2023, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por la Mg. Rosa Isabel González Veliz y conformado por los siguientes miembros docentes: Mg. Luis Miguel Jara Salazar, Dr. Juan José Siuce Moreno y Dra. Daphne Doris Ramos Delgado (**Asesora**), se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

**“Identificación de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido de enterobacterias aisladas en muestras de carne de pollo en expendio, en mercados de Santiago de Surco, Lima”**, presentado por la Bachiller:

**VALERIA ROMINA CORTEZ SANDOVAL**

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Avícola y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de:  
MUY BUENO, (17) DIECISIETE

A continuación, el Jurado por intermedio de su Presidente recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del Grado Académico de Magíster en Ciencias Veterinarias con mención en Sanidad Avícola, a la Bachiller Valeria Romina Cortez Sandoval.

Siendo las 10: 40 horas del día martes 09 de mayo de 2023, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.



Firmado digitalmente por GONZALEZ  
VELIZ Rosa Isabel FAU 20148092282  
soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 10.05.2023 19:53:57 -05:00

Mg. Rosa Isabel González Veliz (P.A.D.E.)  
**Presidente**

Mg. Luis Miguel Jara Salazar  
**Miembro externo**



Firmado digitalmente por SIUCE  
MORENO Juan Jose FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 10.05.2023 16:20:36 -05:00

Dr. Juan José Siuce Moreno (P.Ax.D.E.)  
**Miembro**



Firmado digitalmente por RAMOS  
DELGADO Daphne Doris FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 10.05.2023 21:56:12 -05:00

Dra. Daphne Doris Ramos Delgado (P.P.D.E.)  
**Miembro (Asesora)**



Firmado digitalmente por GAVIDIA  
CHUCAN Cesar Miguel FAU  
20148092282 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 16.05.2023 15:13:17 -05:00

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)  
**Director de la Unidad de Posgrado UNMSM**

## INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

1. FACULTAD: **Medicina Veterinaria**
2. UNIDAD DE POSGRADO: **Medicina Veterinaria**
3. AUTORIDAD ACADÉMICA QUE EMITE EL INFORME DE ORIGINALIDAD:  
**Director UPG-FMV-UNMSM**
4. APELLIDOS Y NOMBRES DE LA AUTORIDAD ACADÉMICA: **Gavidia Chucán,  
César Miguel**
5. OPERADOR: **César Miguel Gavidia Chucán**
6. DOCUMENTO EVALUADO: **“Identificación de genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido de enterobacterias aisladas en muestras de carne de pollo en expendio, en mercados de Santiago de Surco, Lima”.**
  - a. Proyecto de Tesis de Maestría
  - b. Proyecto de Tesis de Doctorado
  - c. Tesis de Doctorado
  - d. Tesis de Maestría
  - e. Trabajo de Segunda Especialidad
  - f. Otros
7. AUTOR DEL DOCUMENTO: **Valeria Romina Cortez Sandoval**
8. FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO: **26 de mayo de 2022**
9. FECHA DE APLICACIÓN DEL PROGRAMA INFORMÁTICO DE SIMILITUDES:  
**18 de junio de 2022**
10. PROGRAMA UTILIZADO
  - a. Turnitin
  - b. Ithenticate
  - c. Otro (especificar)

11. CONFIGURACIÓN DEL PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES

- a. Excluye textos entrecomillados
- b. Excluye bibliografía
- c. Excluye cadenas menores a 40 palabras
- d. Otro criterio (especificar)

12. PORCENTAJE DE SIMILITUDES SEGÚN PROGRAMA DETECTOR DE SIMILITUDES

7 %

13. FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS:  
**se adjunta reporte del programa**

14. OBSERVACIONES:  
**Ninguna**

15. CALIFICACIÓN DE ORIGINALIDAD

- a. Documento cumple criterio de originalidad, sin observaciones
- b. Documento cumple criterio de originalidad, con observaciones
- c. Documento no cumple con criterio de originalidad.

16. FECHA DEL INFORME  
**20 de junio de 2022**

  
  
Dr. César Gavidia Chucán  
Director de la UPG



*Dedico esta tesis a:*

*A Dios por darme la vida, permitirme dar este gran paso y hacerme recordar que los logros son un premio para uno mismo.*

*A mis seres queridos.*

## **Agradecimientos**

Al Vicerectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) de la UNMSM por la financiación de este trabajo.

Al laboratorio de Salud Pública y Salud ambiental y al laboratorio de Patología avar por brindarme su hospitalidad e instalaciones para que se pueda realizar este estudio.

A la Dra. Daphne Ramos por su orientación, experiencia y motivación.

A la Dra. Rosa González por su experiencia y consejos.

A todas y cada una de las personas que me apoyaron en este camino.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE CUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ANEXOS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1. Familia <i>Enterobacteriaceae</i> .....	3
1.1 Características de las <i>Enterobacteriaceae</i> .....	3
1.2 Etiología de las <i>Enterobacteriaceae</i> .....	3
1.3 Mecanismos de diseminación de material genético.....	4
1.3.1 Mecanismo de transformación.....	4
1.3.2 Mecanismo de conjugación.....	4
1.3.3 Mecanismo de transducción.....	4
1.4 Resistencia antimicrobiana.....	5
1.4.1 Origen y variantes de las $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.....	5
2. Epidemiología.....	10
2.1 Factores de riesgo.....	10
2.2 Enterobacterias productoras de BLEE aisladas en carne de pollo.....	12
3. Impacto sobre la Salud Pública.....	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
1. Lugar de ejecución y periodo de duración.....	22
2. Descripción de Material.....	22
3. Metodología.....	24

3.1	Tamaño muestral.....	24
3.2	Recolección de muestras.....	25
3.3	Procedimiento microbiológico.....	26
3.3.1	Aislamiento bacteriano.....	26
3.3.2	Identificación bioquímica.....	26
3.3.3	Análisis de susceptibilidad.....	27
3.4	Procedimiento molecular.....	28
3.4.1	Extracción de ADN.....	28
3.4.2	Análisis y detección molecular.....	28
4.	Análisis de datos.....	30
IV.	RESULTADOS.....	31
V.	DISCUSIÓN.....	36
VI.	CONCLUSIONES.....	43
VII.	RECOMENDACIONES.....	44
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
IX.	ANEXOS.....	53

## RESUMEN

Enterobacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, entre otras, han desarrollado distintos mecanismos de resistencia en el tiempo, siendo uno de los principales la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Este mecanismo se ha reportado a través del diagnóstico molecular en enterobacterias aisladas en carne de pollo en distintos países, lo que representa un riesgo para la salud pública. Por ello, el objetivo del estudio fue determinar los genes de resistencia a BLEE procedentes de enterobacterias aisladas en muestras de carne de pollo, distribuidas en mercados del distrito de Santiago de Surco, Lima. Se colectaron cortes de carne de pollo (ala y pierna), los que se trasladaron en condiciones de refrigeración (4°C) para su procesamiento. Para el aislamiento microbiológico se utilizaron los agares EMB y TSA y para la caracterización bioquímica de género y especie se utilizó el kit EnteroPluri-Test® Liofilchem. Para el análisis de susceptibilidad antimicrobiana se utilizaron dos métodos, Kirby-Bauer inicialmente y Jarlier para la confirmación. A las enterobacterias confirmadas se les realizó el diagnóstico molecular para genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido. Se usó un PCR simple, con ensayos para la amplificación de genes CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9, y un PCR dúplex para la amplificación de genes TEM y SHV. El 100% (12/12) de enterobacterias presentaron al menos un gen de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido y fueron positivas para el gen CTX-M-1, el 83.3% (10/12) fue positivo para el gen TEM, el 16.7% (2/12) positivo para el gen CTX-M-9. Adicionalmente, el 100% de cepas fueron negativas a los genes CTX-M-2 y SHV. Se concluye que la carne de pollo vendida por mercados del distrito de Santiago de Surco, contiene enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) con al menos un gen de resistencia.

**Palabras clave:** BLEE, carne, pollo, genes, enterobacterias

## ABSTRACT

*Enterobacteriaceae* such as *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Enterobacter* spp, among others, have developed different resistance mechanisms over the time, one of the main mechanisms is the production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL). This mechanism has been reported through molecular diagnoses in *enterobacteriaceae* isolated from chicken meat in different countries, which represents a health risk. For this reason, the objective of the study was to determine the genes of resistance to extended spectrum  $\beta$ -lactams coming from *enterobacteriaceae* isolated from chicken meat samples, distributed in markets of the district of Santiago de Surco, Lima. Chicken meat cuts (wing and leg) were collected, distributed by supply centers, which were transferred under refrigeration conditions (2-4°C) for processing. Microbiological isolation of *enterobacteriaceae* in EMB and TSA agars was performed, then biochemical characterization of genus and bacterial species was performed through the EnteroPluri-Test® kit. Subsequently, the antimicrobial susceptibility analysis was performed using the Kirby-Bauer screening method and to confirm the Jarlier method. Positive *enterobacteriaceae* to the second method were processed for the molecular diagnosis of extended-spectrum  $\beta$ -lactam resistance genes. Simple PCR method was performed for amplification of CTX-M-1 genes, CTX-M-2 and CTX-M-9, and a duplex PCR for amplification of TEM and SHV genes. 100% (12/12) of *enterobacteriaceae* presented at least one resistance gen to extended spectrum  $\beta$ -lactams. 100% (12/12) were positive for the detection of the CTX-M-1 gen, 83.3% (10/12) was positive for the TEM gen, 16.7% (2/12) positive for the CTX-M-9 gene. Additionally, 100% of strains were negative for the CTX-M-2 and SHV genes. This study concludes that retail chicken meat sold by markets in Santiago de Surco district, contains extended-spectrum  $\beta$ -lactamases-producing *enterobacteriaceae* (ESBL) with at least one resistance gen.

**Key words:** PCR, ESBL, meat, chicken, *enterobacteriaceae*

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AMC20-10: Amoxicilina/ácido clavulánico
- BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido
- CLSI: por sus siglas en inglés de Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio - USA)
- AMC: Amoxicilina con ácido clavulánico
- ATM: Aztreonam
- CTX: Cefotaxima
- CAZ: Ceftazidima
- CPD: Cefpodoxima
- CRO: Ceftriaxona
- EMB: Agar Eosina y Azul de Metileno
- ETA: Enfermedades transmitidas por alimentos
- FDA: por sus siglas en inglés de Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos - USA)
- MDR: Multidrogoresistencia
- MLST: Tipificación multilocus de secuencias
- MH: Müller-Hinton
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PCR: por sus siglas en inglés Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
- Pi: Punto isoeléctrico
- SAM20: Ampicilina-sulbactam
- SXT25: Trimetoprim/sulfametoxazol
- TSA: Agar Tripticasa Soya
- TSB: Caldo Tripticasa Soya
- BPH: Buenas prácticas de higiene
- BPM: Buenas prácticas de manipulación

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación esquemática de $\beta$ -lactamasas.....	7
Cuadro 2. Condiciones de amplificación de ADN para genes TEM y SHV.....	30
Cuadro 3. Condiciones de amplificación de ADN para genes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9.....	30
Cuadro 4. Proporción de cepas sospechosas de producir BLEE y cepas confirmadas mediante análisis de susceptibilidad.....	32
Cuadro 6. Proporción de enterobacterias positivas a genes BLEE.....	35



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de diseminación genética entre bacterias.....	5
Figura 2. Primeros reportes de BLEE en enterobacterias .....	6
Figura 3. Agrupación de enzimas BLEE mediadas por plásmidos .....	7
Figura 4. Familias de $\beta$ -lactamasas de importancia clínica .....	10
Figura 5. Principales indicadores de la actividad avícola.....	11
Figura 6. Identificación de genes BLEE en <i>E. coli</i> de alimentos de origen animal en España.....	13
Figura 7. Detección de cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEE en 11 muestras de alimentos de origen animal en Túnez.....	14
Figura 8. Características genotípicas de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en carne de pollo, Turquía.....	14
Figura 9. Prevalencia de diferentes genes BLEE en enterobacterias aisladas de heces de animales destinados a consumo humano en Suiza en comparación a aislados de humanos enfermos.....	15
Figura 10. Distribución de genes BLEE en carne de pollo (A), hisopados rectales humanos (B), y cultivos de sangre humana (C), en Holanda.....	16
Figura 11. Resultados de tipificación de cepas (tipificación de secuencia multi-locus) y plásmidos (tipificación de secuencia multi-locus de plásmidos y gupo- <i>Inc</i> ).....	17
Figura 12. Proporción de resistencia de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de bursas de Fabricio en pollos de engorde a $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, fenicoles y asociaciones de antibióticos con inhibidores de $\beta$ -lactamasas.....	20

Figura 13. Fórmula sistematizada del tamaño de muestra para la detección de una enfermedad o prevalencia límite.....	24
Figura 16. Caracterización bioquímica.....	27
Figura 17. Parámetros de resistencia a $\beta$ -lactámicos para el análisis de susceptibilidad Kirby-Bauer .....	28
Figura 18. Secuencias de cebadores para los genes SHV, TEM, CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9.....	29

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Flujo de aislamiento bacteriano.....	54
Anexo 2. Aislamientos bacterianos en agar EMB y TSA.....	55
Anexo 3. Identificación bioquímica.....	57
Anexo 4. Análisis de susceptibilidad mediante el método Kirby – Bauer, para detección de cepas sospechosas de producción de BLEE.....	58
Anexo 5. Análisis de susceptibilidad mediante método de doble disco, para detección de cepas confirmadas de producción de BLEE.....	59
Anexo 6. Electroforesis para la detección de genes CTX-M-1 (415 bp).....	60
Anexo 7. Electroforesis para la detección de genes CTX-M-9 (205 bp).....	61
Anexo 8. Electroforesis para la detección de genes CTX-M-2 (552 bp).....	62
Anexo 9. Electroforesis de PCR dúplex para la detección de TEM (516 bp) y SHV (392 bp).....	63
Anexo 10. Método GenJET Genomic DNA Purification kit Thermo Scientific™.....	64
Anexo 11. Electroforesis en gel agarosa.....	66

## I. INTRODUCCIÓN

Las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) son enzimas codificadas por genes de resistencia ubicados en el ADN bacteriano, encontrándose principalmente en enterobacterias. Todos los genes de resistencia se han generado de manera natural (Philippon *et al.*, 1989; García *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado que estos genes también se encuentran en segmentos del ADN como transposones e integrones, los cuales han conferido a la bacteria la capacidad de transmitir su material genético entre bacterias de la misma especie e inclusive entre especies (Holmes y Jobling 1996; Furuya y Lowy 2006). Se ha demostrado que en carne de pollo prevalecen múltiples enterobacterias productoras de BLEE, las cuales pueden perjudicar la salud del consumidor, debido a la capacidad que tienen de diseminar su código genético y transmitir sus genes de resistencia (Marshall y Levy, 2011; Shrestha *et al.*, 2017).

En el Perú, se han realizado estudios donde se han reportado enterobacterias productoras de BLEE tales como *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica* y *Serratia marscecens* aisladas en carne de res comercializada en mercados y supermercados (Cortez-Sandoval y Shiva, 2019). No obstante, sólo hay un estudio que revela la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de carne de pollo en mercados de Lima (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018). Los estudios mencionados, son descriptivos a nivel microbiológico. Sin embargo, no hay datos adicionales sobre los genes que puedan manifestar el fenotipo de resistencia. Este dato es importante, debido a que los resultados obtenidos podrían ser utilizados para estudios epidemiológicos y de correlación con hallazgos reportados en aislamientos de origen humano. Entre los patógenos relacionados a enfermedades humanas, tenemos a *Salmonella* spp., comúnmente asociado a diarreas, fiebre y calambres abdominales, la cual puede transmitirse directa o indirectamente entre humanos y animales; además de alimentos mal cocidos (Ochoa *et al.*, 2009; Marshall y Levy, 2011; Granda *et al.*, 2019). Por otro lado, patógenos como *E. coli*, son responsables de bacteremias en niños menores de 1 año y pacientes inmunosuprimidos. Adicionalmente, se ha reportado una prevalencia de *E. coli* diaerreogénicas del 43% en niños de áreas rurales y 30% en niños con o sin diarrea de áreas periurbanas del Perú (Acosta *et al.*, 2016). Es importante resaltar que las enterobacterias patógenas como no patógenas pueden ser portadoras de genes de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos. Enterobacterias como *E. coli* no diaerreogénica, *Serratia marscecens*, *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp., entre otras, si bien no son patógenas se pueden incorporar a la microbiota intestinal, pudiendo actuar como reservorios de genes de resistencia y a su vez transmitir estos a otras enterobacterias comensales o patógenas del tracto gastrointestinal (Vincent *et al.*, 2010).

El alto consumo de carne de pollo en el Perú produce el riesgo de transmisión de genes de resistencia hacia el ser humano, es por ello que el objetivo del presente estudio fue determinar los genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos de espectro extendido en enterobacterias aisladas de carne de pollo expandidas en mercados del distrito de Santiago de Surco. Este estudio servirá como base de futuras investigaciones relacionados con genes de resistencia no solamente en carne de pollo, sino también en aislamientos de origen en granja y muestras humanas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 1. FAMILIA *ENTEROBACTERIACEAE*

#### 1.1. Características de las *Enterobacteriaceae*

Pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, las enterobacterias son bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos (con excepción de *Pleisomonas*), reducen los nitratos a nitritos, fermentan glucosa y en su mayoría son móviles. La detección bioquímica por género y especie es determinada por la fermentación de azúcares como la lactosa, prueba de indol, citrato, sorbitol, urea, voges-proskauer, entre otros (Borman *et al.*, 1944; Octavia y Lan 2014). Entre las principales enterobacterias se han clasificado a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia* spp, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp, *Pantoea* spp, entre otras (Octavia y Lan 2014).

#### 1.2. Etiología de las *Enterobacteriaceae*

Las enterobacterias son microorganismos ubicuos, encontrándose en: plantas, suelos, microbiota de animales y humanos, etc. (Octavia y Lan 2014). Sin embargo, también se han aislado en carne, siendo considerado este alimento como un vehículo de transmisión de enfermedades (FAO, 2020). 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, 2019). 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  $\beta$ -lactámicos (Ochoa *et al.*, 2009; Granda *et al.*, 2019). 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).

### **1.3 Mecanismos de diseminación de material genético**

Se han determinado distintos mecanismos para la transmisión de información genética entre bacterias. Los mecanismos conocidos son la transformación, la conjugación y la transducción bacteriana (Holmes y Jobling 1996; Furuya y Lowy 2006) (Figura 1).

#### **1.3.1. Mecanismo de transformación**

El mecanismo de transformación bacteriana se fundamenta en la absorción del material genético o plásmidos, por parte de una bacteria receptora. El material genético es originario de una bacteria donadora, la cual, al morir, deja su material genético libre (Holmes y Jobling 1996; Furuya y Lowy 2006).

#### **1.3.2. Mecanismo de conjugación**

El mecanismo de conjugación bacteriana consiste en la introducción del material genético (plásmidos conjugativos o factor F) de una bacteria donadora a una receptora a través de un pili, el cual funciona como un puente citoplasmático entre ellas. Esta capacidad conjugativa permite a la bacteria receptora introducir el factor F dentro de su ADN cromosómico o mantenerlo aislado como plásmido. Es importante mencionar que algunas cepas de enterobacterias como *Escherichia coli*, pueden introducir su factor F donado en secuencias de inserción (transposones) dentro del ADN cromosomal, lo cual ayuda a la perpetuación del material genético a través de elementos o cassettes móviles entre bacterias (Holmes y Jobling 1996; Furuya y Lowy 2006).

#### **1.3.3. Mecanismo de transducción**

El mecanismo de transducción es mediado por bacteriófagos, los cuales funcionan como vectores, inyectando su material genético en la bacteria. El material genético del bacteriófago contiene secuencias aleatorias del genoma de una bacteria anteriormente infectada, de esta manera se transmite el material genético entre bacterias. Existen dos ciclos en el mecanismo de transducción, el lítico y el lisogénico. En la fase lítica, se sintetizan proteínas a partir del genoma insertado, generando poblaciones virales hasta la ruptura de la bacteria, en donde se diseminan las partículas virales. En el ciclo lisogénico, el material genético se recombina con el cromosoma bacteriano, posteriormente la célula continúa con su división celular hasta que las partículas virales activen la lisis bacteriana (Holmes y Jobling 1996; Furuya y Lowy 2006).

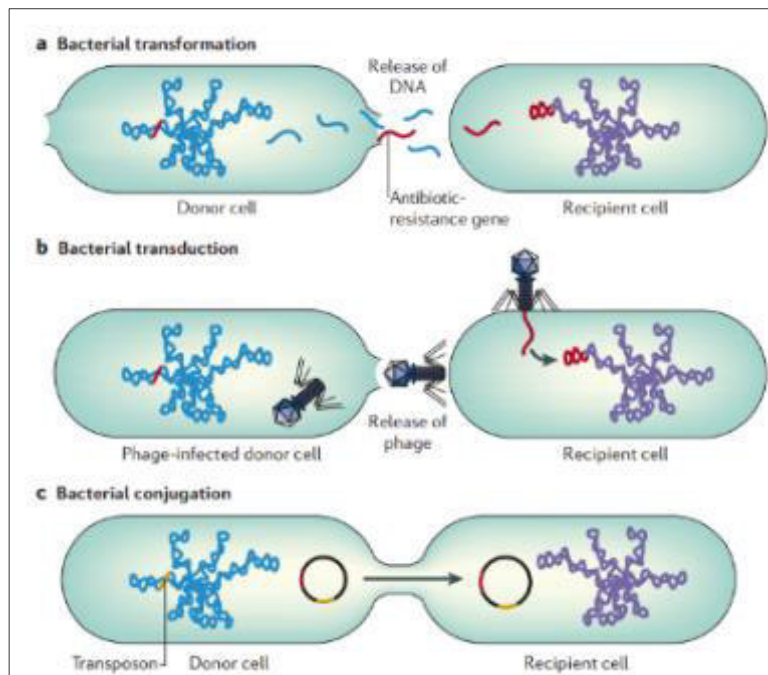


Figura 1. Mecanismos de diseminación genética entre bacterias

Fuente: Furuya y Lowy 2006.

## 1.4. Resistencia antimicrobiana

### 1.4.1 Origen y variantes de las $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

Desde el descubrimiento de la Penicilina en 1940, la utilización indiscriminada de antibióticos  $\beta$ -lactámicos generó la producción de enzimas  $\beta$ -lactamasas (cromosómicas naturales como TEM, SHV y OXA), las cuales sólo ejercían efecto hidrolítico en algunos  $\beta$ -lactámicos como ampicilina, oxacilina y cefalotina (Philippon *et al.*, 1989; García *et al.*, 2010). Con el tiempo se reportaron  $\beta$ -lactamasas con mayor espectro hidrolítico, las denominadas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) (Philippon *et al.*, 1989; Jacoby y Medeiros 1991), las cuales se determinaron como enzimas codificadas por elementos genéticos móviles (generalmente localizadas en transposones o integrones), permitiendo su diseminación entre bacterias de la misma especie o distintas (Oliver y Cantón, 2005; García *et al.*, 2010). Estas enzimas se definen como el mayor mecanismo de resistencia frente a  $\beta$ -lactámicos, debido a su capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico de cualquier antibiótico de esta familia, con excepción de cefamicinas, y carbapenémicos (García *et al.*, 2010). Además de ello, se ha podido evidenciar resistencia cruzada entre antibióticos de clases distintas a  $\beta$ -lactámicos como quinolonas, aminoglucósidos o cotrimoxazol (Oliver y Cantón, 2005; Perozo y Castellano, 2009). Es necesario mencionar que las



BLEE pueden ser inhibidas por combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam (Perozo y Castellano, 2009; García *et al.*, 2010).

Las BLEE secuenciadas por primera vez fueron las TEM y SHV en *Klebsiella* spp en Alemania en 1983. En los primeros reportes se indicaban que el espectro de acción se limitaba solo a algunos  $\beta$ -lactámicos (ampicilina, oxacilina y cefalotina) (Phillipon *et al.*, 1989). Sin embargo, un año después en Francia, se describieron mutaciones de TEM, en *Klebsiella* spp, denominadas CTX-M-1, con fenotipo de resistencia para cefotaxima. En la Figura 2 se pueden observar las primeras mutaciones de BLEE reportadas.

Especies (países) en donde la enzima fue detectada	Año del primer aislamiento	
	$\beta$ -lactamasas	Pi* (I) o reporte ®
<i>Klebsiella ozaenae</i> (República federal de Alemania)	SHV-2 CTX-1	7.6 1983 (I)
<i>K. pneumoniae</i> (Francia)	(TEM-3)	6.3 1984 (I)
<i>K. pneumoniae</i> (Francia)	SHV-3	7 1986 (I)
<i>Escherichia coli</i> (Francia)	TEM-4	5.9 1986 (I)
<i>E. coli</i> (República Federal de Alemania)	TEM-6 RHH-1	5.9 1987 (R)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Inglaterra)	(TEM-9) CAZ-1	5.5 1987 (R)
<i>K. pneumoniae</i> (Francia)	(TEM-5)	5.55 1987 (I)
<i>K. pneumoniae</i> (Francia)	CAZ-2	5.9 1987 (I)
<i>K. pneumoniae</i> (Francia)	CAZ-3	5.2 1987 (I)
<i>K. pneumoniae</i> (Francia)	SHV-4	7.75 1987 (I)
<i>K. pneumoniae</i> (Chile)	SHV-5	8.2 1987 (I)
<i>Citrobacter freundii</i> (Francia)	TEM-7	5.41 1988 (R)

Pi\*: Punto isoeléctrico

Figura 2. Primeros reportes de BLEE en enterobacterias Fuente: Phillipon *et al.*, 1989.

Cerca al inicio del año 2000, ya se habían detectado genes BLEE presentes en animales. En Japón se reportó *E. coli* resistente a cefotaxima, aislada de muestras fecales de *Canis familiaris* (Matsumoto *et al.*, 1988; Bonnet, 2004). En sudamérica ya se habían detectado genes BLEE en enterobacterias patógenas para el ser humano, distintas de *Klebsiella* sp. y *E. coli*, como *Salmonella* spp. (CTX-M-1) (Bauernfeind *et al.*, 1992; Radice *et al.*, 2002).

Jacob y Medeiros (1991), designan grupos de genes BLEE, basados en la sustitución de aminoácidos en el ADN plasmídico. En la actualidad, las BLEE son el principal mecanismo de resistencia a  $\beta$ -lactámicos (Ojer-Usoz *et al.*, 2013). En la Figura 3 se pueden observar los grupos CTX-M enzimáticos

Grupo	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
<b>Enzimas</b>	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-8	CTX-M-9	CTX-M-25
	CTX-M-3	CTX-M-4		CTX-M-13	CTX-M-26
	CTX-M-10	CTX-M-4L		CTX-M-14	
	CTX-M-12	CTX-M-5		CTX-M-16	
	CTX-M-15	CTX-M-6		CTX-M-17	
	FEC-1	CTX-M-7		CTX-M-19	
	CTX-M-22	CTX-M-20		CTX-M-21	
	CTX-M-23	Toho-1		CTX-M-27	
	CTX-M-28			Toho-2	
				CTX-M-24	

Figura 3. Agrupación de enzimas BLEE mediadas por plásmidos

Fuente: Bonnet, 2004.

En la actualidad existen mas de 150 variantes de genes BLEE y existen diferentes reportes en relación a su nomenclatura y clasificación (Ambler, 1980; Ambler y Coulson, 1991; Bush y Jacoby, 2010). Sin embargo, la clasificación actual se determina mediante la secuencia proteica en cuatro clases, A, B, C y D (Bush y Jacoby, 2010) (Cuadro 1). Adicionalmente, Bush y Jacoby, 2010, también han diseñado un esquema de clasificación de genes BLEE en relación a su fenotipo de resistencia (Figura 4).

Cuadro 1. Clasificación esquemática de  $\beta$ -lactamasas (Adaptado de Bush *et al.*, 2010)

Grupo	Grupo	Clase	Sustrato	Inhibido	Características de	Enzima(s)
				por		
Bush- Jacob (2009)	Jacoby- Medeiros (1995)	molecular (subclase)	distintivo	AC <sup>a</sup> o TZB <sup>a</sup>	definición	

1	1	C	Cefalosporinas	No	Mayor hidrólisis de cefalosporinas sobre bencilpenicilinas; hidroliza cefamicinas	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI <sup>b</sup>	C	Cefalosporinas	No	Aumento de hidrólisis de ceftazidima, a menudo oximinobetalactamasas	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilina	Yes	Mayor hidrólisis de bencilpenicilina que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de primera generación	Yes	Hidrólisis similar de bencilpenicilinas y cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas y monobactamicos de espectro extendido	Yes	Aumento de hidrólisis de cefotaxima, ceftazidimas, ceftriaxona, cefepima, aztreonam	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillinas	No	Resistencia a ácido clavulánico, sulbactam, y aztreonam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas y monobactamicos de espectro extendido	No	Aumento de hidrólisis de oximinobetalactámicos además de resistencia a ácido clavulánico, sulbactam y tazobactamcefotaxima, ceftazidimas, ceftriaxona, cefepima, aztreonam	TEM-50
2ce	2c	A	Carbenicilina	Yes	Incremento en la hidrólisis de carbenicilina	PSE-1. CARB-3.

2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepima	Yes	Incremento en la hidrólisis de carbenicilina, cefepima, y cefpiroma	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variable	Incremento en la hidrólisis de cloxacilina u oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro extendido	Variable	Hidrólisis de cloxacilina u oxacilina y oximinobetalactámicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenémicos	Variable	Hidrólisis de cloxacilina u oxacilina y carbapenémicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro extendido	Yes	Hidrólisis de cefalosporinas. Inhibición de ácido clavulánico mas no de aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenémicos	Variable	Incremento de hidrólisis de carbapenémicos, oximinobetalactamasas, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1); B (B3)	Carbapenémicos	No	Hidrólisis de amplio espectro incluyendo carbapenémicos mas no monobactámicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenémicos	No	Hidrólisis preferencial por carbapenémicos.	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconocido				

<sup>a</sup> AC, ácido clavulánico; TZB, tazobactam

<sup>b</sup> NI, no incluido

Familia de la enzima	Grupo funcional o subgrupo	Número de enzimas	Enzimas representativas
CYM	1, 1e	50	CMY-1 to CMY-50
	2b, 2be, 2 br, 2ber	172	
TEM	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30, TEM-31, TEM-163
	2ber	9	TEM-50, TEM-158
SHV	2b, 2be, 2 br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72
CTX-M	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) to CTX-M-92
PER	2be	5	PER-1 to PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 to VEB-7
GES	2f	15	GES-2 to GES-7 to GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 to KPC-10
SME	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
	2d, 2de, 2df	158	
OXA	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48	OXA-23, OXA-51, OXA-58
IMP	3a	26	IMP-1 to IMP-26
VIM	3a	23	VIM-1 to VIM-23
IND	3a	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 to IND-7

Figura 4. Familias de  $\beta$ -lactamasas de importancia clínica

Fuente: Bush *et al.*, 2010.

## 2. EPIDEMIOLOGÍA

### 2.1. Factores de riesgo

El Perú es un país consumidor de carne de pollo, el consumo per capita de carne de pollo a nivel nacional en marzo del año 2019, fue de 4.2 kg/hab/mes (MINAG, 2019), lo cual indica un mayor consumo per

capita en función a los resultados reportados en marzo de 2018 (3.97 kg/hab/mes) (MINAG, 2019). Debido a la alta preferencia del consumidor peruano sobre la carne de pollo, la producción avícola también se ve incrementada. Se puede observar a detalle en la Figura 5.

PRINCIPALES INDICADORES DE LA ACTIVIDAD AVÍCOLA															
2018-2019															
Variable	Año	Inid. Medid	Ene	Feb	Mar	Abr	May	Jun	Jul	Ago	Sep	Oct	Nov	Dic	Ene-Dic
<b>COLOCACIÓN DE POLLO "BB" A NIVEL NACIONAL</b>															
Linea Carne	2018*	(Miles)	62,955.70	56,935.20	65,221	62,423.00	64,669.30	63,118.40	64,949.30	66,129.90	63,498.10	66,410.20	64,207.80	64,311.00	754,824.00
	2019*	(Miles)	67,376.30	60,616.20	66,201.20										
Linea Postura	2018*	(Miles)	2,181.40	2,098.80	2,398.00	2,193.30	2,639.30	2,314.90	2,315.00	2,362.50	2,475.00	2,579.60	2,276.00	2,391.60	28,225.30
	2019*	(Miles)	2,009.10	2,030.90	2,063.40										
<b>PRODUCCIÓN NACIONAL</b>															
Carne ave**	2018*	(toneladas)	132,522	119,408	134,665	139,019	143,161	142,719	147,975	149,982	144,571	146,110	139,600	147,904	1,687,636
	2019*	(toneladas)	139,841	125,499	141,111										
Carne pollo	2018*	(toneladas)	124,475	111,882	126,737	131,563	135,011	134,283	138,488	140,442	134,571	136,487	130,281	137,548	1,581,767
	2019*	(toneladas)	131,638	117,703	132,773										
Huevo de gallina	2018*	(toneladas)	34,871	35,099	35,769	36,372	37,075	37,576	37,790	38,508	38,992	39,468	40,066	40,648	452,234
	2019*	(toneladas)	40,058	40,248	40,240										
<b>PERÚ: CONSUMO PERCÁPITA</b>															
Carne de pollo	2018*	(Kg./hab.)	3.93	3.53	3.97	4.12	4.22	4.19	4.32	4.39	4.22	4.26	4.05	4.26	49.45
	2019*	(Kg./hab.)	4.30	3.74	4.15										
Huevo	2018*	(Unidades)	17	17	18	18	18	19	19	19	19	19	20	20	224
	2019*	(Unidades)	19	20	21										
<b>LIMA METROPOLITANA: CONSUMO PERCÁPITA</b>															
Carne pollo	2018*	(Kg./hab.)	6.71	5.99	6.19	6.36	6.34	6.43	7.27	7.09	7.02	7.02	6.81	7.24	80.47
	2019*	(Kg./hab.)	7.29	6.26	7.01										
Huevo	2018*	(Unidades)	21	22	22	22	22	23	23	23	24	24	24	25	276
	2019*	(Unidades)	21	26	26										
*Preliminar															
**Plantas de incubación															
**Incluye pollo, gallina, pato y pavo															

Figura 5. Principales indicadores de la actividad avícola

Fuente: MINAG, 2019

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). Lo cual indica 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 los últimos años, se ha reportado el aislamiento de enterobacterias como *Salmonella* spp. del alimento destinado a animales de producción, siendo estas resistentes a  $\beta$ -lactámicos y otros antibióticos (Quesada *et al.*, 2016). Este punto refuerza la problemática del origen de la contaminación en la carne, debido a que los antibióticos principalmente son administrados vía oral en las aves. Sin embargo, no se puede descartar contaminación fecal en el alimento de los animales de producción.

## **2.2. Enterobacterias productoras de BLEE aisladas en carne de pollo**

Dentro de las principales enterobacterias aisladas de la carne de pollo, se han reportado: *E. coli* (59%), *Serratia* spp. (17%), *Klebsiella* spp. (15%), *Pantoea* spp. y *Proteus* spp (3%). (Vitas *et al.*, 2018). En mercados tradicionales de Perú se ha aislado *E coli* (95.3%), *Proteus* spp. (57.8%) y *Providencia* spp. (54.7%) (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018).

Estudios realizados en Europa y Asia reportan la presencia de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo y concluyen que la carne es un vehículo importante de microorganismos productores de estos genes (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Ojer-Usoz *et al.*, 2013; Shrestha *et al.*, 2017) y se ha podido observar que las malas prácticas de higiene pueden promover la transmisión de genes BLEE al alimento durante la manipulación como consecuencia de una contaminación cruzada (Tschudin-Sutter *et al.*, 2014; Ojer-Usoz *et al.*, 2013).

Estudios han reportado prevalencias de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo que varían entre 84.0% y 94% (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011; Ojer-Usoz *et al.*, 2013; Nahar *et al.*, 2018). En el Perú, se han realizado estudios descriptivos a nivel microbiológico para la detección de enterobacterias productoras de BLEE en carne (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018; Cortez-Sandoval y Shiva, 2019). Sin embargo, los estudios son limitados, hasta el momento la prevalencia detectada por Ruiz-Roldán *et al.* (2018), en mercados tradicionales de Lima ha sido de 98.2%. Por otro lado, es necesario mencionar que sí se han realizado estudios de detección molecular de *Escherichia coli* productora de BLEE en órganos de aves de corral, en donde se determinó una proporción de 90.3% para el gen CTX-M-1, 8.1% para el SHV y 1.6% para la combinación de CTX-M-1 y SHV (Gordillo *et al.*, 2019).

En países europeos, los autores indican que *E. coli* es la enterobacteria que presenta el mayor número de genes BLEE, dentro de los cuales tenemos a los genes CTX-M (56.0%), TEM (45.1%) y SHV (23.2%) (Ojer-Usoz *et al.*, 2013). El genotipo CTX-M-14, ha sido reportado con mayor frecuencia en *E. coli*, y se ha detectado sólo o en combinación con el gen TEM (46.4%) en distintos estudios (Jouni *et al.*, 2007; Ojer-Usoz *et al.*, 2013) (Figura 6 y 7). Ojer-Usoz *et al.* (2013), también detectaron en las enterobacterias, los genotipos CTX-M-8 y CTX-M-15 en combinación con el gen TEM, respectivamente (Ojer-Usoz *et al.*, 2013) (Figura 6). Por otro lado, también se han hallado genes TEM en enterobacterias distintas a *E. coli*, como *Klebsiella pneumoniae* (50.0%) y *Enterobacter cloacae* (100%); el gen OXA-1 en *Citrobacter koseri* (33.4%), y el gen CTX-M-1 en *Proteus mirabilis* (12.5%) (Ojer-Usoz *et al.*, 2013). Sin embargo, hay variaciones entre las proporciones de genes BLEE, por ejemplo en el estudio de Tekiner y Özpınar (2016), se indica que el gen TEM, solo o en combinación, se detectó en mayor proporción (100%) en enterobacterias aisladas en carne de pollo (Figura 8).

Identified $\beta$ -lactamase genes in <i>E. coli</i> (number of isolates for each type).	
$\beta$ -Lactamase	<i>E. coli</i>
TEM	11
SHV-12	10
OXA-1	0
CTX-M1	4
CTX-M14	25
TEM + SHV-12	9
TEM + CTX-M1	2
TEM + CTX-M8	1
TEM + CTX-M14	13
TEM + CTX-M15	1
Negative	6
Total	82

Figura 6. Identificación de genes BLEE en *E. coli* de alimentos de origen animal en España. El genotipo CTX-M-14, es reportado con mayor frecuencia detectándose sólo o en combinación con el gen TEM (38/82) 46.4%.

Fuente: Ojer-Usoz *et al.*, 2013



<i>E. coli</i> strain	Food origin	Screening of ESBL	Type of $\beta$ -lactamase detected
C923	beef	+	CTX-M-1
C924	beef	+	CTX-M-1
C926	turkey	+	CTX-M-1
C922	beef	+	CTX-M-1
C925	beef	+	CTX-M-1
C920	beef	+	CTX-M-1 + TEM-1 <sup>e</sup>
C930	chicken	+	CTX-M-14 + TEM-1
C929	chicken	+	CTX-M-14 + TEM-1
C921	chicken	+	CTX-M-8
C928	chicken	+	SHV-5
C927 <sup>f</sup>	turkey	-	TEM-1

Figura 7. Detección de cepas de *E. coli* productoras de BLEE en 11 muestras de alimentos de origen animal en Túnez. En carne de pollo se describen combinaciones de genotipos CTX-M-14 y TEM.

Fuente: Jouni *et al.*, 2007

Source	Species	No of isolates	ESBL-type detected by PCR
Raw chicken meat	<i>E. coli</i>	3	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	<i>E. coli</i>	12	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> & <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
	<i>E. coli</i>	1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> & <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>
	<i>E. coli</i>	6	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> & <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
	<i>E. coli</i>	2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> & <i>bla</i> <sub>SHV</sub> & <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
	<i>E. cloacae</i>	1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	<i>E. cloacae</i>	1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> & <i>bla</i> <sub>SHV</sub>
	<i>C. werkmanii</i>	1	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>
	<i>K. pneumoniae</i>	2	<i>bla</i> <sub>TEM</sub> & <i>bla</i> <sub>SHV</sub> & <i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>

Figura 8. Características genotípicas de enterobacterias productoras de BLEE aisladas en carne de pollo, Turquía. El gen *bla*<sub>TEM</sub>, solo o en combinación, se detectó en mayor proporción (100%) en enterobacterias aisladas en carne de pollo.

Fuente: Tekiner y Özpınar, 2016

Kola *et al.* (2012), reportaron que la mayor prevalencia de genes BLEE de enterobacterias aisladas de carne de pollo, fue de SHV-12 (43.9%), seguido de CTX-M-1 (41.2%) y TEM-52 (8.6%), habiéndose identificado combinaciones de genes CTX-M-1 con TEM-52 en cepas de *E. coli* y de CTX-M-1 con SHV-12 en *Escherichia fergusonii*. Por otro lado, se ha podido demostrar que los genes de resistencia SHV-12, CTX-M-1 y TEM-52, identificados en enterobacterias aisladas de carne de pollo, también han sido detectados en aislamientos de aves de corral y en humanos (Kola *et al.*, 2012). También se han reportado enterobacterias productoras de BLEE, en heces de animales, incluidas las de pollos sanos en mataderos autorizados de Suiza en 2012, en donde los genes BLEE de mayor prevalencia, bajo el método de secuenciación, fueron del grupo CTX-M-1 con un 71%, seguido de SHV con un 19% y TEM con 10% (Geser *et al.*, 2012). En el mismo estudio se compartieron datos de proporciones de BLEE en humanos sanos (Geser *et al.*, 2012), en donde el gen de mayor prevalencia fue el CTX-M-15 (grupo 1) con 41%, CTX-M-1 con un 29%, CTX-M-14 (grupo 9) con 21%, CTX-M-2 con 6% y SHV-12 con 3% y se llegó a la conclusión que debido a la alta frecuencia de detección de BLEE del total de muestras de carne de pollo 63% (59/93) y las bajas proporciones de genes BLEE del total de muestras de heces humanas 5.8% (34/586), el origen de infecciones de enterobacterias productoras de genes BLEE no eran de origen animal (Figura 9) (Geser *et al.*, 2012). Sin embargo, en un estudio anterior en Holanda, otros investigadores ya habían descrito que los genotipos BLEE presentes en carne de pollo eran los mismos genotipos detectados en muestras fecales de humanos enfermos (Figura 10) (Overdeest *et al.*, 2011). Adicionalmente se reportó una alta proporción de muestras de carne de pollo contaminadas con *E. coli* productora de BLEE (79.8%) (Overdeest *et al.*, 2011).

Genes	Prevalencia				
	Pollos de carne	Oveja	Res	Cerdo	Humano
CTX-M-1	71% (15/21)	20% (1/5)	59% (10/17)	89% (8/9)	29% (10/34)
CTX-M-15	0%	20% (1/5)	24% (4/17)	0%	41% (14/34)
CTX-M-117	0%	0%	6% (1/17)	0%	0%
CTX-M-14	0%	40% (2/5)	12% (2/17)	11% (1/9)	21% (7/34)
CTX-M-2	0%	0%	0%	0%	6% (2/34)
SHV-12	19% (4/21)	20% (1/5)	0%	0%	3% (1/34)
TEM-52	10% (2/21)	0%	0%	0%	0%
TEM-186	0%	0%	0%	11% (1/9)	0%
TOTAL*	21	5	17	9	34
TOTAL**	59	5	17	9	34
TOTAL***	93	58	124	59	586
Porcentaje total de BLEE	63% (59/93)				5.8% (34/586)
* Total de muestras secuenciadas al azar					
** Total de muestras ESBL detectadas por PCR simple					
*** Total de muestras					

Figura 9. Prevalencia de diferentes genes BLEE en enterobacterias aisladas de heces de animales destinados a consumo humano en Suiza en comparación con aislados de humanos sanos. Fuente: Geser *et al.*, 2012

Genes	Prevalencia		
	Carne de pollo n= 89	Heces humanas n=927	Sangre humana n=31
CTX-M-1	58.1% (50)	45.8% (22)	20.8% (5)
CTX-M-2	4.7% (4)	2.1% (1)	4.2% (1)
CTX-M-14	2.3% (2)	8.3% (4)	33.3% (8)
CTX-M-15	1.2% (1)	12.5% (6)	8.3% (2)
Otras CTX-M	4.7% (4)	6.3% (3)	0.0%
TEM-52	14% (12)	12.5% (6)	4.2% (1)
Otras TEM	0.0%	4.2% (2)	4.2% (1)
SHV-2	1.2% (1)	2.1% (1)	8.3% (1)
SHV-12	14% (12)	0.0%	4.2% (1)
Otras SHV	0.0%	2.1% (1)	12.5% (3)
TOTAL	96% (86/89)	4.96% (46/927)	74.2% (23/31)

Figura 10. Distribución de genes  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido en carne de pollo, hisopados rectales humanos, y cultivos de sangre humana, en Holanda.

Fuente: Overdevest *et al.*, 2011.

### 3. IMPACTO SOBRE LA SALUD PÚBLICA

Uno de los primeros estudios epidemiológicos de referencia alemán reportó que la carne de pollo, pacientes enfermos y aves de corral, comparten las mismas cepas de enterobacterias como *Escherichia coli*, los mismos genes BLEE e inclusive plásmidos (Leverstein-van Hall *et al*, 2011). En este estudio, se detectó que el 84% de 344 aislamientos de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. provenientes de heces humanas, presentaron genes asociados a genes detectados en aves de corral y en carne de pollo. Los genes asociados fueron los CTX-M-1, CTX-M-2, TEM-52, SHV-2 o SHV-12. Las características genotípicas fueron diagnosticadas mediante secuenciación (Leverstein-van Hall *et al*, 2011). Adicionalmente, se pudo demostrar que los genes BLEE detectados en humanos se encontraban en los mismos plásmidos *Incl I* de aislamientos en aves de corral y en carne de pollo. La tipificación plasmídica se realizó utilizando aleatoriamente los genes de mayor proporción detectados (CTX-M-1 y TEM-52) (Figura 11) (Leverstein-van Hall *et al*, 2011).

ESBL-gene	Strain code	Origin	Species	Material	Plasmid typing		IncII typing		E. coli strain typing	
					ESBL localization	Plasmid size (kb)	Clonal complex	Sequence type	Sequence type	
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	148	Human	<i>E. coli</i>	Blood	IncII	100	CC7	ST7	10	
	38.27	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	88	CC7	ST7	10	
	53a, 54a	Retail	<i>E. coli</i>	Chicken meat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10 (n = 2)	
	1365	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	100	CC7	ST7	58	
	1350	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	100	CC7	ST7	58	
	1240	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	95	CC7	ST7	58	
	38.16	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	100	CC7	ST7	58	
	1240	Human	<i>E. coli</i>	Urine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	58	
	897	Human	<i>E. coli</i>	Respiratory tract	IncII	100	CC7	ST7	117	
	1047	Human	<i>E. coli</i>	Rectal swab	IncII	100	CC7	ST7	117	
	38.52	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	100	CC7	ST7	117	
	623	Human	<i>E. coli</i>	Urine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	117	
	39.26	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	100	CC7	ST7	48	
	38.53	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	100	CC7	ST7	155	
	38.49	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	97	CC7	ST7	641	
	39.02	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	110	CC7	ST7	665	
	39.05	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	97	CC7	ST7	752	
	1247	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	100	CC7	ST7	767	
	162.03	Poultry	<i>S. Java</i> <sup>b</sup>	Unknown	IncII	97	CC7	ST7	n.d.	
	175.77	Poultry	<i>S. Infantis</i>	Unknown	IncII	100	CC7	ST7	n.d.	
	187.45	Poultry	<i>S. Infantis</i>	Caecum	IncII	100	CC7	ST7	n.d.	
	187.46	Poultry	<i>S. Infantis</i>	Caecum	IncII	100	CC7	ST7	n.d.	
	39.51	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	95	CC7	ST30	155	
	691	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	90	CC31	ST35	131	
	1503	Human	<i>E. coli</i>	Urine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	131	
	39.47	Poultry	<i>E. coli</i>	Meat	IncII	97	n.d.	Non-typable <sup>a</sup>	117	
	186.74	Poultry	<i>S. Java</i> <sup>b</sup>	Caecum	IncII	97	n.d.	Non-typable <sup>a</sup>	n.d.	
	450	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	95	CC3	ST3	167	
	186.27	Poultry	<i>S. Agona</i>	Caecum	IncII	110	CC3	ST3	n.d.	
	990	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncB/O	95	n.d.	n.d.	n.d.	
	1198	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncB/O	95	n.d.	n.d.	n.d.	
	312	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncB/O	100	n.d.	n.d.	n.d.	
	60	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncN	30	n.d.	n.d.	n.d.	
	1455	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncN	35	n.d.	n.d.	n.d.	
	627	Human	<i>E. coli</i>	Urine	Non-typable	30	n.d.	n.d.	n.d.	
	13, 591, 416, 152, 179	Human	<i>E. coli</i>	Urine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	69 (n = 2), 57, 162	
	666, 152, 387	Human	<i>E. coli</i>	Urine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	354, 453, 545	
	52a, 54a, 72a, 71	Retail	<i>E. coli</i>	Chicken meat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23 (n = 2), 624, 1564	
	60, 61, 63a, 69, 39b	Retail	<i>E. coli</i>	Chicken meat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1594 (n = 2), 1901, n.t. (n = 2)	
	<i>bla<sub>TEM-52</sub></i>	38.34	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	97	CC5	ST10	10
		320	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	95	CC5	ST36	10
		681	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	95	CC5	ST36	10
		85b	Retail	<i>E. coli</i>	Chicken meat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	10
		68	Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	95	CC5	ST10	156
		39.76	Poultry	<i>E. coli</i>	Caecum	IncII	90	CC5	ST10	752
		166.01	Poultry	<i>S. Java</i> <sup>b</sup>	Meat	IncII	82	CC5	ST10	n.d.
		166.22	Poultry	<i>S. Java</i> <sup>b</sup>	Meat	IncII	82	CC5	ST10	n.d.
162.19		Poultry	<i>S. Infantis</i>	Unknown	IncII	82	CC5	ST10	n.d.	
173.44		Poultry	<i>S. Infantis</i>	Caecum	IncII	90	CC5	ST10	n.d.	
85		Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	90	CC5	ST36	131	
91		Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	90	CC5	ST36	Non-typable <sup>c</sup>	
1362		Human	<i>E. coli</i>	Urine	IncII	90	CC5	ST36	453	
229, 194		Human	<i>E. coli</i>	Urine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23, 744	
45a, 47a, 83a, 90, 95a		Retail	<i>E. coli</i>	Chicken meat	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	23, 48, 117, 1403, n.t.	

Figura 11. Resultados de tipificación de cepas (tipificación de secuencia multi-locus) y plásmidos (tipificación de secuencia multi-locus de plásmidos y gupo-Inc) de aislamientos de *Escherichia coli* productora de *bla<sub>CTX-M-1</sub>* y *bla<sub>TEM-52</sub>* en humanos enfermos y aislamientos de *E. coli* y *Salmonella enterica* en aves de corral y carne de pollo

Fuente: Leverstein-van Hall *et al.*, 2011.

Es importante mencionar que antibióticos como quinolonas, cotrimoxazol y aminoglucósidos junto con los  $\beta$ -lactámicos, suelen usarse como promotores de crecimiento y para tratamientos en granjas de pollos de países en donde se han realizado los estudios de resistencia, se menciona que este suceso es el causal de que hayan aislamientos de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo, pues estas han sido comúnmente detectadas en aislamientos de aves de corral en distintos países (Kola *et al.*, 2012). Adicionalmente, se menciona que coresistencias detectadas en *Escherichia coli* productora de BLEE entre tetraciclinas y cotrimoxazol han sido reportadas en aislamientos de personas sanas y enfermas. Estos antibióticos son muy utilizados en la industria avícola además de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, aminoglucósidos o macrólidos (Kola *et al.*, 2012). De la misma manera, estudios indican que una disminución en el uso de  $\beta$ -lactámicos como cefalosporinas de tercera generación utilizados en pollos de engorde se ha podido correlacionar con disminución en la prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo (Zogg *et al.*, 2016; Hayashi *et al.*, 2018).

El reporte de Leverstein-van Hall *et al.* (2010) sugiere la posible transmisión de *E. coli* productor de BLEE de origen avícola a humanos, concluyéndose que la contaminación de la carne podría provenir desde los mataderos, ya que los reportes han descrito enterobacterias productoras de BLEE en heces de aves de corral faenadas en mataderos (Costa *et al.*, 2009). A su vez, que las enterobacterias productoras de BLEE pueden llegar hasta el consumidor final, puesto que los estudios indican su presencia en carne de pollo expandida en mercados y bazares públicos (Tekiner y Özpınar, 2016). Distintos autores refuerzan la hipótesis de Leverstein-van Hall *et al.* (2010), pues anteriormente ya se habían identificado enterobacterias productoras de BLEE en plásmidos de naturaleza similar en aves de corral y humanos (Girlich *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2010). La presencia de enterobacterias productoras de BLEE, aisladas de heces de aves de corral sanas sugiere la sensibilidad de las aves de portar genes de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y su transmisión al hombre (Girlich *et al.*, 2007; Vincent *et al.*, 2010).

En países sudamericanos se han reportado estudios de resistencia antimicrobiana en enterobacterias. En Venezuela se ha detectado *Salmonella* spp, entre ellas *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* y *Salmonella enterica* serovar *heidelberg*, estas han sido aisladas de carne de pollo, siendo todas resistentes a: ampicilina, cefalosporina, carbapenémico y quinolona (González y Araque, 2019). Esto brinda un panorama de la resistencia antibiotica en países en vías de desarrollo. Asimismo, se ha reportado que la multidrogoresistencia (MDR) en las serovariedades de *Salmonella* spp. son de origen zoonótico (Fardsanei *et al.*, 2018).

Países como Brasil reporta mutaciones de genes BLEE como las CYM-2 (Koga *et al.*, 2019), estas últimas productoras de cefalosporinasas (AmpC) y por primera vez detectadas en *Klebsiella pneumoniae* (Jacoby, 2009). En el estudio de Koga *et al.* (2019), se aislaron cepas de enterobacterias como *E. coli* en carcasas de pollos y en muestras de orina, tejido y heridas de humanos infectados. Los resultados

demonstraron la presencia del gen CYM-2 en todas las cepas procesadas (carcasas y humanos), así como resistencia a amoxicilina con ácido clavulánico del 100%, 92.86% en tetraciclinas y 78.57% en cotrimoxazol. Adicionalmente, se determinó homología entre las cepas aisladas en carcasas y humanos (Figura 12) (Koga *et al.*, 2019).

Estudios en el Perú han reportado resistencia antimicrobiana en enterobacterias como *E. coli* aisladas de la bursa de Fabricio en pollos, detectando las mayores prevalencias de resistencia en antibióticos  $\beta$ -lactámicos como cefalosporinas (80%) y penicilinas (91%) (Figura 12) (Carvajal *et al.*, 2019). Los reportes en Perú, describen la detección molecular de enterobacterias productoras de BLEE en órganos y vísceras de aves sanas, destinadas a consumo humano (Gordillo *et al.*, 2019) y la detección microbiológica de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de carne de pollo en mercados tradicionales de Lima (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018), lo cual indica que la carne de pollo podría ser un vehículo fundamental en la transmisión de genes de resistencia a humanos, tal y como lo indican los estudios europeos. Asimismo, en la crianza intensiva de aves de corral se ha comprobado deficientes condiciones que facilita la colonización de enterobacterias productoras de BLEE entre los individuos, conllevando a que las aves se vuelvan portadoras de estas bacterias (Carvajal *et al.*, 2019; Abreu *et al.*, 2013).

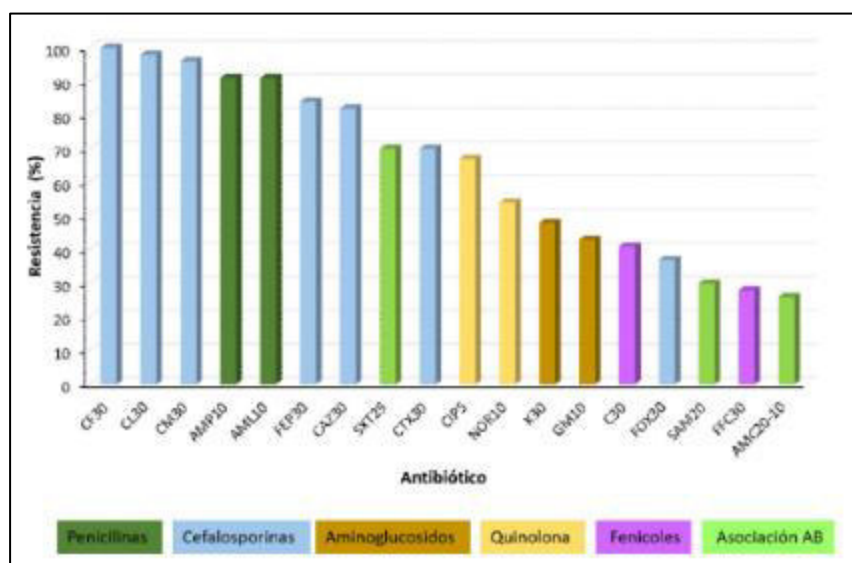


Figura 12. Proporción de resistencia de cepas de *E. coli* aisladas de bursas de Fabricio en pollos de engorde a  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, fenicoles y asociaciones de antibióticos con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Asociación AB: SXT25 (trimetoprim/sulfametoxazol), SAM20 (ampicilina-sulbactam) y AMC20-10 (amoxicilina/ácido clavulánico)

Fuente: Carvajal *et al.*, 2019.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **1. LUGAR DE EJECUCIÓN Y PERIODO DE DURACIÓN**

Considerando los hallazgos detectados en investigaciones (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018; Cortez-Sandoval y Shiva, 2019) de enterobacterias realizadas en distritos de Lima se buscó un distrito que reliece controles sanitarios constantes e inopinados. Por ello, se eligió al Distrito de Santiago de Surco ya que tienen implementado un control riguroso a nivel de mercados de abasto por la gestión municipal al momento de la realización de la tesis, conociéndose que ellos priorizaban la vigilancia sanitaria y la salud pública (A. Mansilla-Bióloga, Bromatología, Municipalidad Santiago de Surco-Lima, comunicación personal).

Las muestras de carne de pollo se obtuvieron de mercados del distrito de Santiago de Surco de Lima metropolitana entre los meses de marzo y abril del año 2019. Las muestras fueron adquiridas mediante una transacción económica cancelando el costo correspondiente al peso de las piezas adquiridas. Las muestras fueron trasladadas en un contenedor termoaislante, bajo condiciones de refrigeración (4°C) al Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM para el procedimiento microbiológico y bioquímico, el cual se realizó entre los meses de marzo y setiembre de 2019.

La extracción de ADN y el diagnóstico molecular se realizó en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM entre los meses de Octubre de 2019 y Enero de 2020.



## 2. DESCRIPCIÓN DE MATERIAL

- **Muestras de carne de pollo:** Las muestras a procesar fueron cortes (trozos) de ala y pierna de pollo expandidas en mercados del distrito de Santiago de Surco de Lima metropolitana.
  
- **Materiales de microbiología y bioquímica**
  - **Materiales de plástico y de vidrio:** Guantes de látex, asas de Digralski, placas petri de 100 mm de diámetro, hisopos estériles, frascos de vidrio de 200, 500 y 1000 ml, beakers de 100 y 250 ml, probeta de 90 ml, bolsas de primer uso, parafilm, tubos de ensayo, jeringas de 1 y 10 ml, láminas de vidrio, viales de 1.5 ml.
  
  - **Equipos:** Stomacher® 400 Circulator, incubadora Incucell, mechero, destilador de agua GFL 2004, autoclave, cabina de flujo laminar (Purair BIO), Densitometer (DEN-1B), termociclador GeneAmp®, microscópio.
  
  - **Medios de cultivo y conservación:** Agar eosina y azul de metileno (EMB – Merck-Alemania), agar tripticasa soya (TSA – Himedia® - India), caldo tripteína soya (TSB – Britania® - Argentina), agar Müller-Hinton (MH - Liofilchem® - Italia), glicerol 50%.
  
  - **Reactivos y compuestos químicos:** Cristal violeta, lugol, alcohol, zafranina, peróxido de hidrogeno, alcohol, amonio cuaternario, tiras oxidase test (Liofilchem® - Italia), kits de EnteroPluri-Test® (Liofilchem® - Italia),  $\alpha$ -naftol (Liofilchem® - Italia), hidróxido de potasio (Liofilchem® - Italia), reactivo de kovacs (Liofilchem® - Italia), discos de antibióticos (Liofilchem® - Italia).
  
- **Materiales de extracción de ADN**
  - **Materiales de plástico:** Viales de 1.5 ml, racks y portaviales de plástico, pipetas de 200 y de 1000  $\mu$ l, tips de 200 y 1000  $\mu$ l.
  
  - **Equipos:** Multi-block Lab-Line, vórtex, Centrifuge 5417 R (Eppendorf).
  
  - **Reactivos:** GenJet DNAPurification kit (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos).

- **Composición del kit de extracción GenJet DNA Purification kit (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos):** Digestion solution, Lysis solution, Wash buffer I, Wash buffer II, Elution buffer, Proteinasa K, RNAasa, columnas, tubos de colección.

▪ **Materiales para PCR**

- **Materiales de plástico y de vidrio:** Guantes de nitrilo, viales de 200 µl, racks y portaviales de plástico, tips de 10 y 100 µl, pipetas de 0.5, 2 y 20 µl.
- **Equipos:** Cabina de flujo laminar, PCR SYSTEM 9700.
- **Reactivos y compuestos químicos:** RNAsa away (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos), DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos), cebadores (Biosearch Technologies), agua ultrapura libre de nucleasas (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos).
- **Composición del DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos):** Es el máster mix ya preparado, contiene la Taq polimerasa, dATP, dCTP, dGTP y dTTP (0.4mM) y 4mM de MgCl<sub>2</sub>.
- **Cebadores:** Para los genes que codifican la producción de BLEE, se utilizaron los siguientes cebadores (Colom *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2006):

**PCR dúplex**

- Forward: SHV-F (5' AGGATTGACTGCCTTTTTG 3')
- Reverse: SHV-R (5' ATTTGCTGATTCGCTCG 3')
- Forward: TEM-C (5' ATCAGCAATAAACCAGC 3')
- Reverse: TEM-H (5' CCCC GAAGAACGTTTTTC 3')

**PCR CTX-M-1**

- Forward: CTX-M-1-F (5' AAAAATCACTGCGCCAGTTC 3')
- Reverse: CTX-M-1-R (5' AGCTTATTCATCGCCACGTT 3')

**PCR CTX-M-2**

- Forward: CTX-M-2-F (5' CGA CGC TAC CCC TGC TAT T 3')

- Reverse: CTX-M-2-R (5' CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG 3')

#### PCR CTX-M-9

- Forward: CTX-M-9-F (5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG 3')
- Reverse: CTX-M-9-R (5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC 3')

#### ▪ Materiales para la electroforesis

- **Materiales de plástico y de vidrio:** Guantes de nitrilo, racks y portaviales de plástico, tips de 10 µl, pipeta de 20 µl, probeta de 90 ml, matraz, jeringas de 10 ml, parafilm, frascos de vidrio de 1000 ml.
- **Reactivos y compuestos químicos:** Agarosa ultra pura Cleaver Scientific, Buffer TBE™ (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos), bromuro de etidio (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos), ladder 500 bp (Thermo-Scientific™ - Estados Unidos).
- **Equipos:** Transiluminador (Clear View, Cleaver Scientific Ltd.).

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Tamaño muestral

El tamaño de muestra se obtuvo a través de la fórmula de detección de una enfermedad o prevalencia limite (Thrusfield, 1990), utilizando las siguientes restricciones: nivel de confianza del 95% y prevalencia limite de 10,9% (Ojer-Usoz *et al.*, 2013) para la detección de los genes menos frecuentes (TEM y SHV) de enterobacterias productoras de BLEE en muestras positivas a enterobacterias obtenidas de muestras de carne de pollo de mercados de abasto del distrito de Santiago de Surco. El tamaño de muestra calculado fue de 26. Muestras extras se obtuvieron a fin de garantizar el numero mínimo de muestras ante la eventualidad de pérdidas.

Nivel de confianza % :	95%
Tamaño de población :	999999999999
Prevalencia mínima esperada (%) :	10.90%
<b>Tamaño de muestra necesario :</b>	<b>26</b>
Fracción de muestreo :	0.0000%

Figura 13. Fórmula sistematizada del tamaño de muestra para la detección de una enfermedad o prevalencia limite

Fuente: Work in Epidemiology

### 3.2. Recolección de muestras

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. 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), Weese et al. (2010) y Kola et al. (2012)

La unidad muestral fueron los cortes de canal de pollo (ala y pierna) (Weese *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2020; Kola *et al.*, 2012) vendida en expendio por los mercados del distrito de Santiago de Surco. Las muestras fueron consideradas como pool para la unidad muestral. Los puestos de expendio de los mercados fueron determinados de manera aleatoria, mediante el programa Excel (Tyrrer y Heyman 2016).

En la mayoría de los puestos de los mercados, los operarios 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 enlozado 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. Los utensilios, cuchillos y hachas, se encontraban en perfecto estado y en la mayoría tenían mango de plástico. Algunos mercados se ubicaban en espacios abiertos no techados. También se observó presencia de plagas (dípteros) en algunos establecimientos. Las muestras fueron empacadas directamente en bolsas de plástico por el vendedor, de manera que la muestra se obtuviera de la manera tradicional de venta al por menor en el puesto de venta. Las bolsas que contenían las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Salud Pública y Salud Ambiental en una caja térmica que contenía hielo a temperatura de refrigeración (4°C). Una vez llegadas las muestras al laboratorio, fueron colocadas en una refrigeradora hasta el momento de su procesamiento, el cual se realizó dentro de las primeras 12 horas de tomada la muestra.

### **3.3. Procedimiento microbiológico**

#### **3.3.1. Aislamiento bacteriano**

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 retiró el hueso cortando las piezas con un bisturí, quedando musculo, tendones y piel como muestra final, la cual fue homogenizada en un Stomacher (Stomacher® 400 Circulator) a 270 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, se tomaron 10 g. de la carne y se diluyó en 90 ml de agua destilada en bolsas estériles para su nueva homogenización en el Stomacher a 270 rpm durante 2 minutos. De la dilución se obtuvo 0.1 ml para distribuirla en agar EMB (Merck-Alemania) y TSA (Himedia® - India), y poder obtener las colonias características. Las colonias características varían en cuanto a color y textura en el medio EMB (Merck-Alemania) dependiendo del género y especie. Se estandarizaron diluciones para poder rotular y enumerar las colonias y poder someterlas a sorteo y poder seleccionar una colonia al azar por muestra, mediante el programa de Excel. Posteriormente, se realizó la tinción gram para confirmar la detección de bacilos gram negativos. Las colonias se sembraron en agar TSA (Himedia® - India) para continuar con la identificación bioquímica. Los cultivos en agar EMB (Merck-Alemania) y TSA (Himedia® - India) fueron incubados a  $37 \pm 2^\circ \text{C}$  durante  $24 \pm 2 \text{ h}$ , en presencia de oxígeno.

#### **3.3.2. Identificación bioquímica**

Para confirmar la detección de enterobacterias, se realizó el test de oxidasa (Liofilchem® - Italia), el cual debe demostrar resultados negativos para la confirmación, adicionalmente, se realizó el análisis de catalasa, el cual debe salir positivo. Se utilizó el kit EnteroPluri-Test® (Liofilchem® - Italia) para caracterizar bioquímicamente las enterobacterias por género y especie (Figura 16). El método consiste en sembrar la bacteria en la batería de medios bioquímicos e incubar durante 24 hrs.  $\pm 2$  a  $37.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$ . Para asegurar resultados confiables se agregaron 3 gotas de reactivo de Kovacs (Liofilchem® - Italia) en el sector  $\text{H}_2\text{S}/\text{Indol}$ . 3 gotas de  $\alpha$ -naftol (Liofilchem® - Italia) y 2 gotas de hidróxido de potasio KOH (Liofilchem® - Italia) en el sector Voges-Proskauer (VP). Después de 15 segundos de aplicación de los reactivos se realizaron las lecturas.

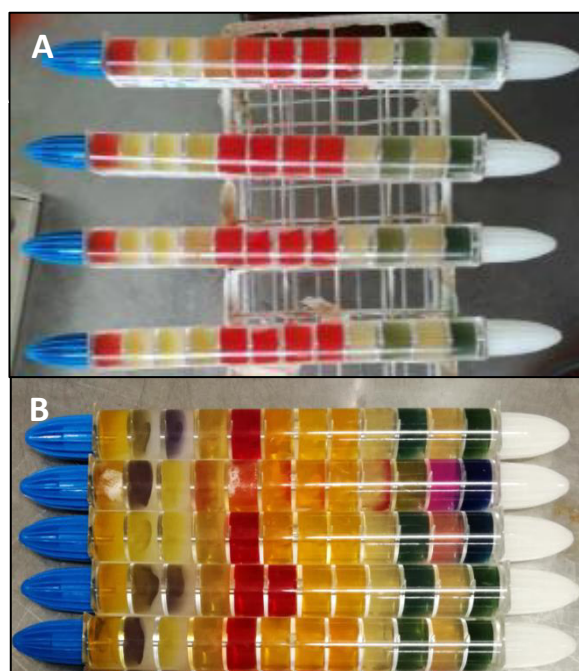


Figura 16. Caracterización bioquímica. A. Kit Enteropluri-Test sin muestra cultivada. B. Kit Enteropluri-Test con muestra cultivada a las 24 hrs de incubación, de esta manera se puede observar la fermentación de azúcares y compuestos químicos.

### 3.3.3. Análisis de susceptibilidad

Se realizó un primer análisis de susceptibilidad (método de difusión simple o conocido como método Kirby-Bauer), el cual consiste en preparar el inóculo de la bacteria, con una turbidez equivalente a 0.5 en la escala Mc Farland, sobre agar Muller Hinton (Liofilchem® - Italia). Se estandarizó el inóculo bacteriano a una escala 0.5 de Mc Farland ( $1 - 2 \times 10^8$  UFC/ml) por densitometría con el equipo McFarland Densitometer (DEN-1B) (BioSan - Letonia). El método permitió identificar enterobacterias sospechosas de producir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en donde se utilizaron los siguientes discos de antibióticos: cefotaxima (CTX) 30  $\mu$ g (Liofilchem® - Italia), ceftazidima (CAZ) 30  $\mu$ g (Liofilchem® - Italia), ceftriaxona (CRO) 30  $\mu$ g (Liofilchem® - Italia), aztreonam (ATM) 30  $\mu$ g (Liofilchem® - Italia), cefpodoxima (CPD) 10  $\mu$ g (Liofilchem® - Italia), e incubándose durante 24 horas a  $37^\circ\text{C} \pm 2$ , en presencia de oxígeno (CLSI, 2015). Las medidas de halos de inhibición mediados por el antibiótico se detallan en la Figura 17.

Las cepas que fueron resistentes para el método de Kirby-Bauer (cepas sospechosas de producir BLEE), fueron las seleccionadas para confirmar el fenotipo de resistencia a través de un segundo método de susceptibilidad (método del doble disco o método de Jarlier). El método del doble disco se realizó en agar Müller Hinton, bajo las mismas condiciones que el primer análisis, utilizando los mismos antibióticos con adición de un disco de amoxicilina con ácido clavulánico (AMC) 30 µg (Liofilchem® - Italia) en el centro del antibiograma. El resultado de positividad fue mediado por la manifestación de efecto de sinergia (también llamado efecto huevo o cola de pez) entre el disco de amoxicilina con ácido clavulánico y los discos circundantes (García *et al.*, 2010; Padilla, 2011; EUCAST, 2018). Las enterobacterias positivas al método de doble disco fueron las que se procesaron mediante PCR simple y dúplex para la detección de los genes de resistencia.

Antibiótico	Concentración	Resistencia
Cefpodoxima	10 ug.	≤ 17 mm
Ceftazidima	30 ug.	≤ 22 mm
Aztreonam	30 ug.	≤ 27 mm
Cefotaxima	30 ug.	≤ 27 mm
Ceftriaxona	30 ug.	≤ 25 mm

Figura 17. Parámetros de resistencia a β-lactámicos para el análisis de susceptibilidad Kirby-Bauer

Fuente: CLSI, 2015 (Tabla 3A.p. 109)

### 3.4. Procedimiento molecular

#### 3.4.1. Extracción de ADN

Se utilizó el kit de extracción GenJET Genomic DNA Purification kit de marca Thermo Scientific y se siguieron las instrucciones del fabricante. Todas las cepas en investigación y controles positivos fueron almacenadas a -20° C. Se utilizó fluorometría mediante Quibit 4 (Invitrogen) para comprobar que se había extraído el ADN de cada cepa correspondiente.

#### 3.4.2. Análisis y detección molecular

Se realizó el PCR simple para la amplificación de genes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 por separado y un PCR dúplex para la amplificación de genes TEM y SHV.

Para cada PCR el volumen final de reacción fue de 25 µl, con la siguiente composición: 12.5 µl de DreamTaq Green MasterMix, 2 µl del ADN templado y 0.25 µM del cebador. Se utilizaron los cebadores para el PCR simple y dúplex indicados en la Figura 18 a la concentración mencionada (Colom *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2006). Cepas aisladas de bacteriemias (*Escherichia coli*: Vc1, Vc2, Vc3, Vc4) de neonatos humanos fueron usadas como controles positivos y agua PCR fue usada como control negativo en todas las reacciones de PCR. Las cepas utilizadas como controles positivos fueron adquiridas gracias a la donación por parte del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. Los controles positivos para cada PCR fueron enterobacterias detectadas como positivas para cada gen: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9, TEM y SHV.

Las condiciones de amplificación, para el PCR simple y dúplex se describen en el Cuadro 2 y Cuadro 3.

Gen	Cebador	Secuencia	Producto PCR (pb)
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	SHV-F	5'AGGATTGACTGCCTTTTTG3'	392
	SHV-R	5'ATTTGCTGATTTTCGCTCG3'	
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	TEM-C	5'ATCAGCAATAAACCAGC 3'	516
	TEM-H	5'CCCCGAAGAACGTTTTTC3'	
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i>	CTX-M-1-F	5'AAAAATCACTGCGCCAGTTC3'	415
	CTX-M-1-R	5'AGCTTATTCATCGCCACGTT3'	
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	CTX-M-2-F	5'CGA CGC TAC CCC TGC TAT T3'	552
	CTX-M-2-R	5'CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG3'	
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i>	CTX-M-9-F	5'CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG3'	205
	CTX-M-9-R	5'ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC3'	

Figura 18. Secuencias de cebadores para los genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* y *bla<sub>CTX-M-9</sub>*

Fuente: Colom *et al.*, 2003; Woodford *et al.*, 2006.



Cuadro 2. Condiciones de amplificación de ADN para genes TEM y SHV

Fase	Temperatura ° C	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	53	30 s	32
Extensión	72	1 min	
Elongación	72	10 min	1

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de ADN para genes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9

Fase	Temperatura ° C	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	30 s	
Hibridación	52	40 s	30
Extensión	72	1 min	
Elongación	72	10 min	1

Los productos de los PCR simples y del PCR dúplex fueron analizados mediante electroforesis al 2% de agarosa (ultrapure agarosa™) y buffer TBE™ 1X. Los geles de cada ensayo fueron teñidos con bromuro de etidio y se fotografiaron bajo luz ultravioleta usando un transiluminador (Clear View, Cleaver Scientific Ltd.).

#### 4. ANÁLISIS DE DATOS

Los resultados, fueron registrados en base a porcentajes en hojas de cálculo (Microsoft Excel).

### IV. RESULTADOS

La totalidad de muestras sembradas (n=34) resultaron positivas a enterobacterias por cultivo bacteriano superando el límite establecido en los criterios microbiológicos para *Escherichia coli* en carnes crudas, picadas y molidas, según la NTS-071 de la R.M. 591-2008/MINSA/DIGESA-V-01. Asimismo, en el Cuadro 4 se puede observar la presencia de *Salmonella enterica* en las muestras de carne.

Se identificaron bioquímicamente 34 cepas de enterobacterias (en el Anexo 3 se puede observar la bioquímica para la identificación de *E. coli*.), de las cuales el 58.8% (20/34) resultaron ser sospechosas de producir enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) bajo el método Kirby-Bauer (Anexo 4). Sin embargo, el 35% (12/34) resultaron ser cepas confirmadas de producir BLEE bajo el método de doble disco (Anexo 5). Las enterobacterias confirmadas de producir BLEE y seleccionadas para el procedimiento molecular fueron *Salmonella enterica* (1 cepa), *Escherichia coli* (8 cepas), *Serratia odorifera* (1 cepa) y *Klebsiella ozaenae* (2 cepas) (Cuadro 4).

Complementario al estudio, en el análisis microbiológico además de detectar el perfil de resistencia antimicrobiana, también se agruparon aquellas enterobacterias resistentes a tres o más betalactámicos. Las cepas agrupadas fueron aquellas que demostraron resistencia a tres o más antibióticos bajo el método de Kirby-Bauer, en donde se pudo detectar un 38% (13/34) de cepas (Cuadro 5). Las enterobacterias resistentes a tres o más antibióticos betalactámicos fueron *E. coli* 62% (8/13), *Klebsiella ozaenae* 23% (3/13), *Serratia odorifera* 7.7% (1/13), *Salmonella enterica* 7.7% (1/13).

Del total de enterobacterias procesadas, para la detección molecular de genes de resistencia, el 100% (12/12) fueron positivas a la detección de genes BLEE. El gen de mayor frecuencia detectado en las enterobacterias fue el CTX-M-1 (100%) (12/12), seguido del gen TEM con un 83.3% (10/12) y el gen CTX-M-9 con un 16.7% (2/12). No se detectó la presencia de genes CTX-M-2 ni SHV (Cuadro 6). Del total de muestras procesadas, el 35% (12/34) fueron positivas para genes BLEE. El gen de mayor frecuencia fue el CTX-M-1 35.2% (12/34), seguido del gen CTX-M-9 5.8% (2/34) y el gen TEM 29.4% (10/34). No se detectó la presencia de genes CTX-M-2 ni SHV (Cuadro 6). La electroforesis en gel agar del PCR se observa en los anexos 6, 7, 8 y 9.

Cuadro 4. Proporción de cepas sospechosas de producir BLEE y cepas confirmadas mediante análisis de susceptibilidad

Nº	Identificación	Sospechosas (Método Kirby-Bäuer)	Confirmadas (método de doble disco)
1	<i>Enterobacter cloacae</i>		
2	<i>Salmonella entérica</i>	1	1
3	<i>Citrobacter freundii</i>		
4	<i>Citrobacter freundii</i>		
5	<i>Salmonella entérica</i>		
6	<i>Serratia licuefaciens</i>		
7	<i>Escherichia coli</i>		
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	
9	<i>Serratia licuefaciens</i>		
10	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	
11	<i>Citrobacter freundii</i>		
12	<i>Klebsiella oxytoca</i>		
13	<i>Pantoea aglomerans</i>		
14	<i>Citrobacter amanolaticus</i>	1	
15	<i>Escherichia coli</i>	1	
16	<i>Escherichia coli</i>	1	
17	<i>Escherichia coli</i>	1	
18	<i>Escherichia coli</i>	1	1
19	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	
20	<i>Escherichia coli</i>	1	1
21	<i>Serratia odorífera</i>	1	1
22	<i>Escherichia coli</i>	1	1

23	<i>Escherichia coli</i>	1	1
24	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	1
25	<i>Pantoea aglomerans</i>		
26	<i>Escherichia coli</i>	1	1
27	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	
28	<i>Klebsiella ozaenae</i>		
29	<i>Escherichia coli</i>	1	1
30	<i>Serratia rubidaea</i>		
31	<i>Escherichia coli</i>	1	1
32	<i>Escherichia coli</i>		
33	<i>Escherichia coli</i>	1	1
34	<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	1
TOTAL		58.8% (20/34)	35.3% (12/34)

Cuadro 5. Perfil de resistencia antimicrobiana y resistencia a mas de dos betalactámicos de enterobacterias aisladas en carne de pollo.

N°	Identificación	Aztreona m (AT) mm <sup>a</sup>	Cefotaxi ma (CTX) mm <sup>b</sup>	Ceftazidi ma (CAZ) mm <sup>c</sup>	Cefpodox ima (PX) mm <sup>d</sup>	Ceftriaxo na (CTR) mm <sup>e</sup>	Resistente a tres o más betalactámicos
1	<i>Enterobacter cloacae</i>	40	34	32	32	36	
2	<i>Salmonella enterica</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 enterica</i>	30	28	26	24	29	
6	<i>Serratia licuefaciens</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 licuefaciens</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 aglomerans</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	10	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 aglomerans</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 rubidaea</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

TOTAL

38% (13/34)

a: Resistencia:  $\leq 27$  mm.

b: Resistencia:  $\leq 27$  mm

c: Resistencia:  $\leq 22$  mm

d: Resistencia:  $\leq 17$  mm

e: Resistencia:  $\leq 25$  mm

Cuadro 6. Proporción de enterobacterias positivas a genes BLEE procedentes de distintas muestras de carne de pollo.

Id. Enterobacterias	CTX-M-1	CTX-M-2	CTX-M-9	TEM	SHV
<i>Salmonella enterica</i>	1	0	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Serratia odorífera</i>	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	0	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	0	0	1	0
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	0	1	1	0
Total 1: 12 aislados	(12/12) 100%	0%	(2/12) 16.6%	(10/12) 83.3%	0%
Total 2: 34 muestras	(12/34) 35.2%	0%	(2/34) 5.8%	(10/34) 29.4%	0%

\*No se detectaron cepas positivas a SHV, ni CTX-M-2.

## V. DISCUSIÓN

Un estudio peruano realizado en el año 2018, indicó que del total de enterobacterias aisladas en muestras de carne de pollo tomadas en mercados tradicionales de Lima metropolitana, el 95.3% (61/64) de muestras fueron positivas para *Escherichia coli* (Ruiz-Roldán *et al.*, 2018). Sin embargo, otros estudios realizados en carne de pollo de mercados en Europa indican prevalencias para *Escherichia coli* del 59.0% (20/34) (Vitas *et al.*, 2018) y en ciudades asiáticas del 63.5% (242/381) (Rahman *et al.*, 2020). En el mismo estudio de Ruiz-Roldán *et al.* (2018), detectan que el 59.4% (19/32) de muestras de carne de pollo se encontraban contaminadas con *Escherichia coli* productora de BLEE, detectado fenotípicamente. Cabe resaltar que no existen estudios peruanos que reporten enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo a nivel molecular. En Europa el estudio de Vitas *et al.* (2018) reporta que el 82% (28/34) del total de enterobacterias fueron productoras de BLEE, lo cual indica que enterobacterias distintas a *Escherichia coli* también portan genes de resistencia a nivel molecular. Además, el estudio de Ojer-Usoz *et al.* (2013), indica un 84% (38/45) de enterobacterias productoras de BLEE en muestras de carne de pollo también a nivel molecular. A diferencia de los estudios realizados en nuestro país para la detección de enterobacterias productoras de BLEE, el presente estudio es el primero en evidenciar a nivel molecular enterobacterias productoras de BLEE aisladas en carne de pollo, siendo todas las cepas procesadas a nivel molecular positivas a al menos un gen BLEE (CTX-M-1), generando la justificación para la continuación de otras investigaciones.

Otros autores reportan que las heces animales pueden ser el origen de la contaminación con *Escherichia coli* en carne de pollo y otros alimentos (Rivera *et al.*, 2012; Caballero *et al.*, 2015; Ruiz-Roldán *et al.*, 2018). Ojer-Usoz *et al.* (2013), detectaron una prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE en carne de pollo de 84%, valor que esta muy por encima del encontrado en otras carnes como de cerdo (55%) y res (59%). Por lo tanto, uno de los factores que podría estar interviniendo en la contaminación de la carne pollo serían las heces. Si bien la contaminación cruzada no puede descartarse

durante la manipulación de la carne ya sea en mataderos o en mercados, la alta prevalencia de BLEE en *E. coli* detectada en la carne de pollo podría deberse al uso indiscriminado y prolongado, en granjas avícolas, de antibióticos ya sea como tratamiento o como profilácticos (Smet *et al.*, 2010; Aarestrup, 2015). Por lo tanto, los aislados positivos a BLEE en carne de pollo encontrados en este estudio podrían tener origen en las heces de animales.

En este estudio se ha detectado una menor frecuencia de *E. coli*, 38.0% (13/34), con respecto a otros reportes como el de Ruiz-Roldán *et al.* (2018) quienes determinan un 95.3% (61/63). Si bien ambos estudios se realizan en mercados, el muestreo de Ruiz- Roldán se realiza en los distritos de Comas, San Martín de Porres, La Victoria, ente otros, que se caracterizan por la poca rigurosidad en el establecimiento de medidas de salubridad y controles microbiológicos periódicos como si lo realizan otros municipios como el de Santiago de Surco, donde las inspecciones son realizadas con regularidad cada 15 o 30 días, según la gravedad de la infracción y a criterio del inspector (A. Mansilla-Bióloga, Bromatología, Municipalidad Santiago de Surco-Lima, comunicación personal), lo cual esta regulado por la Resolución Ministerial 282-2003 que establece la aplicación de buenas practicas de manipulación (BPM) y buenas practicas de higiene (BPH), en establecimientos que expenden alimentos. Como hemos mencionado, el Distrito de Santiago de Surco cumple con la normativa, mientras que otros distritos como los citados por Ruiz-Roldán *et al.* (2018), tal vez no lo cumplan, lo cual se podría corroborar con la presencia de basura, moscas, roedores y otros animales de sangre caliente que muchas veces viven dentro de los mercados, además de no cumplir con la indumentaria adecuada (mandiles, guantes, mascarillas, cofia, entre otros). Es necesario mencionar que las BPH involucran el uso de agua potable. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el agua es una fuente medioambiental de resistencia bacteriana, pues las enterobacterias originarias de poblaciones humanas, animales y medioambientales pueden introducirse a ecosistemas naturales, por lo cual también se pueden encontrar enterobacterias que lleven codificación genética de resistencia a antibióticos y diseminar los genes a poblaciones de enterobacterias patógenas como no patógenas a través de su mecanismo de transferencia de ácido nucleico (Ojer-Usoz *et al.*, 2014). Por ello, la detección de enterobacterias no patógenas como *Serratia* spp, *Citrobacter* spp, *Pantoea agglomerans* en este estudio es importante, ya que se han aislado, considerando que al analizar *Serratia odorífera* se ha detectado molecularmente los genes CTX-M-1 y TEM, en ella. Por ello, la presencia de enterobacterias patógenas como no patógenas detectadas en ecosistemas naturales son un potencial riesgo de infección para la salud publica (Korzeniewska y Harnisz, 2013). Asimismo, Tanimoto *et al.* (2021) han evidenciado genes FONA en *Serratia fonticola* aislada en carne de pollo importada en Japón, gen filogenéticamente emparentado con CTX-M-1, CTXM-2 y CTXM-9. Por lo tanto, es importante y necesario conocer el origen de la carne de pollo importada, puesto que los países que exportan carne de pollo a Japón, como el Perú, podrían ser el origen de diseminación de enterobacterias como *Serratia* spp con genes de resistencia BLEE.



Los mataderos también deben ser regulados, en este caso por SENASA (D.S. N° 029-2007-AG), debido a que éstos también pueden ser fuente de diseminación de enterobacterias productoras de BLEE, las cuales pueden ser detectadas en la carne de pollo vendida en los mercados. Es necesario resaltar la importancia del mantenimiento de la temperatura (2 - 4° C) en toda la fase de la cadena productiva, principalmente en el almacenamiento (mataderos y mercados), así como en el transporte del alimento, debido a que su alteración podría incrementar la carga microbiana de enterobacterias productoras de BLEE, cuyo aislamiento puede ser detectado en los mercados de algunos distritos de Lima. En nuestro estudio, el 35% (12/34) de muestras de carne de pollo fueron positivas para la detección de enterobacterias productoras de BLEE. Si bien la prevalencia de *E. coli* productora de BLEE en el Perú, se encuentra alrededor del 59.4% (19/32) a nivel fenotípico, nuestros resultados difieren siendo el 35% (12/34) de muestras de carne de pollo positivas a enterobacterias productoras de BLEE, con al menos un gen de resistencia debido a que los mercados estudiados por Ruiz-Roldán *et al.*, 2018 están ubicados en municipios que probablemente no cumplan con inspecciones necesarias y obligatorias según la RM.282-2003, mientras que en el distrito de Santiago de Surco sí se cumple. Es importante mencionar que todas las *E. coli* del total de enterobacterias seleccionadas para detección molecular de genes BLEE fueron resistentes molecularmente en nuestro estudio.

De las enterobacterias aisladas, un hallazgo importante es la detección de *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* y *Salmonella enterica* serovar *paratyphi*, ambas patógenas. De acuerdo a la RM. N° 591-2008-/MINSA (Perú), en 25g de carne el recuento de *Salmonella* spp. debe ser ausente. La OMS (2018) atribuye al género *Salmonella* la capacidad de generar enfermedad no solamente por serovares como *typhi* o *paratyphi*, sino también por serovariedades clasificadas como específicas para animales, debido a que se ha reportado que serovares como *enteritidis*, *typhimurium*, *choleraesuis*, entre otros, han generado enfermedades en humanos desde sintomatologías gastrointestinales leves a graves, fiebres e incluso septicemias (Chiu *et al.*, 2004; OMS, 2018).

Los genes de mayor frecuencia del total de enterobacterias en nuestro estudio fueron CTX-M-1 35% (12/34), seguido de TEM 29% (10/34) y de CTX-M-9 5.9% (2/34) sin detección de genes SHV ni CTX-M-2 en la carne de pollo. Kola *et al.* (2012), en Alemania, reportaron una frecuencia de genes CTX-M-1 con un 41.2% (77/187) y de TEM-52 de 8.6% (16/187), si bien hay diferencia de resultados, estos son cercanos debido a que comparten el mismo medioambiente ya que ambos muestreos han sido realizados en carnicerías (Korzeniewska y Harnisz, 2013). Así mismo, los autores indican que los genes también podrían tener origen en la crianza de las aves, ya que por lo general en crianzas intensivas las éstas reciben antibióticos como promotores de crecimiento, este evento sucede en nuestro medio por lo cual al tener valores cercanos al de Kola *et al.* (2012), nuestros hallazgos pueden tener origen en la granja. Además, Overdeest *et al.* (2011) encuentran resultados similares para muestras de carne de pollo e hisopado rectal en humanos, pues ellos obtienen proporciones similares para el gen CTX-M-1, (58.1%

(50/86) en carne de pollo y 45.8% (22/46) en heces humanas) y TEM (14.0% (12/86) en carne de ave y 12.5% (6/46) en heces humanas), luego de haber hecho la comparación genómica de los aislados en carne y heces humanas, sugieren que los humanos están directamente involucrados en la transmisión de estos genes, lo cual podría indicar que la detección del gen CTX-M-1 (35%) también estaría relacionado con el ser humano. Existe información a nivel microbiológico (Carvajal *et al.*, 2019; Huamán-Chacón y González-Escalante, 2019), con la cual podríamos indicar que sí podría existir una relación entre enterobacterias que portan genes CTX-M-1 asociado a resistencia a cefalosporinas (80%) y penicilinas (90%) detectadas en explotaciones avícolas en Perú, debido a que el gen CTX-M-1 está relacionado a resistencias a cefalosporinas. Además de una probable relación con hallazgos brindados por Huamán-Chacón y González-Escalante, (2019), los cuales indican un perfil de resistencia múltiple a cefepime (99%), cefotaxima (99%), ceftazidima (99%), los cuales son cefalosporinas asociadas a resistencias mediadas por cefalosporinasas como el CTX-M-1 y TEM, genes que nosotros hemos detectado en las muestras de carne de pollo.

En el análisis molecular de las cepas positivas a BLEE existen reportes como el de Gordillo *et al.* (2019), quienes luego de haber evaluado *E. coli* BLEE provenientes de órganos y vísceras de ave, encuentran que el gen de mayor prevalencia sobre el total de enterobacterias positivas a genes BLEE, fue el CTX-M-1 90.3% (56/62), hallazgo similar al encontrado en nuestro estudio, el cual fue 12/12 (100%). El reporte de Gordillo *et al.*, 2019, podría sugerir contaminación cruzada durante el beneficio del ave. Por lo tanto, es necesario detectar los genes de resistencia BLEE durante la cadena productiva avícola. Gordillo *et al.* (2019), detectaron una baja prevalencia de SHV (8.1%), mientras que en nuestro estudio no se detectó el gen SHV en ninguna enterobacteria lo cual difiere con lo encontrado en el estudio de Gordillo *et al.*, 2019, probablemente se deba a que para detectar este gen un mayor tamaño de muestra es necesario. Para confirmar la ausencia de este gen en carne de pollo en nuestro país sería necesario realizar un nuevo estudio aumentando el tamaño de muestra ahora que sabemos que los genes BLEE están presentes en muestras de carne de pollo en mercados. Los estudios europeos (Vincent *et al.*, 2010; Leverstein van-Hall *et al.*, 2011; Kola *et al.*, 2012) indican que los genes de mayor prevalencia en enterobacterias aisladas en carne de pollo son los genes CTX-M-1, TEM y SHV; también indican que independientemente de la frecuencia de detección para cada uno, los tres genes han sido detectados en aislamientos de explotaciones avícolas de países como Holanda, Bélgica, Francia e Inglaterra (Vincent *et al.*, 2010; Leverstein van-Hall *et al.*, 2011; Kola *et al.*, 2012). Es necesario mencionar que la resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos y no  $\beta$ -lactámicos se ha evidenciado en muestras de carne de pollo contaminadas con enterobacterias productoras de BLEE, en humanos sanos y enfermos y en granjas avícolas (Vincent *et al.*, 2010; Leverstein van-Hall *et al.*, 2011; Kola *et al.*, 2012).

Ojer-Usoz *et al.* (2013), en un estudio realizado en España, indican que las enterobacterias productoras de BLEE, evidencian una mayor prevalencia en carne de pollo que en otras carnes como la

de cerdo y res. Adicionalmente, se menciona que en España los genes BLEE tipo CTX-M se han detectado en un 68% (179/262) de un total de 262 genes detectados en *E. coli*, los cuales han sido responsables de infecciones adquiridas por la comunidad (Romero *et al.*, 2005; Ojer-Usoz *et al.*, 2013) y que es el tipo de genes BLEE más extendido en cepas aisladas de alimentos. En nuestro estudio, el gen BLEE de mayor frecuencia fue el CTX-M-1 35,3% (12/34) en muestras de carne de pollo y del total de enterobacterias analizadas a nivel molecular, el 100% fueron positivas para este mismo gen 100% (12/12), lo cual también podría sugerir que infecciones en humanos por enterobacterias productoras de BLEE, específicamente para el gen CTX-M-1, pueden tener un origen alimentario a través de la carne de pollo, habiéndose demostrado (Hoffmann *et al.*, 2017; Langsrud *et al.*, 2020) que las bacterias resistentes a los antibióticos pueden transmitirse al hombre a través del contacto directo y consumo de carne mal cocida, o con heces de animales (Hoffmann *et al.*, 2017; Langsrud *et al.*, 2020). Sin embargo, en el Perú es necesario realizar mayores estudios para poder considerar una asociación relevante.

Respecto a los genes CTX-M-2 y SHV en el estudio de Leverstein-van Hall *et al.* (2011) se detectó CTX-M-2 con un 6% (3/48) y SHV 33% (16/48) en muestras de carne de pollo frente a genes como CTX-M-1 con un 83% (40/48) y TEM con 46% (22/48). Además, se describieron como genotipos de campo avícola a CTX-M-1 y TEM, pues ambos se detectaron en plásmidos IncI, aislados en sangre y orina de humanos, aves de corral y carne de pollo (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011). En nuestro estudio reportamos el gen CTX-M-1 en un 35% (12/34) como proporción mas alta, seguido de TEM 30% (10/34). Sin embargo, no hemos evidenciado la presencia del gen CTX-M-2 y SHV lo cual se podría deber a que estos probablemente no se encuentran dentro de los plásmidos donde se ubican los genes CTX-M-1 y TEM. Por ello, tal vez sea necesario un mayor tamaño de muestra para evidenciar la presencia de estos genes, por lo cual mayores estudios a nivel molecular son necesarios para poder establecer la detección de estos genes en plásmidos como el IncI, además de poder hacer conjeturas o asociaciones concretas con el trinomio humano-carne de pollo-ave de corral, de manera que se pueda estimar la presencia de estos genes y su parentesco mediante la vigilancia epidemiológica.

Estudios en Perú indican que niños de áreas rurales y de distritos del sur de Lima, de bajo nivel socioeconómico, presentan *E. coli* diarreogénicas con prevalencias de 43% (Acosta *et al.*, 2016) y 14% (Ochoa *et al.*, 2009), respectivamente. Si bien, se podría considerar de baja prevalencia la infección por *E. coli* diarreogénica (14%) (Ochoa *et al.*, 2009), en el mismo estudio se reporta que el 85% de *E. coli* diarreogénica presentó resistencia a ampicilina, 79% a cotrimoxazol y 65% a tetraciclinas. Es necesario señalar, que las resistencias mediadas por BLEE ha conllevado a resistencia cruzada entre antibióticos de distintas clases como cotrimoxazol, quinolonas y tetraciclinas (Oliver y Cantón, 2005; Perozo y Castellano, 2009). Si bien, en nuestro estudio, no hemos clasificado a las *E. coli* detectadas como patógenas o no patógenas, las bacterias pueden transmitir su código genético y diseminar genes de

resistencia a bacterias patógenas como no patógenas, debiéndose considerar que la carne se comporta como un vehículo en la transmisión de genes BLEE (Leverstein-VanHall *et al.*, 2011). Para poder considerar esta hipótesis en las regiones limeñas es necesario mayores estudios en donde se puedan asociar las variables de dependencia y realizar más estudios epidemiológicos.

En relación a *Salmonella enterica*, un estudio reciente indica que el 92% de cepas *Salmonella enterica* serovar *infantis*, aisladas de muestras de heces de niños atendidos en hospitales de Lima, fueron cepas productoras de BLEE con genes CTX-M-65 (Granda *et al.*, 2019). Asimismo, se reportó que *Salmonella enterica* serovar *infantis*, es el tercer serovar más frecuente encontrado en huevos y carne de ave (Zamudio *et al.*, 2011). Si bien, en nuestro estudio no hemos detectado el serovar *infantis* ni el gen CTX-M-65, nosotros hemos detectado *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*, la cual fue una de las cepas de enterobacterias con mayor frecuencia de genes BLEE (CTX-M-1, CTX-M-9 y TEM). Si bien, son serovares de distinto origen, *Salmonella enterica* es una especie en la que se encuentran circulando genes BLEE CTX-M-9 tanto en humanos, en carne de pollo y granjas avícolas, pues lo hemos observado en nuestro estudio, en un estudio en Nigeria donde se detectó *Salmonella* spp. con genes CTX-M-9 que generaban enfermedades diarreogénicas en infantes (Fakorede *et al.*, 2023) y en un estudio en Francia donde indican la presencia de genes CTX-M-9 y TEM en heces humanas, aves de corral y carne de pollo (Weill *et al.*, 2004). Considerando los reportes de Zamudio *et al.*, 2011; Fakorede *et al.*, 2023 y Weill *et al.*, 2004, es posible que la carne de pollo sea un vehículo para la transmisión de *Salmonella* spp. con genes BLEE en humanos, sobretudo en infantes, pudiendo generar resistencia antibiótica y que a su vez sean de origen avícola. Sin embargo, mayores estudios son necesarios para poder establecer asociaciones concretas entre las variables y determinar el comportamiento epidemiológico de los genes BLEE como en países europeos (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011).

*Salmonella enterica* serovar *choleraesuis*, es un agente que principalmente infecta a cerdos; sin embargo, se menciona que también puede infectar humanos e inclusive causar infección septicémica sin afección intestinal. (Chiu *et al.*, 2004; Methner *et al.*, 2018). Lo cual sugiere que el aislamiento de la bacteria en nuestras muestras podría haberse originado por contaminación cruzada entre la carne de cerdo y pollo, como de heces de operarios sobre la carne de pollo, al igual que para las demás enterobacterias, tanto en matadero como en los mercados. Los factores de contaminación cruzada podrían ser el procesamiento conjunto de cerdos y pollos en el flujo de procesos de mataderos clandestinos y en los puestos de mercado, así como el almacenamiento y transporte de ambos productos animales (Rouger *et al.*, 2017; Sekoai *et al.*, 2020). Consideramos importante resaltar que la contaminación de la carne por enterobacterias en nuestras muestras también puede deberse a que los operarios pueden contaminar la carne al momento de la manipulación tanto en matadero como en puestos de mercados. Adicionalmente, la falta de buenas prácticas de almacenamiento y transporte de carcasas de pollo en los mercados también

podría ser un factor determinante en la contaminación de la carne (Rouger *et al.*, 2017; Sekoai *et al.*, 2020).

Consideramos que una limitante podría ser que nuestra metodología basa la confirmación del diagnóstico de identificación de enterobacterias en bioquímica, tal vez se podrían usar técnicas moleculares. Sin embargo, el factor económico también viene a ser una limitante, entre otros factores como equipos que no se tienen a disponibilidad, por lo cual este tipo de técnicas se trabajan en asociación con otros laboratorios en donde el espacio y tiempo suele depender de una tercera persona.

Por otro lado, si bien es cierto existe un estudio en Lima en 2021 en donde se detectó el gen CTX-M-65 en *Escherichia coli* en muestras de carne de pollo en mercados de Villa El Salvador y San Juan de Miraflores (Muray *et al.*, 2021), consideramos que el aporte de este estudio radica en que es el primer estudio en el país en el que se ha podido confirmar la presencia de mas de un tipo de genes BLEE (CTX-M-1, CTX-M-9 y TEM) en *E.coli* y enterobacterias distintas de *E. coli* aisladas de muestras de carne de pollo en mercados de abasto de un distrito con controles sanitarios ruguros en la zona urbana de Lima como lo es el distrito de Santiago de Surco, lo cual anteriormente no había sido objeto de estudio en el país. La evidencia de estos genes de resistencia BLEE, servirá para otros estudios que puedan englobar mas distritos a nivel de Lima metropolitana inclusive estratificando distritos, o discriminando de acuerdo a nivel de estrato socioeconómico o cultural, características de cada municipio en cuanto a inocuidad, buenas prácticas de manipulación, entre muchos otros criterios a considerar.

## VI. CONCLUSIONES

- Las enterobacterias fenotípicamente positivas a BLEE y aisladas en carne de pollo en presentan molecularmente al menos un gen BLEE.
- El gen BLEE que se encuentra en mayor proporción fue el CTX-M-1.
- La prevalencia de enterobacterias que presentan al menos un gen BLEE (CTX-M-1) en muestras de carne de pollo en expendio en el distrito de Santiago de Surco se encuentra por encima del 10.9%.
- Los genes BLEE que no han sido detectados fueron CTX-M-2 y SHV.

## VII. RECOMENDACIONES

- Incrementar el tamaño de muestra, para la detección de genes BLEE.
- Incluir genotipos de virulencia relacionados a cepas productoras de BLEE en estudios posteriores para tener un mayor panorama de la problemática.
- Realizar estudios epidemiológicos o de asociación con enfermedades reportadas en humanos.
- Consideramos adecuado realizar estudios epidemiológicos o de asociación de genes BLEE, de manera que podamos tener más información sobre el origen de infecciones por enterobacterias como *Salmonella* spp, *E. coli*, *Klebsiella* spp, entre otras y determinar que porten el mismo gen de resistencia que las enterobacterias aisladas de carne de pollo positivas a genes BLEE.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. **Abreu R, Castro-hernández B, Madueño A, Espigares-Rodríguez E, Moreno-Roldán E, Morena P, Sánchez-Tudela JM, et al. 2013.** Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en pollos de granjas avícolas de la isla de Tenerife (España). *Higiene y Sanidad Ambiental* 13: 1091-1096
3. **Acosta GJ, Vigo NI, Durand D, Riveros M, Arango S, Zambruni M, Ochoa TJ. 2016.** Diarrheagenic *Escherichia coli*: Prevalence and Pathotype Distribution in Children from Peruvian Rural Communities. *Am J Trop Med Hyg* 95(3): 574-579 doi: 10.4269/ajtmh.16-0220
4. **Ambler R. 1980.** The structure of beta-lactamases *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289 (1036): 321-331 doi: 10.1098/rstb.1980.0049
5. **Ambler R, Coulson A, Frère J, Ghuysen J, Joris B, Forsman M, Levesque R, et al. 1991.** A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 276(Pt 1): 269-270 doi: 10.1042/bj2760269
6. **Bauernfeind A, Casellas J, Goldberg M, Holley M, Jungwirth R, Mangold P, Rohnisch T, et al. 1992.** A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. *Infection* 20(3): 158-163 doi: 10.1007/bf01704610
7. **Bonnet R. 2004.** Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 48(1): 1-14 doi: 10.1128/aac.48.1.1-14.2004
8. **Borman E, Stuart C, Wheeler K. 1944.** Taxonomy of the family enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.* 48(3) 351-67.
9. **Bush K, Jacoby G. 2010.** Updated Functional Classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54(3): 969-976 doi: 10.1128/AAC.01009-09
10. **Carvajal E, Hernández W, Torres M, López D, Rueda E, Vásquez M. 2019.** Resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de contenidos de bursa de Fabricio de aves para engorde. *Rev Inv Vet Perú* 30(1): 430-437 doi: 10.15381/rivep.v30i1.14648



11. **Chiu CH, Su LH, Chu C. 2004.** Salmonella enterica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. Clin Microbiol Rev 17(2): 311-322 doi: 10.1128/CMR.17.2.311-322.2004
12. **Clinical & Laboratory Standards Institute. 2015.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical Laboratory Standards Institute (35 No3, 44-50, 108-111) 950 West Valley Road, Suite 2500 Wayne, PA 19087 USA.
13. **Colom K, Perez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna R. 2003.** Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub> genes in Enterobacteriaceae. FEMS Microbiol Lett 223: 147-151. doi:10.1016/S0378-1097(03)00306-9
14. **Cortez-Sandoval V y Shiva C. 2019.** Detección de enterobacterias productoras de  $\beta$ -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
15. **Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, Somalo S, et al. 2009.** Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. Vete Microbiol 138(3-4): 339-344 doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.029
16. **De Briyne N, Atkinson J, Pokludová L, Borriello S. 2014.** Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. Vet Rec 175(13): 325 doi: 10.1136/vr.102462
17. **EUCAST. 2018.** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Recommandations. V.2.0 Septembre 2018, 36-44. Siège social - Institut Pasteur Paris. Bureaux - 36, avenue Jean Moulin 75014 Paris.
18. **Fakorede C, Amisu K, Saki M, Akinyemi K. 2023.** Co-existence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamasas *bla* CTX-M-9 and *bla* CTX-M-15 genes in *Salmonella* species isolated from febrile and diarrhoeagenic patients in Lagos, Nigeria: a cross-sectional study. Eur Jnl of Medical Research 28:3 doi:10.1186/s40001-022-00960-0.
19. **FAO. 2013.** El aumento de las enfermedades de origen animal require un Nuevo enfoque [Internet], [22 de febrero]. Disponible en: <http://www.fao.org/news/story/es/item/210764/icode/>
20. **FAO. 2020.** Código de Prácticas de Higiene para la carne. Codex [Internet], [20 de febrero]. Disponible en: <http://www.fao.org/home/search/en/?q=codex%20alimentarius>
21. **Fardsanei F, Mehdi M, Douraghi M, Zahraei T, Mahmoodi M, Memariani H, Nikkhahi F. 2017.** Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica*

- serotype enteritidis isolated from meats and eggs *Microb Pathog* 107: 451-456 doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.026
22. **Furuya E y Lowy F. 2006.** Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 4: 36-45 doi: 10.1038/nrmicro1325
  23. **García CS, Pardos MP, Castillo FJ. 2010.** Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28: 12-18.
  24. **Geser N, Stephan R, Hachler H. 2012.** Occurrence and characteristics of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* 8: 21 doi: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-21>
  25. **Girlich D, Poirel L, Carattoli A, Kempf I, Lartigue MF, Bertini A, Nordmann P. 2007.** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* Isolates from Healthy poultry in France. *Appl Environ Microbiol* 73(14): 4681-4685 doi: 10.1128/AEM.02491-06
  26. **González F, Araque M. 2019.** Molecular typing, antibiotic resistance profiles and biocide susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes isolated from raw chicken meat marketed in Venezuela. *Germs* 9(2): 81-88 doi: 10.18683/germs.2019.1161
  27. **Gordillo FC, Koga I, Peña N. 2019.** Detección fenotípica y genotípica de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido aisladas de aves de abasto en Perú. *Biotempo* 16(2): 181-186 doi: 10.31381/biotempo.v16i2.2528.
  28. **Granda A, Riveros M, Martínez-Puchol S, Ocampo K, Laureano-Adame L, Corujo A, Reyes I, Ruiz J, Ochoa T. 2019.** Presence of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase, CTX-M-65 in *Salmonella enterica* serovar Infantis Isolated from Children with Diarrhea in Lima, Peru. *J. Pediatr Infect Dis* 14(04): 194-200 doi: 10.1055/s-0039-1685502
  29. **Hayashi W, Ohsaki Y, Taniguchi Y, Koide S, Kawamura K, Suzuki M, Kimura K, Wachino J, Nagano Y, Arakawa Y, Nagano N. 2018.** High prevalence of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> among genetically diverse *Escherichia coli* recovered from retail raw chicken meat portions in Japan. *In J Food Microbiol* 284: 98-104 doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.08.003
  30. **Hoffmann S, Devleeschauwer 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.
  31. **Holmes RK y Jobling MG. 1996.** Genetics. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology* 4<sup>th</sup> edition. Galveston, Texas, USA. 37-58.

32. **Huamán-Chacón LE y Gonzalez-Escalante E. 2019.** *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido en pollos para consume humano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 36 (2) p. 361-362. doi: 10.17843/rpmesp.2019.362.3959.
33. **Jacoby GA. 2009.** AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22(1): 161-182 doi: 10.1128/CMR.00036-08
34. **Jacoby GA y Medeiros AA. 1991.** More Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 35(9): 1697-1704 doi: 10.1128/aac.35.9.1697
35. **Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. 1988.** Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 10(4): 867-78. doi: 10.1093/clinids/10.4.867
36. **Jouni A, Vinué L, Slama KB, Sáenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, et al. 2007.** *J Antimicrob Chemother* 60(5): 1137-1141 doi: 10.1093/jac/dkm316
37. **Koga VL, Maluta RP, Da Silveira WD, Ribeiro RA, Hungria M, Vespero EC, Nakazato G, et al. 2019.** Characterization of CMY-2type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiol* 19: 174 doi: 10.1186/s12866-019-1550-3
38. **Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kühn K, Schulz K, Balau V, et al. 2012.** High prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany. *J Antimicrob Chemother* 67: 2631-2634. doi: 10.1093/jac/dks295
39. **Korzeniewska E, Harnisz M. 2013.** Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive Enterobacteriaceae in municipal sewage and their emission to the environment. *J. Environ. Manage.* 128, 904-911. doi: 10.1016/j.jenvman.2013.06.051
40. **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.
41. **Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Stuart JC, Voets GM, Van Den Munckhof 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
42. **Marshall B y Levy S. 2011.** Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin Microbiol Rev* 24: 718-733. doi: 10.1128/CMR.00002-11.

43. **Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. 1988.** Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxymino-cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 32(8): 1243-1246.
44. **Methner U, Merbach S, Peters M. 2018.** *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar *Choleraesuis* in a German wild boar population: occurrence and characterization. *Acta Vet Scand* 60:65 doi: <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0422-4>
45. **Miller T, Prager R, Rabsch W, Fehlhaber K, Voss M. 2010.** *Lohmann Information* 45(2): 27-31
46. **MINAG, 2007.** Aprueban el reglamento del sistema sanitario avicola (D.S. N°029-2007). [Internet] [21 febrero 2020] Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/senasa/normas-legales/1050290-029-2007-ag-020-2009-ag>
47. **MINAG. 2019.** Boletín estadístico mensual de la producción y comercialización avícola Marzo 2019. [Internet] [21 febrero 2020] Disponible en: <http://siea.minagri.gob.pe/siea/?q=noticias/produccion-y-comercializacion-avicola-marzo-2019>
48. **MINSA. 2020.** Reglamento sanitario de funcionamiento de mercados de abasto (R.M. N° 282-2003-SA/DM) [Internet]. [10 Febrero 2020]. Disponible en: [http://www.digesa.minsa.gob.pe/Orientacion/REGLAMENTO\\_SANITARIO\\_MERCADO\\_S\\_ABASTO\\_RM\\_282-2003-SA-DM.pdf](http://www.digesa.minsa.gob.pe/Orientacion/REGLAMENTO_SANITARIO_MERCADO_S_ABASTO_RM_282-2003-SA-DM.pdf)
49. **Murray M, Salvatierra G, Dávila-Barclay A, Ayzanoa B, Castillo-Vilcahuaman C, Huang M, Pajuelo M, et al. 2021.** Market Chickens as a source of antibiotic-resistant *Escherichia coli* in a peri-urban community in Lima, Perú. *Front. Microbiol.* 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.635871>.
50. **Nahar A, Awasthi SP, Hatanaka N, Okuno K, Hoang PH, Hassan J, Hinenoya A, et al. 2018.** Prevalence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. *J Vet Med Sci* 80: 510-517. doi: 10.1292/jvms.17-0708
51. **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(2): 296-301
52. **Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, et al., 2011.** Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarreogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 28(1): 13-20

53. **Octavia S y Lan R. 2014.** The family Enterobacteriaceae. In: Rosenberg E., DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds). *The Prokaryotes*. Springer, Berlin, Heidelberg. 226-273 doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1\\_167](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38922-1_167)
54. **Ojer-Usoz E, González D, Vitas A, Leiva J, García-Jalón I, Febles-Casquero A, Escolano ML. 2013.** Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Sci* 93: 316- 321. doi: 10.1016/j.meatsci.2012.09.009
55. **Ojer-Usoz E, González D, García-Jalón I, Vitas AI. 2014.** High dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants. *Water Research*. 56, 37–47. Doi: 10.1016/j.watres.2014.02.041
56. **Oliver A y Cantón A. 2005.** Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca y Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. SEIMC [Internet], [20 febrero 2020]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/Blees.pdf>
57. **OMS. 2018.** Salmonella (no tifoidea) [Internet]. [10 mayo 2020]. 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))
58. **OMS. 2019.** Inocuidad de los alimentos [Internet]. [20 febrero 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
59. **Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M, Eustace A, Xu L, Hawkey PM, Heck M, Savelkoul P, et al. 2011.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17(7): 1216-1222 doi: 10.3201/eid1707.110209.
60. **Padilla M. 2011.** Detección de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* mediante método de Jarlier. *Archivos Bolivianos de Medicina* 16(84), 107. ISSN 0004-0525. doi: v16n84/v16n84a02.
61. **Perozo AJ y Castellano MJ. 2009.** Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*. *Kasmera*. 37(1): 25-37.
62. **Philippon A, Arlet G, Lagrange PH. 1994.** Origin and Impact of Plasmid-Mediated Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 17-29. doi: 10.1007/BF02390681
63. **Philippon A, Labia R, Jacoby G. 1989.** Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 33(8): 1131-1136 doi: 10.1128/aac.33.8.1131
64. **Quesada A, Reginatto GA, Ruiz A, Colantonio LD, Burrone MS. 2016.** Resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp. aislada de alimentos de origen animal para consumo

- humano. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 33(1): 32-44 doi: 10.17843/rpmesp.2016.331.1899
65. **Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G.** 2002. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 46(2): 602-604 doi: 10.1128/AAC.46.2.602-604.2002
66. **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.
67. **Riveros M, Ochoa TJ.** 2015. Enteropatógenos de importancia en salud pública. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 32(1): 157-164
68. **Romero L, López L, Rodríguez-Baño J, Ramón Hernández J, Martínez-Martínez L y Pascual A.** 2005. Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(8), 625–631. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01194.x
69. **Rouger A, Tresse O, Zagorec M.** 2017. Bacterial contaminants of poultry meat: Sources, species, and dynamics. *Microorganisms*. 5(3) 50 doi: 10.3390/microorganisms5030050
70. **Ruiz-Roldán L, Martínez-Puchol S, Gomes C, Palma N, Riveros M, Ocampo K, Durand D, et al.** 2018. Presencia de *Enterobacteriaceae* y *Escherichia coli* multirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Pública* 35(3): 425-32. doi: 10.17843/rpmesp.2018.353.3737
71. **Sekoai P, Feng S, Zhou W, Ngan W, Pu Y, Pan Y, Habimana O.** 2020. Insights into the microbiological safety of wooden cutting boards used for meat processing in Hong Kong's wet markets: A focus on food-contact surfaces, cross-contamination and the efficacy of traditional hygiene practices. *Microorganisms* 8(4), 579 doi: 10.3390/microorganisms8040579
72. **Shrestha A, Bajracharya 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 bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. *BMC Res Notes* 10: 574. doi: 10.1186/s13104-017-2917-x.
73. **Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, et al.** 2010. Broad-spectrum  $\beta$ -lactamases among *Enterobacteriaceae* of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 34, Issue 3, 295 – 316. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00198.x.

74. **Tanimoto K, Nomura T, Hashimoto Y, Hirakawa H, Watanabe H, Tomita H. 2021.** Isolation of *Serratia fonticola* Producing FONA, a minor extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), from imported chicken meat in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 74, 79-81. doi: 10.7883/yoken.JJID.2020.114
75. **Tekiner IH y Özpınar H. 2016.** Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Braz J Microbiol* 47: 444-451 doi: 10.1016/j.bjm.2015.11.034.
76. **Thrusfield M. 1990.** *Epidemiología veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza, España. p 42-43.
77. **Tschudin-Sutter S, Frei R, Stephan R, Hächler H, Nogarth D, Widmer AF. 2014.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: a threat from the kitchen. *Infect Control Hosp Epidemiol* 35: 581-4. doi: 10.1086/675831.
78. **Tyrer S y Heyman. 2016.** Sampling in epidemiological research: issues, hazards and pitfalls. *BJPsych Bull.* 40(2): 57-60. doi: 10.1192/pb.bp.114.050203
79. **Vincent C, Boerlin P, Daignault D, Dozois CM, Dutil L, Galanakis C, Reid-Smith RJ, et al. 2010.** Food Reservoir for *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections. *Emerg Infect Dis* 16(1): 88-89 doi: 10.3201/eid1601.091118
80. **Vitas AI, Naik D, Perez-Etayo L, González D. 2018.** Increased exposure to extended-spectrum  $\beta$ -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
81. **Weese JS, Reid-Smith RJ, Avery BP, Rousseau J. 2010.** Detection and Characterization of *Clostridium Difficile* in Retail Chicken. *Lett Appl Microbiol.* 50(4): 362-5. doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02802.x.
82. **Weill F, Lailier R, Praud K, Kérouanton A, Fabre L, Brisabois A, Grimont P, et al. 2004.** Emergence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase (CTX-M-9)- producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. 5767 – 5773 p. doi: 10.1128/JCM.42.12.5767–5773.2004.
83. **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
84. **Xi M, Wu Q, Wang X, Yang B, Xia X, Li D. 2015.** Characterization of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Retail Foods in Shaanxi Province, China. *J Food Prot* 78(5): 1018-1023 doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-490
85. **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. Peru Med Exp Salud Pública. 28(01): 128-135 doi: <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.281.467>

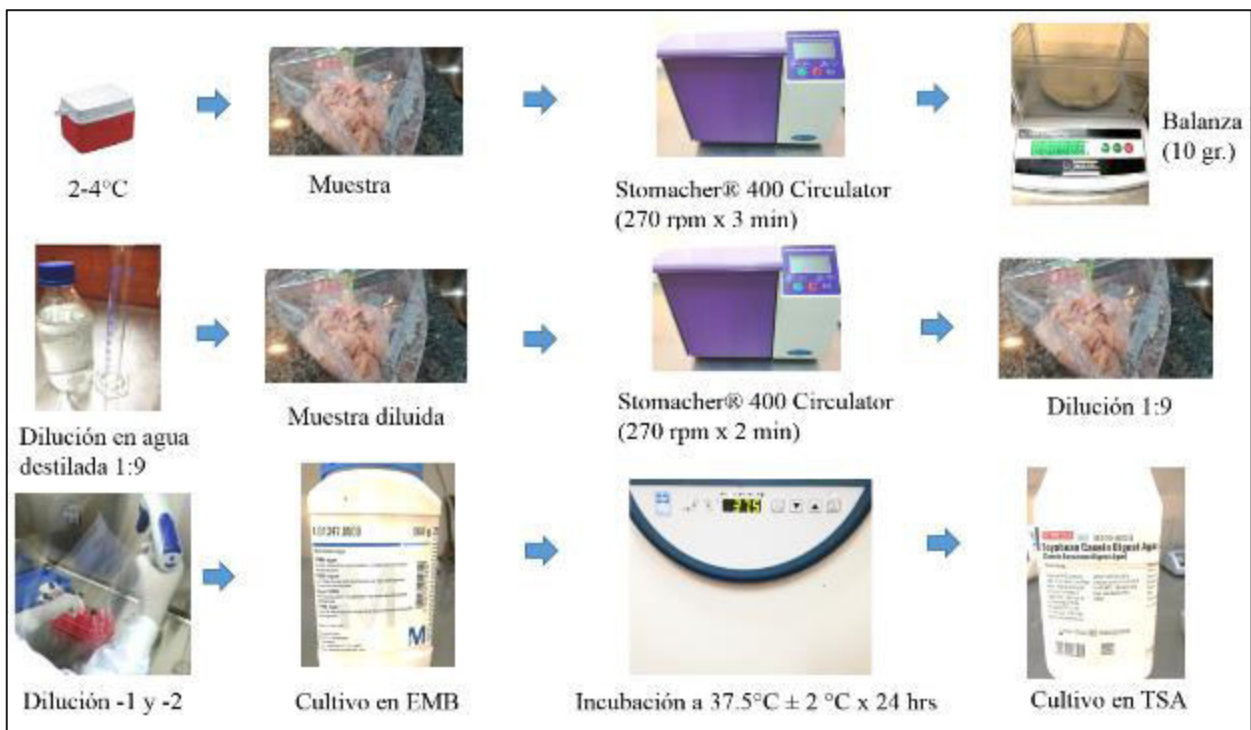
- 86. Zogg Al, Zurfluh K, Nüesch-Inderbinen M, Stephan R. 2016.** Characteristics of ESBL-producing Enterobacteriaceae and Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Swiss and imported raw poultry meat collected at retail level. Schweiz Arch Tierheilkd 158(6): 451-556 doi: [10.17236/sat0007](https://doi.org/10.17236/sat0007)



## IX. ANEXOS

### ANEXO 1

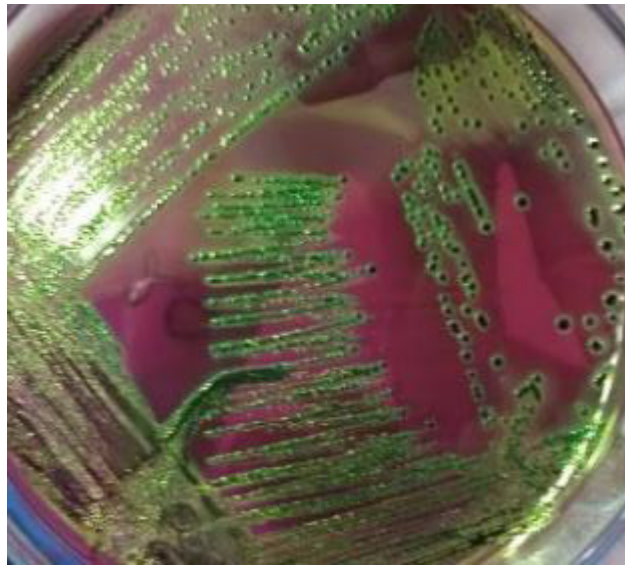
#### Flujo de aislamiento bacteriano



## ANEXO 2

### Aislamientos bacterianos en agar EMB y TSA

- *Escherichia coli* en agar EMB



- *Serratia licuefaciens* en agar EMB



- *Salmonella enterica* serovar *choleraesuis* en agar EMB

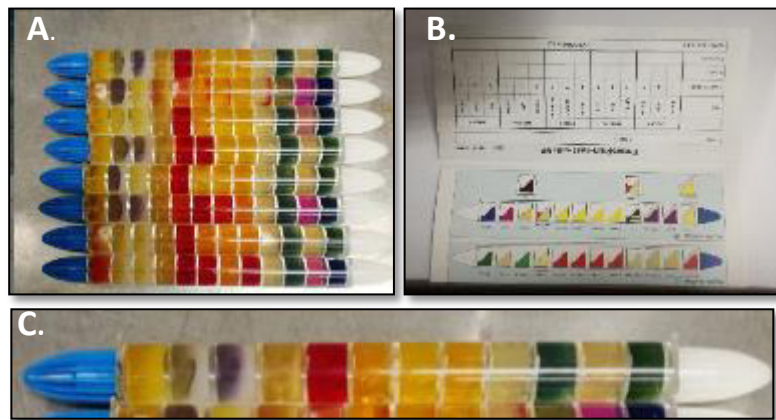


- *Escherichia coli* en agar TSA



## ANEXO 3

### Identificación bioquímica

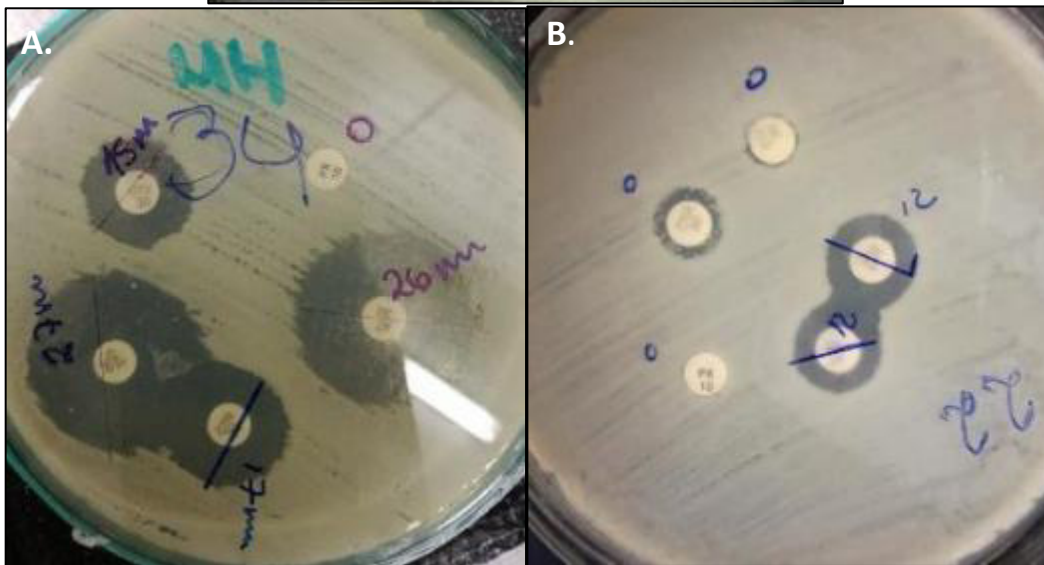


A. Identificación bioquímica de enterobacterias por género y especie, mediante el kit EnteroPluri-Test®.

B. Comparación de resultados con el patrón de bioquímica. C. Identificación de *Escherichia coli*.

#### ANEXO 4

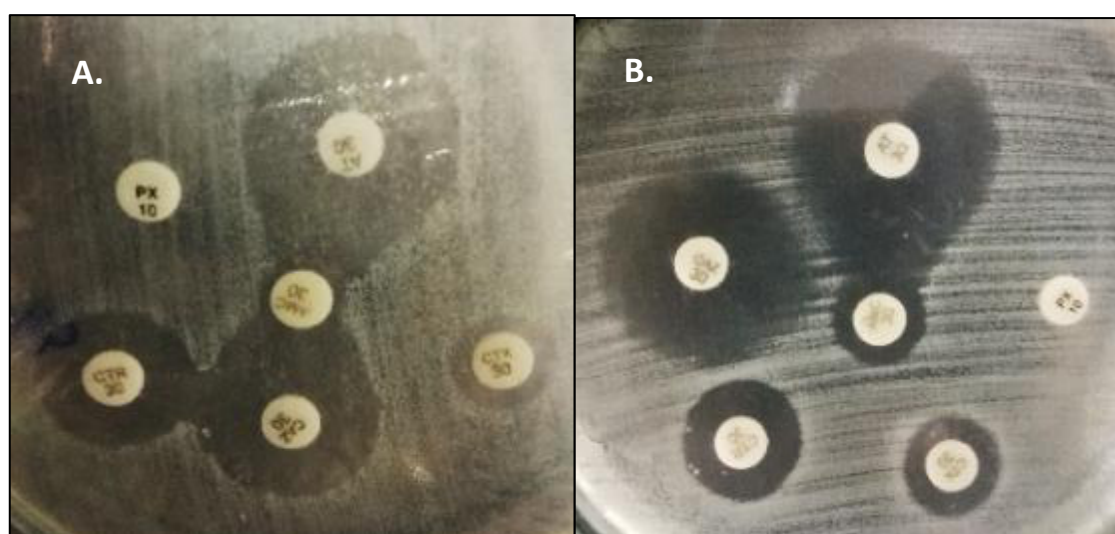
Análisis de susceptibilidad mediante el método Kirby – Bauer, para detección de cepas sospechosas de producción de BLEE



A. Se puede observar resistencia de *Klebsiella ozaenae* a cefpodoxima (PX), aztreonam (AT), cefotaxima (CTX) y ceftriaxona (CTR). B. Se puede observar resistencia de *E. coli* a todos los antibióticos cefpodoxima (PX), aztreonam (AT), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) y ceftriaxona (CTR).

## ANEXO 5

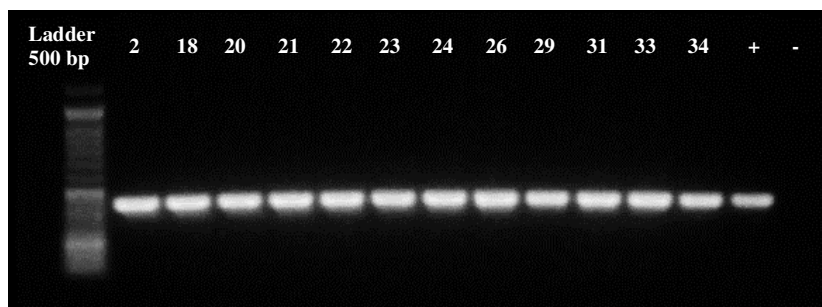
### Análisis de susceptibilidad mediante método de doble disco, para detección de cepas confirmadas de producción de BLEE



Se pueden observar las sinergias en forma de cola de pez. A. Cepa de *E. coli* productora de BLEE con fenotipo de sinergia para más de un antibiótico aztreonam (AT), cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ). B. Cepa de *E. coli* productora de BLEE con fenotipo de sinergia para un antibiótico aztreonam (AT), se puede observar que ceftazidima (CAZ) ofrece una sinergia leve.

## ANEXO 6

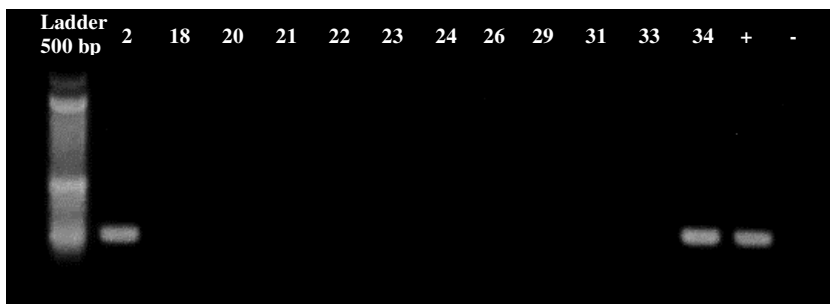
### Electroforesis para la detección de genes CTX-M-1 (12/12) 100% (415 bp)



Control positivo: *Escherchia coli* Vc1 (+). Control negativo: Agua ultrapura (-). Muestras: 2 (*Salmonella enterica*), 18 (*E. coli*), 20 (*E. coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*E. coli*), 23 (*E. coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*E. coli*), 29 (*E. coli*), 31 (*E. coli*), 33 (*E. coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Todas las muestras resultaron positivas (100%).

## ANEXO 7

### Electroforesis para la detección de genes CTX-M-9 (2/12) 16.6% (205 bp)



Control positivo: *Escherichia coli* Vc2 (+). Control negativo: Agua ultrapura (-). Muestras: 2 (*Salmonella enterica*), 18 (*Escherichia coli*), 20 (*Escherichia coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*Escherichia coli*), 23 (*Escherichia coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*E. coli*), 29 (*E. coli*), 31 (*E. coli*), 33 (*E. coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Las muestras positivas fueron las cepas 2 (*Salmonella choleraesuis*) y 34 (*Klebsiella ozaenae*) (16.6%).



## ANEXO 8

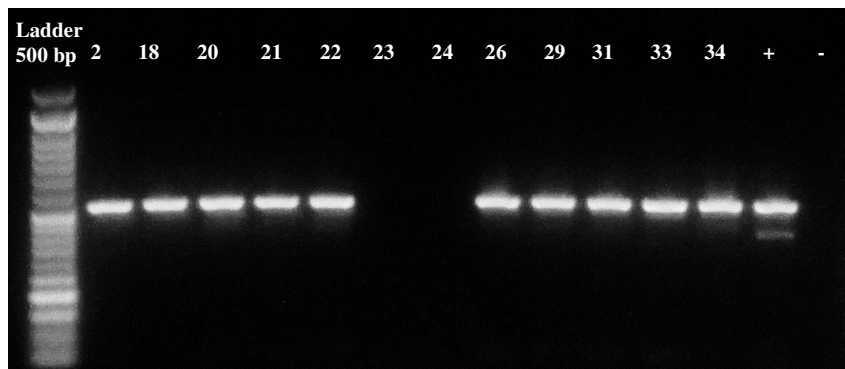
### Electroforesis de PCR dúplex para la detección de CTX-M-2 (552 bp)



Control positivo: *Escherchia coli* Vc4 (+). Control negativo: Agua ultrapura (-). Muestras: 2 (*Salmonella enterica*), 18 (*E. coli*), 20 (*E. coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*E. coli*), 23 (*E. coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*E. coli*), 29 (*E. coli*), 31 (*E. coli*), 33 (*E. coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Todas las muestras resultaron negativas para el gen CTXM-2.

## ANEXO 9

### Electroforesis de PCR dúplex para la detección de TEM (516 bp) y SHV (392 bp)



Control positivo: *Escherchia coli* Vc3 (+). Control negativo: Agua ultrapura (-). Muestras: 2 (*Salmonella enterica*), 18 (*E. coli*), 20 (*E. coli*), 21 (*Serratia odorifera*), 22 (*E. coli*), 23 (*E. coli*), 24 (*Klebsiella ozaenae*), 26 (*E. coli*), 29 (*E. coli*), 31 (*E. coli*), 33 (*E. coli*), 34 (*Klebsiella ozaenae*). Todas las muestras resultaron positivas para el gen TEM con excepción de las cepas 23 (*E. coli*) y 24 (*Klebsiella ozaenae*) (83.3%). Ninguna muestra fue positiva para el gen SHV.

## ANEXO 10

### Método GenJET Genomic DNA Purification kit Thermo Scientific™

#### Consideraciones previas

1. Asegurar materiales estériles.
2. Aislar una colonia pura en agar TSA para su crecimiento a 37.5°C durante 24 hrs.
3. Incubar una colonia de la siembra fresca en 1 ml de caldo TSB en viales de 2 ml a 37.5 hrs durante 3 horas.
4. Agregar etanol al 96-100% al Wash Buffer I y Wash Buffer II.
5. Preparar etanol al 50%

#### Protocolo de extracción de ADN

1. Centrifugar el vial de 2ml a 5000 g durante 10 minutos. Desechar sobrenadante.
2. Resuspender el pellet en 180 µl de Digestion solution. Agregar 20 µl de Proteinasa K y mezclar completamente mediante vórtex para obtener una suspensión uniforme.
3. Incubar la muestra a 56°C mientras se agita en un vórtex ocasionalmente, hasta que las células estén completamente lisadas (aproximadamente durante 30 minutos).
4. Posteriormente, agregar 20 µl de RNAsa A, mezclar en vórtex e incubar la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Agregar 200 µl de Lysis solution a la muestra. Mezclar bien, agitando en vórtex durante 15 segundos hasta obtener una mezcla homogénea.
6. Agregar 400 µl de etanol al 50% y agitar en vórtex.
7. Transferir el lisado preparado a una columna de purificación de ADN GenJet insertada en un tubo de recolección. Centrifugar la columna a 6000 g durante 1 minuto. Desechar el tubo de recolección. Colocar la columna de purificación de ADN en un nuevo tubo de recolección de 2 ml.
8. Agregar 500 µl de Wash buffer I. Centrifugar a 8000 g durante 1 minuto. Desechar el sobrenadante y colocar la columna de purificación nuevamente en el tubo de recolección.
9. Agregue 500 µl de Wash buffer II a la columna de purificación. Centrifugar a 12000 g durante 3 minutos. Desechar el tubo de recolección que contiene la solución de flujo y transferir la columna de purificación de ADN a un nuevo vial estéril de 1.5 ml.

10. Agregar 50  $\mu$ l de Elution Buffer al centro de la membrana de la columna de purificación para eluir el ADN genómico. Incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 8000 g durante 1 minuto.
11. Tomar el elution buffer con el ADN genómico centrifugado y colocarlo nuevamente en la columna de purificación para repetir la centrifugación (8000 g durante 1 minuto).
12. Desechar la columna de purificación y almacenar la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- Materiales del GenJET Genomic DNA Purification kit Thermo Scientific™



- Multi-Block utilizado para la incubación de las muestras a  $56^{\circ}\text{C}$  en el paso 3



## ANEXO 11

### Electroforesis en gel agarosa

1. Preparación de gel agarosa al 2%. Se pesaron 1.65 gramos de agarosa para cada electroforesis y medir 82.5 ml de buffer TBE 1X.
2. Se agregó la mezcla anteriormente mencionada en un matraz de vidrio y se colocó en un microondas durante 2 minutos.
3. Se retiró el matraz del microondas y se esperó a que se enfríe un poco la solución. Luego, se agregaron 4  $\mu$ l de bromuro de etidio y se agitó el matraz suavemente.
4. La nueva solución se agregó a la bandeja de electroforesis con los respectivos peines respectivos.
5. Esperar 10 minutos hasta que enfríe completamente el gel y adicionar buffer TBE 1X en la bandeja hasta que cubra el gel
6. Se adicionaron 5  $\mu$ l de ladder 500 bp en la primera rendija y 8  $\mu$ l de producto de PCR de cada muestra en los demás pocillos.
7. Se conecta la bandeja de electroforesis a la fuente de poder en 90 v durante 120 minutos.
8. Se utilizó un transiluminador de luz UV para revelar el gel. Las bandas diagnósticas tenían la medida de cada control positivo para cada electroforesis (*bla*<sub>CTX-M-1</sub> - 415 bp; *bla*<sub>CTX-M-9</sub> - 205 bp; *bla*<sub>TEM</sub> - 416 bp y *bla*<sub>SHV</sub> - 392 bp; *bla*<sub>CTX-M-2</sub> - 552 bp).