

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, LEÓN**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS**  
**MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**



**TESIS**

**Para optar al Título de Máster en Ciencias con Mención en Microbiología  
Médica.**

**Título:**

**Detección de coliformes fecales en carnes de consumo comercializadas en los principales mercados de la ciudad de León, Nicaragua (octubre-noviembre del 2013, julio y septiembre del 2014).**

**Autora: Lic. Yadira Marisol Rivera Acevedo.**

**Tutor: Dr. Erick Amaya, PhD.**

**Profesor Titular del Departamento de Microbiología y Parasitología.**

**Facultad de Ciencias Médicas, UNAN-León.**

**León, Febrero del 2015.**

Dedico este trabajo de tesis con mucho amor a: mis padres; *César Manuel y María Mayela,*  
a *Hugo Romero*  
y a mi pedacito de alma, mi sobrina *Allison Nicolle.*

*"Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad"*

**Albert Einstein**

## **Agradecimientos**

Agradezco en primer lugar a mi pilar más poderoso DIOS pues sin su voluntad y la fuerza que me da, este estudio no hubiese podido terminarse, a mis padres, un agradecimiento especial a mis hermanas *Scarleth* y *Mayela* quienes han estado apoyándome en cada paso y decisión que he tomado en mi vida.

Agradezco de todo corazón a todo el personal del laboratorio de Microbiología y Parasitología por su apoyo en el trabajo experimental de esta tesis, así como a las estudiantes de pregrado de la carrera de Bioanálisis Clínico Yunieth González y Karen Parajón por su apoyo en el material de análisis en el año 2013, y a los estudiante Holman Silva y Ninoska Gaitan por su apoyo durante el año 2014.

A mi tutor *Dr. Erick Amaya* por su tiempo y apoyo incondicional en la realización de esta tesis.

Al *Dr. Samuel Vílchez* Jefe del Dpto. de Microbiología y Parasitología por su apoyo al brindarme todo el material necesario para obtener los resultados que en mi tesis se presentan y por su incondicional asesoría en el trabajo experimental de laboratorio.

Al *Dr. Félix Espinoza* quien me impulso para que estudiara esta maestría, *mil gracias*.

Al Lic. Aroldo Argeñal por su valioso apoyo en la logística y el procesamiento de los resultados de esta tesis. Maestro *mil gracias*.

## RESÚMEN.

Las enfermedades de transmisión alimenticia (ETA) son una causa importante de enfermedad y muerte en todo el mundo. En Nicaragua las ETA se asocian en un 10% de los casos a la infección por *Escherichia coli* (*E. coli*), lo que pone de manifiesto el grado de contaminación fecal de los alimentos que consumimos. Por tal motivo se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en dos de los tres centros de venta más grandes de la ciudad de León con el objetivo de descartar contaminación de las carnes de consumo que se expenden en estos establecimiento y determinar si dentro de ese grupo de contaminantes se encuentran patotipos de *E. coli* diarrogénica y otras bacterias antibiótico resistentes. Se analizaron un total de 86 muestras de carne durante el período de octubre- noviembre del 2013 y julio y septiembre del 2014 en los mercados MRC y MSB de la ciudad de León. Se recuperaron un total de 73 aislados positivos (84.9%) del total de muestras analizadas. Dentro del grupo de coliformes fecales encontrados *E. coli* fue la que se presentó en mayor frecuencia con 30 aislados positivos (34.9%) lo que evidencia el grado de contaminación que excede el rango establecido en el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 para coliformes fecales, sin embargo; 13 muestras resultaron negativas (15.1%). Al analizar los 30 aislados positivos con *E. coli* utilizando un PCR para la identificación de genes de virulencia que codifican para los patotipos de *E. coli* (*eaeA*, *bfpA*, *vt1* y / o *vt2*, *eltB* y / o *estA*, *ial* y PCVD) no se identificó ninguna célula viable con estos genes. En cuanto al perfil de resistencia de todos los aislados se observó una marcada resistencia a los aminoglucósidos; de las 73 muestras con crecimiento bacteriano (84.8%) presentaban resistencia a este antibiótico. Este estudio da inicio a lo que podría ser un plan de intervención local para evitar contaminación bacteriana de las carnes que estamos consumiendo en la ciudad de León.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
2. JUSTIFICACIÓN.....	5
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	6
4. OBJETIVOS.....	7
3. MARCO TEÓRICO .....	8
7. MATERIAL Y MÉTODO. ....	25
7.1 Tipo de estudio.....	25
7.2 Área de estudio.....	25
7.4 Recolección, almacenamiento y transporte de las muestras. ....	25
7.5 Criterios de inclusión.....	26
7.6 Procesamiento de la muestra.....	27
7.7 Análisis de los Resultados .....	36
8. RESULTADOS .....	37
9. DISCUSIÓN.....	44
10. CONCLUSIONES.....	47
11. RECOMENDACIONES. ....	48
12. BIBLIOGRAFÍA.....	49
13. ANEXOS. ....	56

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: Adenosin monofosfato ciclico

ARN: Ácido ribonucleico

aw : actividad de agua en el medio

BLEE: beta- lactamasas de espectro extendido

CDC: Centers of control disease

CFA: Factores antigenicos de colonizacion

CLSI: Clinical and Laboratory Standards

CPA: agar para conteo en placa

D: tiempo necesario para dividir por 10 la poblacion inicial de microorganismo de riesgo microbiologico peligroso

DEC: *E. coli* diarrogenicas

DMI: dosis minima infectiva

ECAD: *E. coli* de adherencia difusa

ECEA: *E. coli* enteroagregativa

ECEH: *E. coli* Enterohemorragica

ECEI: *E. coli* enteroinvasiva

ECEP: *E. coli* enteropatogena

ECET: *E. coli* enterotoxigenica

ECST: *E. coli* productora de toxina Shiga

ECVT: *E. coli* Verotoxigenica

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EMA: Enzimas modificadoras de aminoglucósidos

ETA: Enfermedades de transmisión alimenticia

GMPc: Guanosín monofosfato cíclico

IL: interleukina

KDa: kilo dalton

LPS: Lipopolisacárido

McK: MacConkey

MUG: fluorogen 4metilumbeliferil -BD- glucurónido

OMS: Organización Mundial de la salud

ONT: antígeno O no tipificable

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

PMN: Polimorfonuclear

RTE: Ready to eat

SS: Salmonella-Shigella

STX: Toxina Shiga

SUH: Síndrome urémico hemolítico

UFC: Unidades formadoras de colonias

## 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de transmisión alimenticia (ETA) son una causa importante de enfermedad y muerte en todo el mundo <sup>(3)</sup>. Son todas las enfermedades que se adquieren por medio del consumo de alimentos contaminados, lo que podría producir, dependiendo del patógeno implicado, infecciones o intoxicaciones <sup>(4, 5)</sup>. En el mundo en desarrollo, este suceso conduce la muerte de muchos niños <sup>(6)</sup>, de igual manera constituyen un problema de salud pública y se reconoce cada vez más su repercusión sobre la salud de la población, ya sea por la frecuencia con la que ocurren como por el impacto que pueden causar, llegando a ocasionar casos fatales <sup>(4)</sup>.

El amplio repertorio de patógenos asociados a ETA ha variado con el pasar del tiempo, probablemente debido a medidas de control e inocuidad de los alimentos, sin embargo; están surgiendo nuevos microorganismos asociados a contaminación de los alimentos y se sugiere podría ser producto de cambios en la ecología microbiana e inclusive por contaminación en cualquiera de las etapas de producción de los alimentos. Estos microorganismos pueden surgir también con nuevos factores de virulencia y de resistencia adquiridos mediante elementos genéticos móviles y de transferencia a través de bacteriófagos <sup>(7)</sup>.

Según estudios publicados por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos, cada año, alrededor de 48 millones de personas enferma y se estima que 128.000 son hospitalizadas y 3.000 mueren debido a enfermedades transmitidas por los alimentos <sup>(3, 7-9)</sup>.

La contaminación de los alimentos es una consecuencia directa de las deficiencias sanitarias durante su proceso de elaboración, manipulación, transporte, almacenamiento y las condiciones en que son suministrados al consumidor. Los microorganismos provenientes de diferentes fuentes de contaminación que pueden ser virus, bacterias, parásitos, toxinas; son transferidos a la superficie de los alimentos donde encuentran los nutrientes necesarios para proliferar hasta

títulos de  $10^{-2}$ - $10^{-5}$  UFC/cm<sup>2</sup> convirtiéndose de esta manera en una amenaza a la salud de quien los consume <sup>(10)</sup>.

El control y prevención de las ETA sigue siendo un desafío en todo el mundo, pues no se conoce su incidencia real. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, dependiendo del país, entre el 15 y el 70 % de los casos de diarrea se dan en niños menores de cinco años de edad a causa de alimentos contaminados <sup>(4)</sup>. Según OMS, en América Latina y el Caribe se producen 1,500 millones de casos de diarrea por año, y mueren tres millones de niños menores de cinco años por la misma causa <sup>(4)</sup>.

La bacteria *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (ECST) se considera actualmente un patógeno emergente transmitido por alimentos <sup>(11)</sup>. Existen numerosos serotipos de ECST asociados a enfermedad en humanos, entre los cuales prevalece el serotipo O157:H7; siendo la carne molida de res el principal vehículo de transmisión por el grado de manipulación de la misma <sup>(11-17)</sup>.

En Nicaragua existen pocos datos sobre infecciones transmitidas por alimentos contaminados y si se toma en cuenta la venta difundida de alimentos de producción artesanal y hábitos alimentarios inadecuados, esto; podría estar relacionado a las enfermedades diarreicas que afectan a la población Nicaragüense <sup>(18)</sup>, por tal motivo esta investigación pretende aislar e identificar coliformes fecales en la carne de consumo comercializada en dos mercados de los tres principales centros de compra de la ciudad de León, así como determinar si dentro del grupo se encuentran *E. coli* que son antibiótico-resistentes y además patógenas, lo cual podría representar una posible fuente de diseminación de este tipo de patógeno en la comunidad.

## 1. ANTECEDENTES

Las primeras infecciones por ECST O157 fueron reportadas en 1982, cuando ECST O157:H7 fue implicada en brotes asociados con dos cadenas de restaurantes de comida rápida en los Estados Unidos <sup>(12)</sup>. Desde entonces, el número de casos y brotes a nivel mundial debido a ECST O157 es cada vez mayor, aunque las cepas de *E. coli* no O157 también han sido asociadas a brotes alimenticios e intoxicaciones en humanos por lo que se ha convertido en motivo de investigación en muchos laboratorios <sup>(12)</sup>. Se estima que en los Estados Unidos, ECST O157:H7 causa 73.000 casos y 250 muertes al año <sup>(19)</sup>. El primer brote comunitario asociado a ECST O157: H7 en Europa se produjo en el Reino Unido en el verano de 1985; nuevos reportes de brotes y casos esporádicos se ha informado en Europa desde entonces <sup>(19)</sup>.

Según el programa de vigilancia FoodNet, que se lleva a cabo en E.U.A. desde 1996; se identificó para el año 2013 un total de 19,056 infecciones, 4,200 hospitalizaciones y 80 muertes entre los casos de infección con patógenos transmitidos comúnmente a través alimentos. Reporta una incidencia de casos de *Salmonella* más baja en el año 2013 en comparación con el 2010- 2012 pero se reporta mayor número de casos de infecciones por *Vibrio sp*, y del total de hospitalizaciones por ETA la mayoría de los casos se presentaron en pacientes por encima de los 65 años de edad. Este mismo programa estima que para el año 2020 habrá una alta incidencia de infecciones transmitidas por alimentos en niños menores de 5 años <sup>(20, 21)</sup>.

En el 2006 un brote de ECST O157 estuvo ligado al consumo de productos frescos, productos empacados en bolsas y espinacas; este, involucró 26 estados de E.U.A ; y Canadá informó 205 casos de la enfermedad y 3 muertes producto de la misma causa <sup>(19)</sup>.

Durante el año 2001 se registraron en Nicaragua 30 brotes de ETA y 13 casos esporádicos afectando en total a 363 personas, y para el año 2002 el servicio de

vigilancia epidemiológica registró 23 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos y 12 casos esporádicos afectando en total a 159 personas, sin presentarse casos fatales<sup>(4)</sup>.

En Nicaragua los brotes de intoxicación alimenticia se producen especialmente por *Staphylococcus aureus* (20 % de los casos) y *E. coli* (10 % de los casos) <sup>(18)</sup>. El Ministerio de Salud de Nicaragua (MINSa) en su boletín epidemiológico de la semana 22 reporta una tasa de incidencia de 0.32 (8 casos) por cada 10,000 habitantes para el año 2013, y de 0.30 (11 casos) por cada 10,000 habitantes en el año 2014 <sup>(22)</sup>.

Producto de este problema de contaminación de las carnes, se ha explorado la contaminación por bacterias principalmente por *E. coli* *diarrogénicas* en las carnes de consumo en centros a nivel mundial, principalmente en potencias como E.U.A a través de programas de Monitoreo Nacional de la Resistencia, en el estudio ejecutado en cinco años desde el 2002 al 2007 en el que se recolectaron 7,258 aislados de *E. coli* para confirmar la presencia de ECST, analizándose además otros 1,275 aislados de *E. coli* para otros genes virulencia en *E. coli* no O157 pero si diarrogénicas <sup>(12)</sup>, se obtuvieron los siguientes resultados : diecisiete aislamientos (16 de carne de res molida y 1 de una chuleta de cerdo) eran positivo para genes stx, incluyendo 5 positivos tanto para stx1 y stx2 , 2 positivos para stx1 y 10 positivos para stx2, las diecisiete cepas de ECST pertenecían a 10 serotipos diferentes a O 157: H7. Ninguno de los aislamientos de ECST contenía el gen *eae*, mientras que otros siete llevaron el gen *hlyA* de *E. coli* *enterohemorrágica* (ECEH), de igual forma la presencia de cepas ECEP (*E. coli* *enteropatógena*) atípicas en la carne al por menor es preocupante debido a su potencial para causar infecciones humanas <sup>(12)</sup>.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Brotos de infecciones transmitidas por alimentos son bastante común en Nicaragua<sup>(4)</sup>, en especial se asocian a *E. coli* (la cual es considerada como un coliforme fecal). Además se reporta que existen patotipos de *E. coli* que son asociados a casos de diarrea en niños, y que un creciente número de bacterias que causan enfermedades son resistentes a la acción de los antibióticos.

Bajo esa perspectiva surge la necesidad de investigar cuales son las fuentes de dispersión de bacterias patogénicas y bacterias antibiótico resistente; entre estas fuentes de contaminación podría estar la carne molida, que por la falta de higiene en su manipulación y/o almacenamiento inapropiado podría contribuir al esparcimiento de los patógenos antes mencionados.

### 3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se encuentran las carnes comercializadas en dos de los principales mercados de la ciudad de León contaminadas con coliformes fecales?

De existir contaminación por coliformes fecales, ¿Algunos de estos coliformes fecales podría ser patotipos de *E. coli* diarrogénica o bacterias antibiótico resistente?

#### **4. OBJETIVOS.**

1. Determinar la calidad bacteriológica de las carnes de consumo que se expenden en dos de los principales mercados de la ciudad de León en octubre- noviembre del 2013, julio y septiembre del 2014.
2. Identificar dentro del grupo de coliformes fecales en las carnes de consumo la presencia de *E. coli* diarrogénica y/o presencia de bacterias antibiótico resistente en el período de estudio.

### 3. MARCO TEÓRICO

Los cambios en los sistemas de vida y los hábitos alimenticios de la población han conducido al aumento de enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados <sup>(4, 23)</sup>. La Organización Mundial de la Salud OMS define a las enfermedades de transmisión alimentaria como una enfermedad de naturaleza infecciosa o debida a toxinas, causada por agentes que ingresan al organismo a través del consumo de alimentos <sup>(24)</sup>. Actualmente varios alimentos sirven como guía de infecciones o enfermedades alimenticias, principalmente la carne y sus productos son importantes vectores de bacterias como *Salmonella*, *Campylobacter jejuni/coli*, y *E. coli verotoxigenica* no es la excepción<sup>(25)</sup>.

Según La OMS, existen 250 tipos de enfermedades transmitidas por alimentos que se consolidan como un problema de salud pública, capaces de afectar la productividad económica de la sociedad y generar altos costos a los servicios de salud <sup>(3, 26, 27)</sup>.

La OMS estima que el 70% de las enfermedades diarreicas son transmitidas por los alimentos y que solo en E.U.A se producen 76 millones de ETA cada año, resultando en 325,000 hospitalizaciones y 5,200 muertes <sup>(3, 28)</sup>. Estas son causadas por una gran variedad de agentes infecciosos y, a menudo, ocurren como brotes, por lo que la vigilancia epidemiológica es de vital importancia <sup>(19)</sup>. En América Latina las ETA representan alrededor del 70% de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de La OMS <sup>(3, 8)</sup>.

Muchos investigadores han estudiado la presencia de *E. coli* antibiótico resistente en varias partes del mundo y en diferentes tipos de carnes, así lo demuestra un estudio realizado en Bangladesh en aves silvestres y aves de corral en el que investigaban la presencia de *E. coli* multidrogaresistente en ese tipo de carne, efectivamente la multiresistencia se encontró en el 22.7 % de las *E. coli* aisladas

de muestras de aves y el 30% de estas *E. coli* eran BLEE positivo, incluyendo clones de CTX-M, producto del uso ilimitado de antibióticos en la crianza de aves de corral <sup>(29)</sup>.

El 4 de agosto del 2010 el Centro de Control de Enfermedad infecciosas (CDC) investigó dos aislamientos de ECST O26 no móviles, que eran indistinguibles en electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE), en ambos casos los pacientes tenían diarrea, dolor abdominal y calambres, ambos compraron en tiendas en la misma ciudad y el informe hacía referencia al consumo de carne molida <sup>(30)</sup>.

Otro estudio que pretendía evidenciar la presencia de *E. coli* productora de toxina shiga y de otras *E. coli* potencialmente diarrogénica, de un total de 1275 aislados positivos de *E. coli* 34 tenían genes que codificaban para la toxina shiga en sus diferentes grupos y 11 aislados resultaron positivos para ECEP <sup>(12)</sup>.

En un estudio para determinar la prevalencia y caracterización de *E. coli* no O157 pero productora de toxina shiga en carne molida de res en E,E,U,U, este fue un estudio de un año y se amplificó el ADN de 1006 muestras de carne molida que presentaban la toxina shiga <sup>(31)</sup>.

A pesar de existir estudios como este a nivel mundial en Nicaragua este fenómeno no se conoce aunque las autoridades del Ministerio de Salud reporten un 10 % de ETA asociado a *E. coli*.

### **Origen de los microorganismos patógenos presentes en los alimentos.**

Pueden ser endógenos (ya están presentes en el interior de las estructuras del alimento donde pueden provocar zoonosis, enfermedades animales no transmitibles al hombre y enfermedades vegetales no transmitibles al hombre) o exógenos (se incorporan al alimento durante su manipulación y procesado). Pueden ser agentes patógenos o alterantes (saprófitos) <sup>(32)</sup>.

Hay que diferenciar entre infecciones e intoxicaciones y entre infecciones con DMI (dosis mínima infectiva) o DI50 (dosis infectiva que produce la enfermedad en el 50 % de la población) bajas o altas. En muchos casos no está totalmente claro si el proceso es intoxicativo o infeccioso <sup>(32)</sup>.

### **Agentes Bacterianos transmitidos por alimentos.**

Aunque varios alimentos pueden servir como fuentes de enfermedades transmitidas por alimentos, la carne y los productos cárnicos son una fuente importante de infecciones humanas con una variedad de patógenos transmitidos por los alimentos, a lo largo de la década de 1990 y hasta hoy los principales agentes que se han estudiado han sido: *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni / coli*, *E. coli verotoxigénica* y, en cierta medida, *Listeria monocytogenes* y *Yersinia enterocolitica* <sup>(19, 25)</sup>.

#### **6.1.2 *Escherichia coli* diarrogénica. (DEC)**

La especie *E. coli* constituye un grupo típicamente heterogéneo de bacterias gram-negativas, anaerobias facultativas, catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentativa, es un bacilo corto no esporulado <sup>(33)</sup>; son una parte natural de la flora intestinal de los animales y humanos. Genéticamente, la *E. coli* está muy estrechamente relacionada con el género *Shigella*, aunque característicamente fermenta la lactosa, por lo demás es mucho más activa bioquímicamente <sup>(34, 35)</sup>.

*E. coli* es un componente importante de la microflora intestinal de los seres humanos y mamíferos de sangre caliente. Aunque *E. coli* normalmente coloniza el tracto intestinal sin causar daño, varios clones de *E. coli* han desarrollado la capacidad de causar una variedad de enfermedades en el tracto intestinal y en otras áreas del cuerpo <sup>(12)</sup>. Aquellas cepas que causan infecciones entéricas generalmente se llaman cepas diarrogénicas de *E. coli* y su patogénesis se

asocia con un número de atributos de virulencia, que varían de acuerdo al patotipo (12).

Hay seis patotipos de DEC: *E. coli enterotoxigénica* (ECET), *E. coli enteroagregativa* (ECEA), *E. coli enteropatógenas* (ECEP), *E. coli enterohemorrágica* (ECEH) o verocitotoxina productoras de *E. coli enteropatógenas*, y *E. coli de adherencia difusa* (ECEI) (12, 19, 31, 36, 37).

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno "O" es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (33).

Existen Más de 70 serotipos diferentes de *E. coli* (ECST) productor de toxina Shiga que causan enfermedades en los seres humanos (38). Las enfermedades van desde diarrea leve hasta diarrea con sangre, como; colitis hemorrágica (HC) y Síndrome urémico hemolítico (SUH) (38, 39).

*E. coli* O157: H7 es la cepa de ECST que más a menudo se asocia con las formas más severas de la enfermedad (39).

La familia de toxinas Shiga se componen de un tipo relacionado funcionalmente: I Las toxinas de *Shigella dysenteriae* y proteínas estrechamente relacionadas producidas por la ECEH (40). Más de 200 serotipos producen toxinas Shiga, pero sólo 50 han sido asociados con diarrea con sangre o Síndrome urémico hemolítico (SUH) en los seres humanos (38, 40).

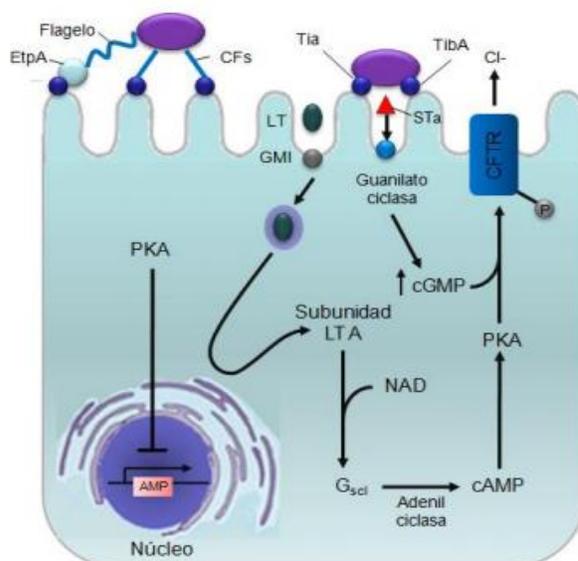
La *E. coli* es un mesófilo de crecimiento típico, según informes la temperatura de crecimiento es de entre 7-10 °C hasta 50 °C pero la temperatura óptima de crecimiento es de alrededor de 37 °C, aunque se han reportado algunas cepas de ECET que crecen a temperaturas tan bajas como 4 °C. Esta bacteria no muestra

marcada resistencia al calor, con un valor D a 60 °C del orden de 0,1 min, y puede sobrevivir si se almacena en refrigeración durante largos períodos. Crece a un pH neutral, pero su crecimiento también es posible a pH 4,4. El mínimo  $a_w$  para el crecimiento de la *E. coli* es 0,95 <sup>(35)</sup>.

ECVT puede contener dos genes diferentes, *stx1* y *stx2*. De ambas toxinas, se han descrito una serie de variantes alélicas, designados respectivamente como *stx1a* - 1d y *stx2 stx2a* -2g <sup>(41)</sup>.

### **E. coli enterotoxigénica (ECET).**

Las ECET colonizan la mucosa del intestino delgado por medio de pilis o fimbrias que tienen diversas formas denominadas CFA (colonization factor antigens), siendo su principal mecanismo de patogenicidad la síntesis de alguna o ambas enterotoxinas llamadas toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Sus genes están codificados en un plásmido que también puede tener información genética para los CFA's, aunque algunos genes de ST se han encontrado en tranposones <sup>(33, 40)</sup>. Las toxina ST y LT aumentan los niveles de GMPc y AMPc provocando la salida de abundante agua y iones, de manera que la diarrea que producen es de tipo secretora, de aparición súbita con vómitos, que lleva rápidamente a la deshidratación (Ver Fig. N<sup>o</sup>1) <sup>(42-44)</sup>.



**Fig.1.** Mecanismo Patogénico de ECET. *Croxen Finlay 2010* <sup>(2)</sup>. ETEC se une a los enterocitos del intestino delgado a través de factores de colonización (CFs) y de una adhesina que se encuentra en la punta de los flagelos (EtpA). La adherencia estricta está mediada por Tia y por TibA. Las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (STa), se secretan y producen diarrea a través de la activación del regulador transmembrana de fibrosis quística (CFTR) por cAMP y cGMP.

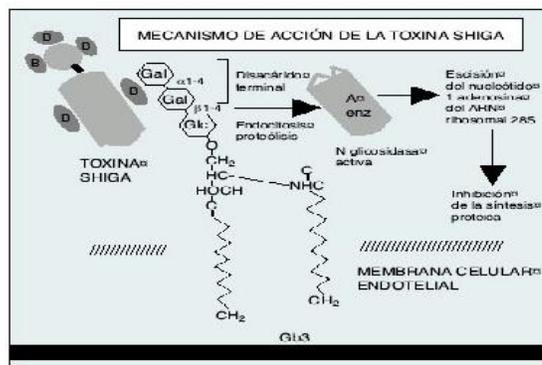
La contaminación fecal de agua y alimentos es la principal fuente de infección, siendo la dosis infectiva de  $10^8$  UFC (unidades formadoras de colonias) <sup>(33)</sup>.

### **E. coli enterohemorrágica (ECEH)**

Riley describió y relacionó a EHEC con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica (CH) y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Karmali en 1983, la asoció con casos aislados de síndrome urémico hemolítico (SUH) caracterizado por daño renal agudo, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática, precedida por diarrea con sangre, con la presencia en heces de *E. coli* productora de una citotoxina con actividad en células Vero, por lo que se le llama verotoxina (VT), y a las cepas capaces de producirla se les denominó *E. coli* verotoxigénicas (ECVT). Además, se observó que la citotoxina se neutralizó con antitoxina obtenida a partir de *Shigella dysenteriae* tipo 1, por lo que también se le llamó “shiga-like toxin” o toxina semejante a shiga (SLT) o “shiga toxin” (STX), y a las *E. coli* capaces de producirla se les da el nombre de ECST <sup>(33, 42, 43)</sup>.

Aunque stx1 y stx2 poseen un modo de acción similar, son inmunológicamente distintos y sólo son 56 % idénticos en el nivel de secuencia extremo del amino ácido <sup>(33, 45)</sup>.

Las toxinas comparten un polipéptido común, una estructura que consiste en una subunidad que enzimáticamente activa la subunidad A (32 kDa) vinculada a cinco subunidades B (7,5 kDa) <sup>(46)</sup>. La subunidad B es responsable de la unión a receptores específicos en las membranas de las células eucariotas, lo que permite que las toxinas se dirijan a diferentes tipos de células, la subunidad A, se activa proteolíticamente y A1 que es una enzima catalíticamente activa escinde específicamente el ARN 28S de la subunidad 60S ribosomal, deteniendo la síntesis de proteínas lo que resulta en la muerte celular ( Fig. 2) <sup>(1, 45, 46)</sup>.



**Fig. 2.** Mecanismo de Acción de la toxina Shiga. H.A. Repeto. *Nefrología Clínica* <sup>(1)</sup>

El plásmido de virulencia 60S MDa contiene un número de diferentes genes asociados con la enfermedad: PSA, KATP, EPTD, toxB, y el gen de la hemolisina ECEH (EHX) <sup>(47-50)</sup>. Durante la infección por ECVT, se cree que una o más adhesinas bacterianas inician la colonización y establecen unión íntima y son responsables de la translocación de una variedad de efectores que alteran la estructura y función de las células huésped <sup>(46)</sup>.

ECVT se encuentra contaminando frutas y vegetales como lechuga, rábanos, alfalfa; además en productos industrializados como mayonesa y jugos de naranja y manzana no pasteurizados, aun cuando estos alimentos tengan un pH de 3.4, condición en la que puede sobrevivir varios días. La transmisión de *E. coli* O157:H7 puede ser por ingerir carne cruda o mal cocida, leche bronca, agua

contaminada; también puede ser de persona a persona o debida a los manipuladores de alimentos. Hay estudios que sugieren la importancia de la mosca doméstica como vector en la transmisión de *E. coli* O157:H7, y b) cepas no-O157:H7 cuya frecuencia de aislamiento es cuatro veces mayor que las O157:H7 <sup>(33, 43)</sup>.

### **E. coli enteroinvasiva (ECEI).**

El grupo ECEI y *Shigella spp* están relacionados genética y bioquímicamente ya que son descarboxilasa negativas, no móviles y lactosa negativas. El mecanismo de patogenicidad de ECEI es la invasión del epitelio del colon; para ello el primer paso es la adherencia de la bacteria a las vellosidades de la mucosa requiriendo de mucinasa y adhesinas, para después entrar por endocitosis a la célula, y posterior multiplicación de la ECEI dentro de la célula y diseminación a células sanas adyacentes <sup>(33)</sup>. La información genética para este mecanismo está en loci del cromosoma y del plásmido, además de tener la capacidad de elaborar una o más enterotoxinas que pudieran ser importantes en la producción de diarrea. Los genes necesarios para la invasión se encuentran en un plásmido de 140 MDa llamado plnv, que codifica para proteínas, como por ejemplo las Ipa y otras que están involucradas en el proceso de patogénesis <sup>(33, 42)</sup>.

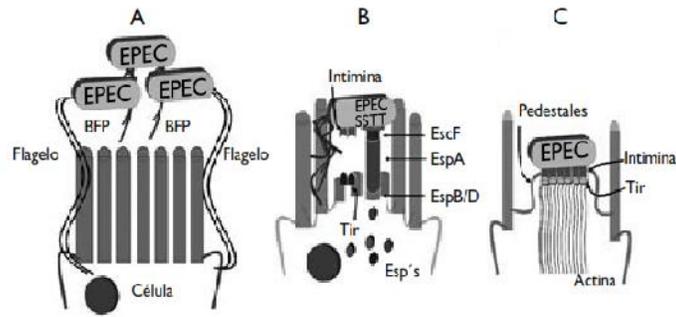
ECEI penetra, se multiplica y se disemina en las células del colon causando destrucción celular produciendo una diarrea secretora o disentería. Sin embargo a diferencia de *Shigella* se necesita un inóculo muy grande para causar enfermedad. Su capacidad invasiva se encuentra modificada en un plásmido de 220 Kb en el que se ha detectado un región denominada *ial*, (locus asociado a invasividad) <sup>(42)</sup>.

Las cepas ECEI se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses <sup>(33)</sup>.

### **E.coli enteropatógena (ECEP).**

ECEP fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad<sup>(33)</sup>. ECEP induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (adherencia y eliminación)<sup>(51)</sup>. Este es un proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C<sup>(33)</sup>.

La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman Bfp (bundle-forming pilus), los Bfp son pelos o fimbrias de 7 nm de diámetro y 14 a 20 µm de largo, cuya biogénesis requiere 14 genes<sup>(51)</sup>, y cuya información genética está codificada en un plásmido de 50-70 MDa denominado EAF (ECEP adherence factor) y de algunos genes cromosomales<sup>(33)</sup>. En este plásmido también están codificados los genes del operón *per* (regulador codificado en el plásmido) que regula la síntesis del Bfp y las proteínas que secreta ECEP<sup>(51, 52)</sup>. En la adherencia es necesaria la síntesis de una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada intimina, codificada por el gen cromosomal *eae* y que sirve como señal en A/E<sup>(33, 42)</sup>. La expresión del Bfp se induce in vitro en la fase de crecimiento logarítmico y lo regulan factores fisicoquímicos como la temperatura, el calcio y los iones amonio. Resulta interesante que todos éstos son factores que ECEP encuentra en el intestino delgado del huésped<sup>(51)</sup>. Los Bfp permiten que las bacterias se agrupen entre ellas y formen microcolonias (un fenotipo conocido como autoagregación) (Fig. 3)<sup>(51)</sup>.



**Fig. 3.** A) Los PFP permiten que las bacterias interactúen entre ellas para formar una microcolonia y el flagelo establece el contacto inicial de la microcolonia con la célula epitelial. B) Una vez adherida a la célula, EPEC inyecta factores de virulencia (Esp) mediante el SSTT-translocón, entre ellos Tir, que se inserta en la membrana de la célula y expone una región en el espacio extracelular. C) La intimina (una proteína de membrana externa) se une con firmeza a Tir y se induce el reacomodo del citoesqueleto, lo cual favorece la formación de los pedestales de actina y la desaparición de las microvellosidades absortivas; ello da lugar a la lesión A/E <sup>(51)</sup>.

ECEP puede ocasionar brotes o casos aislados de diarrea. Este grupo afecta principalmente a niños menores de seis meses y a los de dos años. También puede aislarse en adultos enfermos y sanos, principalmente cuando hay un factor predisponente como diabetes <sup>(33)</sup>.

La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos. Los reservorios de ECEP pueden ser niños y adultos con o sin síntomas. El cuadro clínico que produce ECEP se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción <sup>(33)</sup>.

### **E. coli enteroagregativa (ECEA).**

Scaletsky y Nataro encontraron cepas aisladas de pacientes con diarrea, las cuales por serología no correspondían al grupo ECEP pero si presentaban un patrón característico de adherencia diferente a ECEP y que además eran negativas a la prueba de EAF. En estudios posteriores se encontró el fenotipo de adherencia agregativa, caracterizado por autoaglutinación de las bacterias entre sí y por ser inespecífica, porque las bacterias se adhieren a la superficie de las células Hep-2 y a la superficie del cubreobjetos libre de células Hep-2 <sup>(33)</sup>.

En el mecanismo de patogenicidad de ECEA están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; que son citotoxinas y enterotoxinas que producen inflamación en la mucosa intestinal, también se sabe que las cepas ECEA tienen la capacidad de incrementar en la mucosa intestinal la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal <sup>(33, 42)</sup>. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de ECEA para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea. En el plásmido de 60 MDa de ECEA también se encuentran los genes que codifican para la toxina EASTI <sup>(33)</sup>.

El sitio blanco de daño de ECEA puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días. Esta bacteria puede causar brotes o casos aislados de diarrea persistente. En niños puede manifestarse con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa <sup>(33)</sup>.

### **E. coli de adherencia difusa (ECAD).**

Las cepas de *E. coli* de adherencia difusa, no forman microcolonias cuando se adhieren a células Hep-2. Se sabe poco de su mecanismo de patogenicidad pero se ha caracterizado una fimbria de superficie, conocida como F1845, involucrada en el fenómeno de adherencia difusa <sup>(33)</sup>.

Los genes que codifican para esta fimbria se pueden encontrar en el cromosoma o en un plásmido. El fenómeno de adherencia difusa también se ha asociado con una proteína de membrana externa de 100 kDa, en una cepa del serotipo O126:H27, cuyos genes se han secuenciado pero sólo se han encontrado en una minoría de las cepas aisladas. Al realizar ensayos in vitro en células CaCo y Hep-2, las cepas ECAD tienen la capacidad de inducir la formación de estructuras protuberantes, semejantes a dedos, las cuales confieren protección a las bacterias, pero la presencia de dichas estructuras no se ha demostrado in vivo <sup>(33)</sup>.

El grupo ECAD se puede aislar tanto de personas sanas como en personas con diarrea, siendo más importante en niños de 4 a 5 años. Los principales síntomas que se presentan son diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos <sup>(33)</sup>.

### **Historia, Reservorio, Epidemiología de las *Escherichia coli* diarrogénicas.**

Los brotes causados por alimentos se han asociado particularmente con ECVT, y en menor medida ECEP, ECET y cepas de *E. coli* *Enteroagregativa* (ECEagg). Entre las cepas de ECVT, *E. coli* O157:H7 (es decir ECVT O157) ha sido ampliamente reconocida como una causa muy importante de las ETA en las últimas dos décadas <sup>(19)</sup>. De igual manera es cada vez más claro que los tipos de ECVT O157, son también causa de enfermedad infecciosa intestinal humana transmitida por los alimentos en todo el mundo, especialmente los grupos O: O26, O103, O111 y O145 de ECVT <sup>(19)</sup>. La *E. coli* es algo común en cultivos de heces, en general no es patógena, y la supervivencia en agua; así como sus características han conducido a la adopción de *E. coli* como un indicador de la

contaminación fecal y la posible presencia de patógenos entéricos , como *Salmonella entérica typhi* en agua lo que aumenta el riesgo de transferencia de estos patógenos a los alimentos <sup>(35)</sup>.

Los primeros brotes se produjeron por el consumo carne de vacuna contaminada, a menudo molida <sup>(19)</sup>. La ECEP también se considera un potencial patógeno transmitido por los alimentos, pero la vigilancia de este tipo DEC es generalmente pobre. Aunque la verdadera asociación con vehículos alimentarios está clara, las infecciones esporádicas con este tipo se siguen denunciando con alimentos como pollo y carne como fuentes comunes. Tanto ECET y ECEAgg también pueden estar asociadas a brotes de origen alimentario aunque con poca frecuencia. Hoy en día casi cualquier vehículo en contacto con las heces de los rumiantes es potencialmente una fuente de contaminación, estas incluyen: verduras, frutas, productos cárnicos (como salchichas), jugos y leche (tanto pasteurizada y no pasteurizada) así como agua potable contaminada con materia fecal y piscinas recreativas. Posteriores investigaciones implicaron la presencia de jabalíes en los campos como la fuente de infección. La razón para este cambio de perfil no está clara, pero puede indicar una población bacteriana en evolución aprovechando nuevos nichos <sup>(19)</sup>. Curiosamente se reportan diferencias geográficas en la prevalencia y distribución de todos los serotipos de ECVT, estas observaciones sugieren cierta especificidad de hospedador específica del país, posiblemente como resultado de los factores de cría o la exposición restringida <sup>(19)</sup>.

Una característica inquietante de *E. coli* es su capacidad de evolucionar continuamente, de manera que se reportan tipos nunca antes caracterizados. Un ejemplo reciente fue una ECVT O103: H25 aislada durante un brote en Noruega. En el análisis genético (virulotyping) esta cepa poseía los genes de virulencia, que sólo se habían aislado una vez antes en un caso esporádico en Noruega tres años previos al estallido. Recientes análisis genómicos comparativos de las cepas de ECVT O157 en particular, demuestran claramente la columna vertebral ancestral de este grupo de microorganismos, la combinación de la ganancia y la pérdida de los elementos genéticos y la movilidad de los mismos factores de virulencia se ha

traducido en una evolución paso a paso de los linajes realizado por Wick y cols. en el 2005 y Wu y cols. en el 2008, que se han ido distanciando en términos de patogenicidad y la asociación con la célula anfitriona <sup>(19)</sup>. La generación de nuevas combinaciones de factores de virulencia está dando lugar a la aparición continua de nuevos virulotypes, que son capaces de ocupar nichos no reconocidos previamente <sup>(19)</sup>. La PCR puede utilizarse para amplificar los genes específicos a grupos taxonómicos de bacterias y también para detectar los genes implicados en la virulencia de las bacterias transmitidas por los alimentos por su capacidad de detectar concentraciones extremadamente bajas de la bacteria en el alimento <sup>(27)</sup>.

### **6.1.3 Resistencia antibiótica en bacterias Gram negativas**

La dificultad de la detección de las beta-lactamasas en la práctica de rutina debe ser considerado como un problema importante. La difusión geográfica de -lactamasas y aparición de resistencias simultáneas múltiples hacen necesario la determinación de varios de los genes y sus mutaciones, es decir, el análisis multiparamétrico. El análisis molecular biológico de los genes son útiles para la solución de este tipo de problema <sup>(54)</sup>.

De entre todos los problemas actuales de multiresistencia probablemente el de mayor interés es el causado por la producción de -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las BLEE son enzimas codificadas por genes plasmídicos que hidrolizan todos los -lactámicos a excepción de cefamicinas y carbapenems. Se inhiben por inhibidores de -lactamasas de serina <sup>(61)</sup>. La producción de diversas CTX-M en cepas que carecen de porinas también se ha documentado recientemente como causa de resistencia a carbapenems, en especial a ertapenem <sup>(55, 62, 63)</sup>

La detección de las BLEE en el laboratorio clínico es un problema no completamente resuelto. El Clinical and Laboratory Standards (CLSI) ha estandarizado métodos de difusión y de dilución para su detección en *E. coli*, basados en el aumento de la actividad de cefotaxima/ceftazidima en presencia de ácido clavulánico <sup>(55)</sup>.

Las cepas con BLEE tienen distribución mundial. Durante un tiempo el problema estuvo centrado, sobre todo, en hospitales, la especie en la que más frecuentemente se encontraba era en *E. coli*, y los principales tipos enzimáticos pertenecían a las familias TEM y SHV <sup>(55)</sup>. Esta situación ha cambiado de forma drástica en la última década, en la que se han comenzado a aislar de forma cada vez más frecuente cepas productoras de BLEE en el medio extrahospitalario, habiéndose observado un crecimiento enorme de las  $\beta$ -lactamasas de la familia CTX-M, y describiéndose, además, en otras especies (*Proteus mirabilis*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella enterica*, etc.) <sup>(64)</sup>.

El predominio de enzimas CTX-M, tanto en *E. coli* como en *K. pneumoniae*, y el incremento de infecciones fuera del entorno hospitalario se está observando en todo el mundo. Es interesante resaltar también la expansión de clones concretos de ambas especies (p. ej., ST-131 de *E. coli*) que producen CTX-M-15, circunstancia descrita en múltiples países <sup>(55)</sup>.

Las cepas productoras de BLEE son con frecuencia resistentes a otros grupos de antimicrobianos, incluyendo aminoglucósidos y fluoroquinolonas. La resistencia a aminoglucósidos está relacionada, sobre todo, con la producción de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA). La secuenciación de integrones completos que contienen genes que codifican BLEE (en particular CTX-M), el EMA ha permitido comprobar, en estudios realizados en Francia y en Chile, que los genes más frecuentemente identificados han sido aac(6')-Ib y aac(3)-IIa <sup>(65)</sup>. La resistencia a quinolonas en cepas que producen BLEE se explica, en parte, por mutaciones en *gyrA* solas o asociadas a mutaciones en *parC* <sup>(65)</sup>.

Los principales factores de riesgo para desarrollar infecciones por cepas BLEE(+) incluyen gravedad de la enfermedad de base, uso de sondas urinarias, catéteres arteriales y tubos nasogástricos, nutrición parenteral, hemodiálisis y uso previo de antimicrobianos, en particular de cefalosporinas de amplio espectro y de quinolonas, aunque algunos estudios también indican aminoglucósidos y cotrimoxazol <sup>(55)</sup>. Las infecciones comunitarias por *E. coli* productoras de BLEE

tipo CTX-M se observan con más frecuencia en pacientes ancianos, con diabetes mellitus, sondados y tratados previamente con quinolonas <sup>(66)</sup>.

En algunos casos el origen de las *E. coli* que causan infección en el humano es desconocida y el significado de los reservorios animales de *E. coli* antibiótico resistentes ha sido poco explorado, sin embargo, las opciones de tratamiento en los seres humanos están en peligro si las bacterias causantes son ya resistente a los agentes antimicrobianos comúnmente utilizados <sup>(67)</sup>. Debido a un uso intensivo de los agentes antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal, bacterias procedentes de animales destinados al consumo con frecuencia llevan a la resistencia a una gama de agentes antimicrobianos , incluyendo los usados comúnmente en los seres humanos <sup>(67)</sup>. Varias cefalosporinas son ampliamente utilizadas como terapia en clínica veterinaria. Estos incluyen las cefalosporinas de primera generación (cefadroxilo, cefapirina, cefalexina), y cefalosporinas de tercera generación (cefovecina , cefpodoxima y ceftiofur ), y una cefalosporina de cuarta generación (cefquinoma) <sup>(67)</sup>. Las fluoroquinolonas son agentes antimicrobianos de amplio espectro que son muy eficaces para el tratamiento de una variedad de infecciones en los seres humanos y animales, así como los aminoglucósidos como la gentamicina y la amikacina. Las restricciones legales destinadas a reducir el uso de fluoroquinolonas en animales productores de alimentos han sido introducidas en los Estados Unidos y Dinamarca. En el 2005, la Administración de Drogas y Alimentos de los E,E,U,U, (FDA) por sus siglas en inglés, retiró las fluoroquinolonas sarafloxacina y enrofloxacina , que se utilizan para tratar Infecciones por *E. coli* en aves de corral <sup>(67)</sup> , lo que redujo de un 10% a un 4.3 % la resistencia a flouroquinolonas en consumidores de pollo en Dinamarca <sup>(67)</sup>. El uso no humano generalizado de estos críticos o muy importantes agentes antimicrobianos crea un reservorio de bacterias resistentes que pueden añadir a la carga de la resistencia a los antimicrobianos en los seres humanos. El uso no humano también acorta el tiempo que estos valiosos agentes antimicrobianos estarán disponibles para el tratamiento eficaz de infecciones potencialmente mortales en los seres humanos.

### **Recuento de Aeróbicos Mesofílicos (RAM).**

En el recuento de aeróbicos mesofílicos se estima el número total de microorganismos pero no así el microorganismo implicado, en este se determina el número de bacterias por mililitro o gramo de alimento analizado por medio de diluciones decimales mediante el empleo de técnicas en placas de agar; este tipo de procedimiento, se utiliza para monitorear la implementación de buenas prácticas de manufactura; tiene un valor limitado como indicador de la presencia de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa inevitablemente, presencia de flora patógena. El recuento refleja: contenido microbiano de materiales crudos e ingredientes, la eficiencia del procedimiento de elaboración / proceso, la condición de higiene del equipo y utensilios; y la relación tiempo- temperatura de almacenamiento y distribución. En general el recuento de la flora aerobia mesófila es una prueba para conocer las condiciones de salubridad de algunos alimentos. Alimentos perecederos manipulados correctamente pueden desarrollar RAM elevados y perder calidad si son almacenados por un período de tiempo prolongado. En este caso, el RAM no se encontraría elevado por la condición de higiene del producto, sino por la vida útil del mismo. Por ello es que la utilidad del indicador depende de la historia del producto y el momento de la toma de muestra (valor de referencia: Bacterias aerobias mesófilas:  $< 1 \times 10^6$  UFC/g). Tasas superiores de RAM por encima de  $10^6$ - $10^7$  bacterias por gramo de alimento indican descomposición del mismo <sup>(68-71)</sup>.

## **7. MATERIAL Y MÉTODO.**

### **7.1 Tipo de estudio.**

Descriptivo de Corte transversal.

### **7.2 Área de estudio.**

Área de estudio comprendida por los expendios de carne de res ubicadas en los Mercados MRC (ubicado en la zona central de la ciudad), II. MSB (ubicado en la zona noreste de la ciudad).

El método de muestreo que se utilizó en nuestro estudio fue por conveniencia y la muestra se tomó de la siguiente manera:

Se seleccionaron los 18 expendios donde se comercializa carne molida de res (nueve tramos muestreados en el MRC y nueve tramos muestreados en el MSB).

En los 18 expendios se compraron 200 gramos (g) de carne molida de res 1 vez al mes durante el periodo de octubre - noviembre 2013 (se colectaron 36 muestras), durante el año 2014 se muestreo únicamente los meses de julio (se muestreo dos veces durante este mes, 36 muestras colectadas) y septiembre (se muestreo una vez, 14 muestras colectadas dado que los dueños de 4 establecimientos se negaron a vender el producto). El total de muestras de carne fue de 86.

### **7.4 Recolección, almacenamiento y transporte de las muestras.**

Las muestras de carne molida de res (200 g) se depositaron en una bolsa Ziploc Biohazard, debidamente etiquetada con un código de identificación definido en el laboratorio, el código del mercado y del tramo en el que se tomó la muestra. Las muestras se transportaron y almacenaron bajo condiciones que evitaron los cambios en el número de microorganismos presentes en la muestra (se colocaron en un termo con refrigerantes a una temperatura de 4<sup>0</sup> C y se transportaron al departamento de Microbiología y Parasitología de La UNAN- León en un lapso no mayor a 4 horas) <sup>(35)</sup>.

### **7.5 Criterios de inclusión.**

- Ubicación del expendio de carne en los mercados antes mencionados.
- El expendio a muestrear seleccionado debía vender carne molida de res.

## 7.6 Procesamiento de la muestra.

### Conteo bacteriológico en placa <sup>(72, 73)</sup>

1. Se pesaron 20 g de la muestra de carne en una balanza analítica bajo condiciones asépticas.
2. Se homogenizaron los 20 g de carne en 180.0 ml de la solución diluyente (solución peptonada al 0.1% en solución salina a una concentración de 0.85%).
3. Se realizó diluciones decimales ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$ ) en tubos con 10 ml del diluyente (agua peptonada al 0.1 %) (Anexo 1. Figura 9).
4. Se tomaron 100  $\mu$ l de las diluciones decimales y se colocaron en platos Petri conteniendo cada plato: MacConckey, MacConckey sorbitol, agar *Salmonella- Shigella* (SS), para cada dilución.
5. Se realizó un rayado completo en tres direcciones de cada plato inoculado con las diluciones y se incubaron las placas en posición invertida a 37°C por 24 a 48 horas.
6. Se realizó el conteo de las colonias (rango normal entre 25 – 250 UFC/g) con un contador de colonias (DARKFIELD QUEBEC COLONY COUNTER. American Optical). (Anexo 2 para cálculos de UFC/ g) y aquellas placas en las que el conteo fue mayor al rango de lo permisible, se procedió a realizar la identificación fenotípica, perfil de resistencia y determinación de genes de resistencia en las bacterias multirresistentes.
7. Ver lista de materiales (Anexo 3).

### 7.6.1 Identificación Fenotípica.

A las colonias con un conteo mayor de 25-250 UFC/g se les realizó identificación fenotípica a través de las pruebas bioquímicas tradicionales <sup>(53)</sup> : CITRATO, TSI, LIA, UREA, MIO.

### 7.6.2 Serotipificación de antígenos O de *E. coli*

Las colonias sospechosas de *E. coli* O157 en agar MacConkey sorbitol fueron analizadas utilizando un sistema de Serotipificación con sueros polivalentes para: O157, O145, O26, O121, O128; y con suero monovalente para: O111, O103, O55, ambos de la casa comercial Statens Serum Institut SSI® Diagnostica. Herredsvejen2.

Denmark([www.ssi.dk/.../SSI%20Diagnostica/.../Indlægseddell%20E%20coli%20an...](http://www.ssi.dk/.../SSI%20Diagnostica/.../Indlægseddell%20E%20coli%20an...))

El Procedimiento se realizó a como sigue:

1. En un portaobjeto limpio se colocó 1 gota de solución salina normal y utilizando un palillo estéril se tomaron 3 colonias puras del plato con colonias sospechosas de *E. coli* O157 (MacConkey sorbitol), se mezcló, se homogenizó 6 veces y se buscó aglutinación (control negativo).
2. En un portaobjeto limpio se colocó 1 gota del suero polivalente (O157, O145, O26, O121, O128) y utilizando un palillo estéril se tomaron 3 colonias puras del plato con colonias sospechosas de *E. coli* O157 (MacConkey sorbitol), se mezcló se homogenizó 6 veces y se buscó aglutinación.
3. En un portaobjeto limpio se colocó 1 gota del suero monovalente un procedimiento a la vez para: O111, O103 y O55 y utilizando un palillo estéril se tomaron 3 colonias puras del plato con colonias sospechosas de *E. coli* O157 (MacConkey sorbitol), se mezcló se homogenizó 6 veces y se buscó aglutinación.

### 7.6.3 PCR multiplex para la detección de *E. coli* diarrogénicas.

Todas las muestras positivas para *E. coli* resultantes de las pruebas bioquímicas fueron analizadas a través de un PCR multiplex utilizando los primers específicos (Tabla 2) y se siguió el procedimiento descrito por Nguyen y col., (2005) <sup>(74)</sup>.

Se tomó 2 µl controles positivos, control negativo y muestras.

Como controles positivos se utilizaron <sup>(36)</sup>:

- ETEC ATCC 35401
- EHEC ATCC 43889
- EHEC ATCC 933
- PCVD 042

Como control negativo se utilizaron <sup>(36)</sup>:

- *E. coli* ATCC 11775

Se analizaron a través de un PCR los siguientes marcadores de virulencia <sup>(36)</sup>:

- *eaeA* ( gen estructural para la intimina de ECEH y ECEP ) ,
- *bfpA* ( gen estructural para el pilus de formación de haz de EPEC )
- *vt1* y / o *vt2* ( verocitotoxina 1 y 2 de EHEC)
- *eltB* y / o *estA* ( enterotoxinas LT y ST de ECET )
- *ial* ( asociada al locus de invasión del plásmido de invasión encontrado en ECEI y *Shigella* )
- PCVD (secuencia del nucleótido de *EcoRI* - *PstI* del fragmento de ADN de de pCVD432 de ECEA).

Los primers que se utilizaron en la amplificación corresponden a la secuencia de los genes de la ECEA, ECEH, ECEI, ECEP y ECET en el GenBank <sup>(36)</sup>.

El método de PCR se realizó utilizando una mezcla de reacción de 25 µl mezclados con perlas puReTaq Ready - To-Go PCR <sup>(75)</sup>. Cada mezcla de reacción consistió en 2 µl del lisado bacteriano <sup>(36)</sup>, 10 mM de Tris / HCl ( pH 9,0 ) ,

50 mM KCl , 1,5 mM de MgCl, 200 mM de cada dNTP , 2,5 U de ADN puReTaq polimerasa y 0,2 mM de cada primer (Interactiva de Biotechnologie GmbH ) , a excepción del primer VT1 , que se utilizó a una concentración de 0.4 mM (determinada como la concentración óptima después de la standarización del PCR) se utilizó una escalera molecular de ADN de 100 pb (Invitrogen Life Technologies) <sup>(36)</sup>. El PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador Mastercycler personal (ependorf A - 6), siguiendo el siguiente programa de amplificación: 96<sup>0</sup>C de 4 min, 35 ciclos de 94<sup>0</sup>C de 30 seg, 58<sup>0</sup>C durante 30 s y 72<sup>0</sup>C durante 1 min, y un paso de elongación final de 7 min a 72<sup>0</sup>C. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1,5 % (w / v), que se corrió a 120 mV por 30 min. Y se tiño con bromuro de etídio y se fotografió (UltraPure agarosa; Invitrogen Life Technologies).

**Tabla 1. Secuencia de los primers utilizados en el PCR Multiplex <sup>(36)</sup>.**

Tipo de E. coli diarrogénica	Gen diana	Primer	Secuencia	Tamaño del fragmento	Nº de acceso al GenBank
ECET	<i>eltB</i>	LT	f:TCTCTATGTGCATACGGAGC r:CCATACTGATTGCCGCAAT	322	S60731
ECEH	<i>estA</i>	ST	f:GTCAAACCAGTA(G/A)GGTCT TCAAAA r:CCCGGTACA(G/A)GGAGGATT ACAACA	147	M34916
	<i>vt1</i>	VT1	f:GAAGAGTCCGTGGGATTAC r:AGCGATGCAGCTATTAATAA	130	AF4611 72
ECEP	<i>vt2</i>	VT2	f:ACCGTTTTTCAGATTTT(G/A)C ACATA r:TACACAGGAGCAGTTTCAGAC AGT	298	AY1433 37
	<i>eaeA</i>	<i>eae</i>	f:CACACGAATAAACTGACTAAA ATG r:AAAAACGCTGACCCGCACCT AAAT	376	AE0055 95
ECEI	<i>bfpA</i>	<i>bfpA</i>	f:TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTT TT r:TTTTGTTTGTGTATCTTTGTA A	367	U27184
	<i>lal</i>	SHIG	f:CTGGTAGGTATGGTGAGG r:CCAGGCCAACAATTATTTC	320	AY1670 49
ECEA	pCVD 432	EA	f:CTGGCGAAAGACTGTATCAT r:AAATGTATAGAAATCCGCTGT T	630	X81423

#### 7.6.4 Sensibilidad antimicrobiana y detección fenotípica de BLEE por el Método de Kirby Bauer.

Del medio de cultivo selectivo (SS, Mck, Mck sorbitol) se tomaron de 4 a 5 colonias y se realizó una suspensión en solución salina al 0.95% ajustando a una escala Macfarland 0.5, con esta suspensión se inocularon placas de agar Mueller Hilton en el que se probaron los antibióticos recomendados por el CLSI para la detección fenotípica de bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas. Los antibióticos utilizados y su respectiva concentración fueron <sup>(53, 76-78)</sup>:

**Concentración de los discos a utilizar para *Enterobacteriáceas* <sup>(53)</sup>:**

**Tabla 2. Antibióticos testados.**

Sensidiscos	Concentración
Gentamicina	10 $\mu$ g
Ciprofloxacina (Oxoid,Hampshire, Inglaterra)	30 $\mu$ g
Trimetoprim/Sulfametoxazol (Oxoid,Hampshire, Inglaterra)	30 $\mu$ g
Aztreonam (Oxoid,Hampshire, Inglaterra)	30 $\mu$ g
Kanamicina (Oxoid,Hampshire, Inglaterra)	5 $\mu$ g

##### 7.6.4.1 Confirmación fenotípica de BLEE:

Para la confirmación de cepas productoras de  $\beta$ -lactamasas se utilizó la prueba de sinergia de triple disco con una variación para la detección simultánea de AmpC y carbapenemasas. Los antibióticos que se utilizaron son <sup>(53, 77, 78)</sup>:

- Imipenem 10  $\mu$ g (IMP; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- Amoxicilina con ácido clavulánico 10  $\mu$ g (AMC; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- Ceftazidima 30  $\mu$ g (CAZ; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)

- Cefepime 30 µg (CRO; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)
- Cefoxitina 30 µg (FOX; Oxoid, Hampshire, Inglaterra)

### 7.6.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detección de genes de resistencia de *Enterobacteriáceas*: *blaSHV*, *blaTEM* y *blaCTX-M*

**Extracción de ADN:** se tomaron con un palillo estéril 5 colonias por cada muestra que se suspendieron en 500 µl de Buffer fosfato salino (PBS). Esa suspensión bacteriana se hirvió por 20 min y se centrifugó a 14000 RPM por 3 minutos para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante es el producto que se utilizó para amplificar a través de PCR <sup>(36)</sup>.

**Multiplex PCR:** La detección de los genes que codifican para β-lactamasasa a través de PCR se realizó utilizando primers con secuencias conocidas que ya han sido utilizados y cuyo procedimiento se describe en el protocolo de Fang y col <sup>(79)</sup>. Como control positivo para la detección de los genes de resistencia se utilizó una cepa previamente analizada y publicada en estudios de resistencia en *E. coli* <sup>(80)</sup>. La lista de los primers que se utilizaron es la siguiente (Tabla 3):

**Tabla 3. Secuencias de los primers utilizados en el PCR Multiplex.**

Primers	Secuencia de nucleótidos	Producto de PCR
<b><i>blaSHV</i></b>	f: CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA r: AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG	273 pb
<b><i>blaTEM</i></b>	f: CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA r: ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT	445 pb
<b><i>blaCTX-M</i></b>	f: ATG TGC AGY ACC AGT AAR GTK ATG GC r: TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG	593 pb

Para la amplificación del ADN bacteriano se preparó una mezcla de reacción de 25  $\mu\text{l}$  con puReTaqReady-To-Go PCR Beads (GE Healthcare UK). Cada mezcla de reacción consistía en 2  $\mu\text{l}$  de lisado bacteriano, 20  $\mu\text{l}$  de agua milliQ y 0.5  $\mu\text{l}$  de cada cebador a 10  $\mu\text{M}$  para una concentración final de 0.2  $\mu\text{M}$  <sup>(75)</sup> (Tabla 4).

**Tabla 4. Mezcla para PCR para la detección de genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, y *bla*<sub>CTX-M</sub>.**

Material	$\mu\text{L}$ por reacción	Concentración final
<i>bla</i> CTX-Mf 10 $\mu\text{M}$	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
<i>bla</i> CTX-Mr 10 $\mu\text{M}$	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
<i>bla</i> TEMf 10 $\mu\text{M}$	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
<i>bla</i> TEMr 10 $\mu\text{M}$	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
<i>bla</i> SHVf 10 $\mu\text{M}$	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
<i>bla</i> SHVr 10 $\mu\text{M}$	0.5	0.2 $\mu\text{M}$
Agua MilliQ	20	
ADN bacteriano	2	

El programa de amplificación siguió el siguiente orden: desnaturalización inicial del ADN a 95 ° C por 15 min, seguido de un segundo tiempo de desnaturalización de 30 seg a 94 ° C, hibridación 90 seg a 62 ° C, elongación 60 seg a 72 ° C, luego se realizaron 30 ciclos desde el paso dos al cuatro, con un quinto paso de elongación de 10 min a 72 ° C.

Se realizó además un single PCR para la detección de los grupos *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-2 y *bla*CTX-M-9 <sup>(80, 81)</sup>. Los primers utilizados fueron los siguientes:

**Tabla 5. Primers utilizados para la identificación de genes *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2* y *blaCTX-M-9*.**

<b>Gen y grupo</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tamaño</b>
blaCTX-M (Grupo 1)	f: GAC GAT GTC ACT GGC TGA GC r: AGC CG C CGA CGC TAA TAC A	499 pb
blaCTX-M (Grupo 2)	f: GCG ACC TGG TTA ACT ACA ATC C r: CGG TAG TAT TGC CCT TAA GCC	351 pb
blaCTX-M (Grupo 9)	f: GCT GGA GAA AAG CAG CGG AG r: GTA AGC TGA CGC AAC GTC TG	474 pb

El programa de amplificación siguió el siguiente orden: desnaturalización inicial del ADN a 94 ° c por 10 min, 30 ciclos de 94<sup>0</sup> c por 40 seg, 72<sup>0</sup> c por 60 seg y una elongación final de 7 min a 72<sup>0</sup> c. La mezcla para la amplificación del AND molde se hizo utilizando puReTaq Ready-To-Go <sup>(75)</sup> de la siguiente manera:

**Tabla 6. Mezcla de PCR para la detección de genes *blaCTX-M-1*, *blaCTX-M-2* y *blaCTX-M-9*.**

<b>Material</b>	<b>µL por reacción</b>	<b>Concentración final</b>
blaCTX-M (Grupo 1)	2	0.8 µM
blaCTX-M (Grupo 2)	2	0.8µM
blaCTX-M (Grupo 9)	2	0.8 µM
Agua MilliQ	17	
ADN bacteriano	2	

Para la amplificación del ADN se utilizó un Termociclador de la marca Mastercycler personal (ependorf A - 6).

Los productos amplificados fueron observados en un gel de agarosa al 1.3 %, se utilizó un marcador molecular de 100 pb (New England Biolab) que fue teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta y fotografiado.

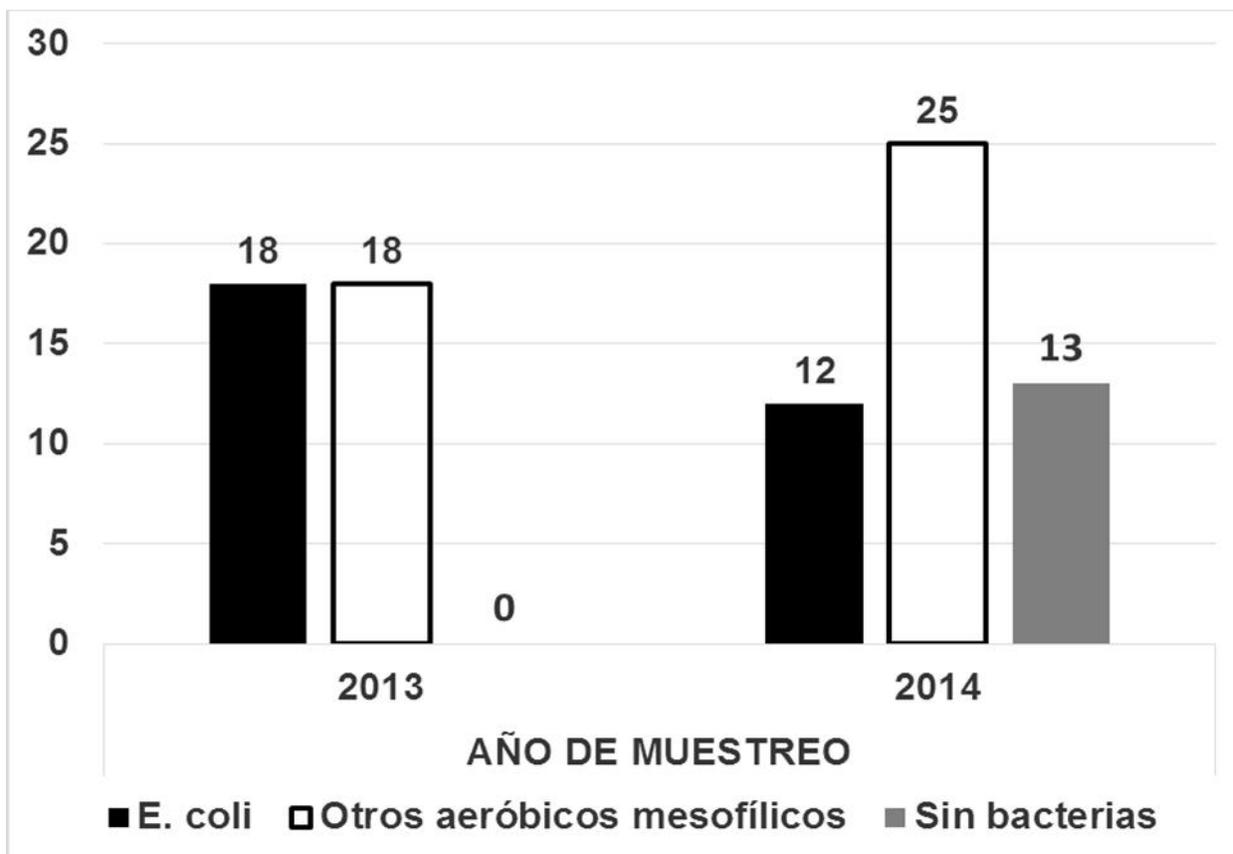
### **7.7 Análisis de los Resultados**

Los resultados obtenidos de las diferentes muestras de estudio fueron procesados en el programa estadístico SPSS (Statistical Program for Science, Inc. Chicago, IL) Versión 15. Se realizó una estadística descriptiva para la presentación de los resultados obtenidos en esta tesis.

## 8. RESULTADOS

### Bacterias aisladas en las muestras de carne molida de res y conteo bacteriológico en placa.

Se analizaron un total de 86 muestras en los dos mercados en estudio durante los meses de Octubre-Noviembre del 2013, Julio y Septiembre del 2014. Se encontró un total de 73 aislamientos positivos (84.9%) correspondientes a aeróbicos mesofílicos (coliformes fecales) y de estos *E. coli* se aisló en 30 muestras (34.9%) y 13 muestras se reportaron sin contaminación por aeróbicos mesofílicos (15.1%) (Fig. 4 y Tabla 6).



**Fig. 4.** Distribución de Bacterias aisladas en los mercados MRC y MSB durante el período de estudio octubre- noviembre del 2013 y julio y septiembre del 2014.

**Tabla 6. Distribución de Bacterias aisladas en las muestras de carne por mercado.**

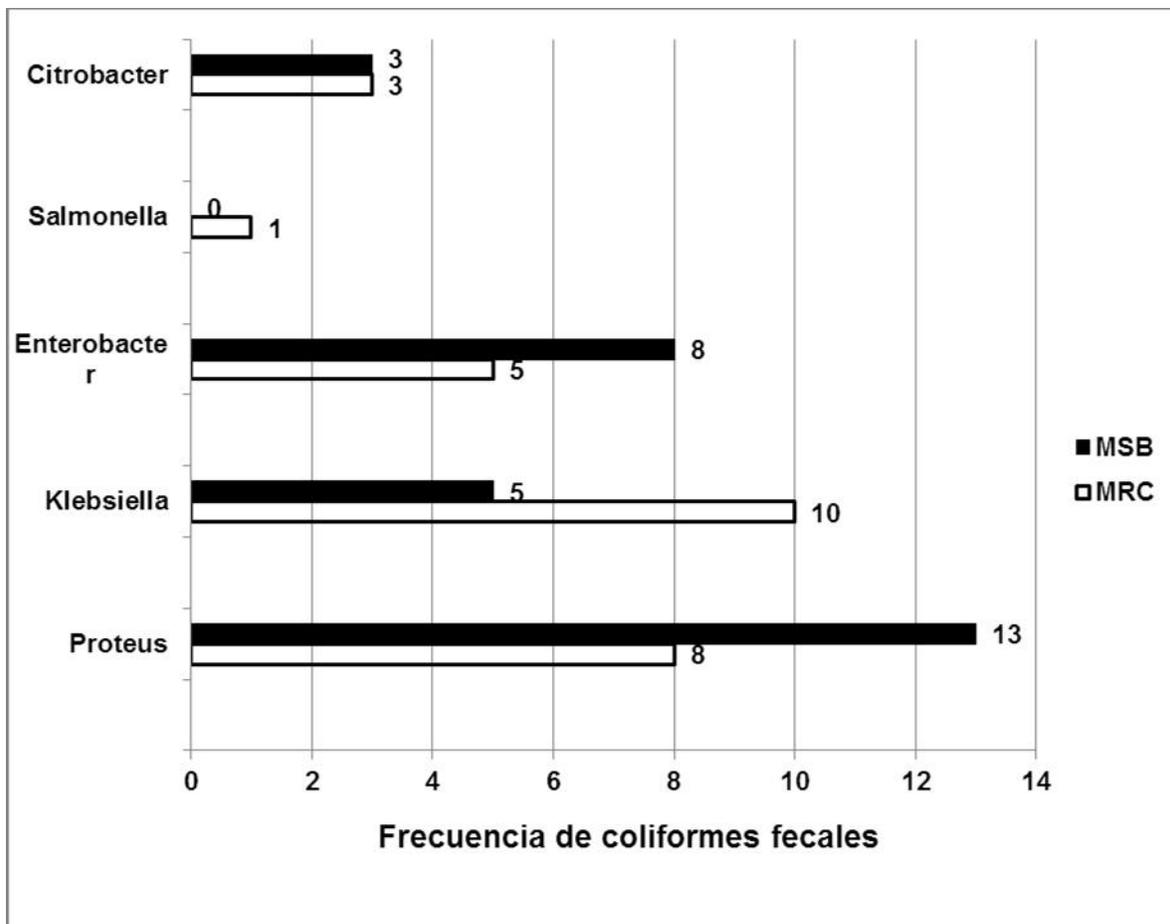
Bacterias aisladas en las muestras de carne.	Centro de compra de la muestra		Total
	MRC	MSB	
<i>E. coli</i>	18	12	30
Aeróbicos mesofílicos (coliformes fecales)	19	24	43
Sin bacterias	8	5	13
	45	41	86

En cuanto al conteo bacteriológico en placa, es importante mencionar que todos los coliformes fecales encontrados en el estudio deben reportarse como contaminación, por tal motivo no están reportados los límites permisibles en la norma técnica de inocuidad de los alimentos, sin embargo; se debe excluir a la bacteria *E. coli* aislada en este estudio para la cual si se reportan valores de referencia en el Reglamento Técnico Centroamericano para la inocuidad de los alimentos (Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08). Nuestros resultados del conteo bacteriológico en placa indican que todas las *E. coli* encontradas en el estudio, excedieron el límite permisible según el Reglamento Técnico el cual es de < 10 UFC/g de carne. En ambos mercados se reportó crecimiento en 73 muestras (84.8%) (Tabla 7).

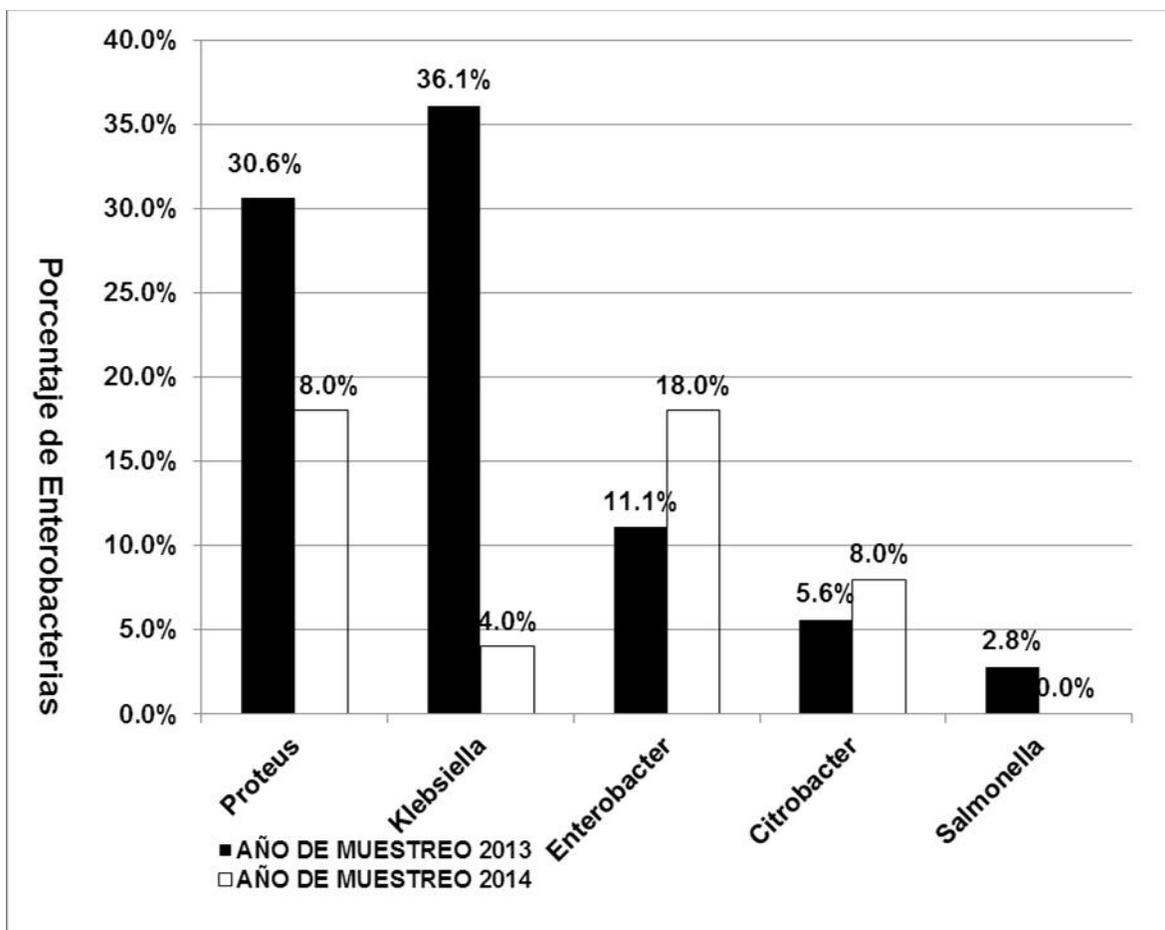
**Tabla 7. Contaminación de las carnes por mercado durante octubre-noviembre del 2013 y julio y septiembre del 2014.**

		Centro de compra de la muestra			
		MRC		MSB	
		n=	%	n=	%
<b>Nº de colonias resultado del conteo en placa</b>	<b>No hubo crecimiento Bacteriano</b>	<b>8</b>	<b>17,8%</b>	<b>5</b>	<b>12,2%</b>
	<b>Contaminación</b>	<b>37</b>	<b>82,2%</b>	<b>36</b>	<b>87,8%</b>

Los resultados de este estudio durante todo el período de análisis demuestran que las carnes se encontraban ampliamente contaminadas con una gran variedad de coliformes fecales, y se pudo observar que la bacteria *Proteus sp*; fue la que colonizó las carnes en la mayoría de los casos, obteniéndose 21 aislados positivos para este microorganismo (51%) , seguido de *Klebsiella sp.* con 15 aislados positivos (40.1%), el resto de Enterobacterias aisladas comprendían los géneros: *Enterobacter sp*, *Citrobacter sp.* Un hecho importante de mencionar es que en el año 2013 una de las muestras analizadas correspondiente al mercado MRC se encontró contaminada con la bacteria *Salmonella sp*, lo que demuestra el alto grado de contaminación fecal de las carnes comercializadas en estos centros de compra (Fig. 5 y 6)

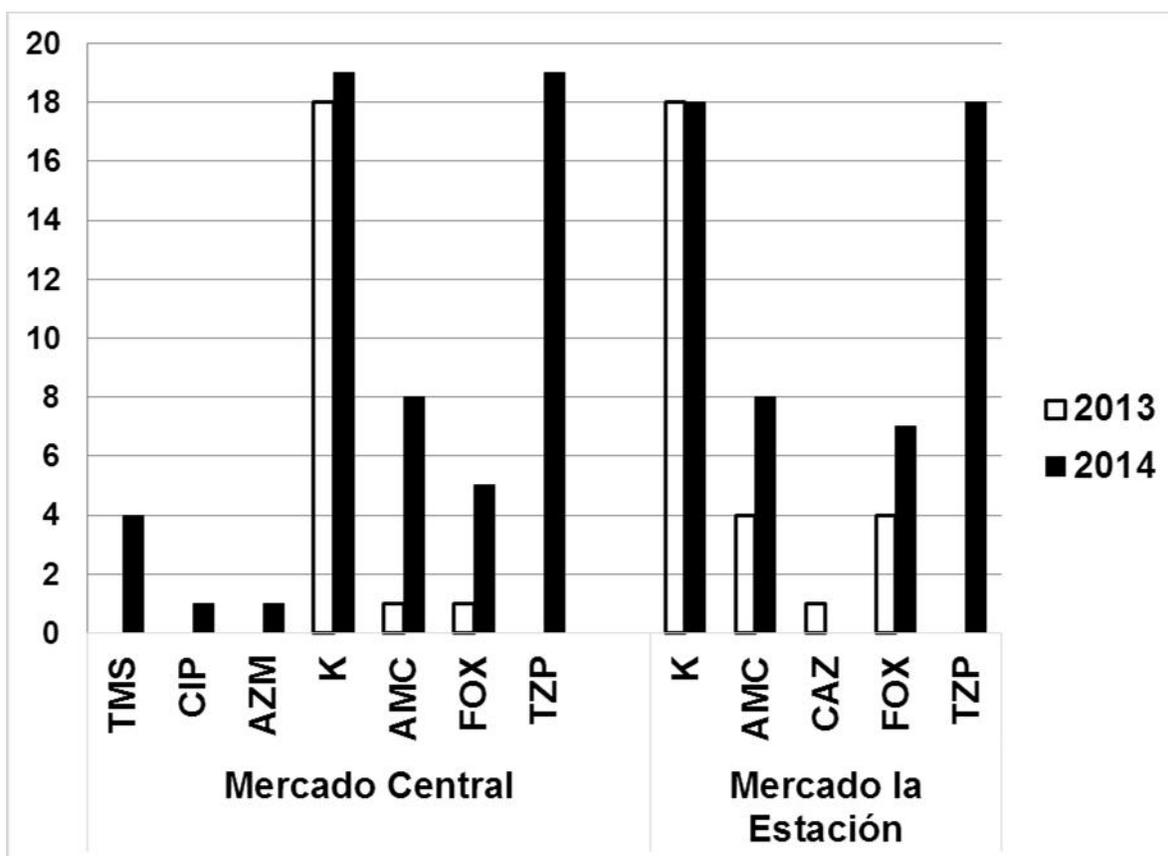


**Fig. 5.** Frecuencia de aislamiento de coliformes fecales por mercado, MRC y MSB durante el año 2013 y año 2014.



**Fig. 6.** Porcentaje de Enterobacterias por año durante el período de estudio Octubre- Noviembre del 2013 y Julio y Septiembre del 2014.

**Análisis de resistencia bacteriana.** En cuanto al análisis de resistencia, se encontró bajos niveles de resistencia, en los aeróbicos mesofílicos aislados de las muestras de carne, a todas las cefalosporinas y betalactámicos; sin embargo; para el aminoglucósido Kanamicina se encontró resistencia en las 73 muestras analizadas (84.8%), de forma similar se observó una marcada resistencia a las penicilinas en los aislados bacterianos en los que fue utilizado este antibiótico (Ver Fig. 7). En cuanto a los mecanismos de resistencia BLEE y AMPc ninguno de los aislados testados expresó fenotípicamente este mecanismo.

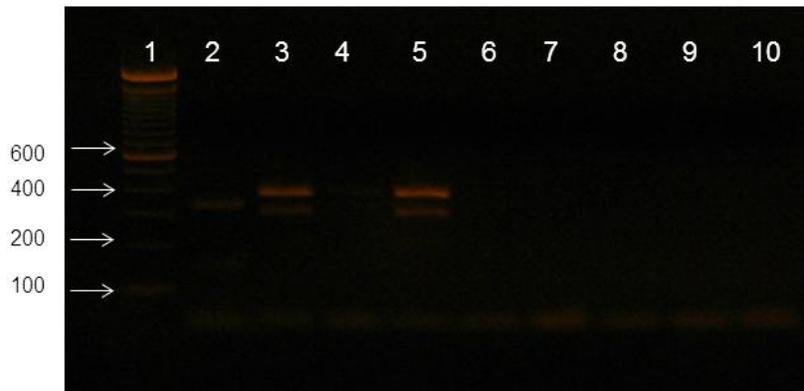


CTX: Cefotaxime, SXT: Trimetroprim sulfametoxasole, CIP: Ciprofloxacina, ATM: Aztreonam, CN: Gentamicina, K: Kanamicina, TZP: Piperacilina más Tazobactam.

**Fig. 7.** Porcentaje de resistencia global de los Aeróbicos mesófilicos aislados en muestras de carne en los mercados MRC (Mercado central) y MSB (Mercado la Estación) Octubre - Noviembre del 2013 y Julio y Septiembre del 2014.

Se realizó la Serotipificación para detectar el antígeno O de *E. coli* en la muestra tres del mercado Central la que era sospechosa de ser O157 en el agar Mck sorbitol, la Serotipificación indicó que este aislado era negativa para los serogrupos: O157, O145, O26, O121, O128, O111, O103 y O55.

Al realizar el análisis genético de los 30 aislados de *E. coli* en busca de los genes de virulencia *eaeA*, *bfpA*, *vt1* y / o *vt2*, *eltB* y / o *estA*, *ial* y PCVD, todas las muestras resultaron negativas lo que indica que las muestras de carne molida de res de los mercados en el estudio no estaban contaminadas con *E. coli* diarrogénicas (Ver Fig. N° 8).



Amplificación de cepas de referencia de *E. coli* diarrogénicas. Poso1; Escalera molecular de 100 pb (Invitrogen Life Thecnologies), Poso 2; ETEC 35401, Poso 3; *vt2-eae* (EHEC) 43889, Poso 4; control negativo *E. coli* 11775, Poso 5; EHEC ATCC 933 (*vt1*, *vt2*, *eae*) En el gel se muestran cuatro controles positivos de DEC más un control negativo de *E. coli*.

**Fig. 8.** PCR Multiplex para detección de genes de virulencia de *E. coli* diarrogénicas en muestras de carne molida de res de los mercados MRC y MSB de la ciudad de León, octubre – noviembre del 2013 y julio y septiembre del 2014.

En el análisis genotípico de los 30 aislados positivos de *E. coli* en ambos mercados durante el período de estudio no se encontró ninguno de los genes de virulencia de los patotipos de *E. coli*.

## 9. DISCUSIÓN.

Este estudio pretendía determinar la presencia de coliformes fecales en carne molida de res que se vende en dos de los principales mercados de la ciudad de León, utilizando para ello en primera instancia un método de recuperación bacterias a través del conteo bacteriológico en placa el cual, tiene la capacidad de detectar de 50-250 UFC/g de carne analizada. Por medio de esta primera etapa, se recuperó un total de 73 aislados positivos para coliformes fecales con valores del CBP de hasta  $4.41 \times 10^5$  UFC/ g de carne, todos los aislados fueron considerados contaminación por lo que no se reportaron en la norma técnica de inocuidad de los alimentos y todos los aislamientos positivos para *E. coli* excedían el margen establecido por la norma técnica en productos cárnicos crudos, lo que pone de manifiesto el grado de contaminación fecal en las carnes que se comercializan en esos puestos, de forma similar en un estudio realizado en una Planta de productos cárnicos listos para el consumo en Trinidad, en Indias Occidentales, por Syne y cols. en el 2013; en el que se evaluaron todos los procesos de producción de salchichas de pollo y cerdo, se encontró como principal contaminante al *Staphylococcus aureus* con cifras de entre 1.98 y 1.95 log<sub>10</sub> UFC/g en fragmentos de bologna y bacon respectivamente; se identificó *E. coli* en mezclas de platos que contenían salchichas y mortadela de pollo con 35 y 0.72 log<sub>10</sub> UFC/g respectivamente, esto a pesar de todas las medidas de higiene que el proceso de producción comercial de estos productos exige <sup>(82)</sup>.

El problema de las intoxicaciones alimenticias por bacterias patógenas sigue preocupando a nivel mundial, así lo demuestra un estudio realizado por Magwere y cols. en el 2013 ; en el que se pretendía identificar *E. coli* diarregeicas, por PCR y serotipificación, en carnes molidas de res, cerdo y pollo en puestos de venta en los Estados de Pensilvania y Virginia ( gen wzx de los 7 grupos de *E. coli* ECST y para la identificación de genes de la toxina Shiga ( stx1 y stx2 ), se encontró que de un total de 83 muestras de carne analizadas , 17 ( 20 %) fueron positivas para O121 , 9 ( 10 %) O45, 8 (9 %) O157, 3 (3 %) O103, y 1 (1 %) O145 <sup>(83)</sup>.

Otro estudio realizado por Xia Xiaodong y cols., en el año 2010, en el que se pretendía identificar especies patógenas de *E. coli* en carnes rojas; a través del programa de Monitoreo de la Resistencia Antibacteriana en Estados Unidos (NARMS) durante el año 2002 al 2007, se logró coleccionar 7,258 aislados de *E. coli* los que fueron analizados con el objetivo de detectar genes de la toxina shiga; 17 aislados resultaron positivos, uno para el gen *sxt* y cinco para ambos genes *sxt1* y *sxt2*, dos positivos para *sxt1*, 10 positivos para *sxt2* <sup>(12)</sup>.

En un estudio realizado por Bosilevac J., y cols en el 2011, en el que se reporta la prevalencia y caracterización de ECST no O157 en centros donde se comercializa carne roja se analizaron un total de 4,133 en Estados Unidos durante un período de 24 meses. Se identificó genes de la toxina shiga en 1,006 aislados <sup>(39)</sup>. Como puede observarse en todos los estudios mencionados lograron determinar las presencias de DEC en muestras de diferente tipos de carne, sin embargo en nuestro estudio no se logró recuperar ninguna *E. coli* que resultara positivo para algún patotipo de DEC.

El no haber encontrado patotipos diarregénicos de *E. coli* en nuestro estudio, podría indicar que la carne molida no actúa como un medio de dispersión de este tipo de patógenos en nuestro medio. Sin embargo, es necesario realizar un estudio más amplio que abarque otros mercados de la ciudad de León y probablemente de otras regiones del país. Así como lo hicieron en un estudio en Argentina donde el objetivo era identificar *E. coli* O157 y no O 157 en carne molida de res comercializada en centros de venta de la misma así como evaluar las condiciones ambientales de estos puestos de ventas <sup>(5)</sup>.

El surgimiento de resistencia antimicrobiana en bacterias que son transmitidas por alimentos y que podrían causar algún tipo de enfermedad, es un gran problema de salud pública <sup>(84)</sup>, como resultado del uso excesivo de antibióticos en animales, lo que ha contribuido a aumentar la resistencia a los antibióticos en diferentes cepas bacterianas durante los últimos 30 años <sup>(84)</sup>, con la subsecuente aparición de cepas bacterianas productoras de BLEE lo que podría causar fracaso en el

tratamiento de intoxicaciones alimentarias por *Enterobacterias* <sup>(85, 86)</sup>. Un estudio realizado en carne de aves de corral en busca de cepas *Salmonella* antibiótico resistentes, se reporta resistencia Kanamicina y Gentamicina en un 27% y 34.8% respectivamente <sup>(87)</sup>. Otro estudio de caracterización molecular de bacterias antibiótico resistentes en carne de pollo en supermercados en Bangkok, Tailandia; se identificaron los genes aadA2, aadA4, aadA22 y aadA23, que codifican para resistencia a los aminoglucósidos, y el gen dfrA5 que codifica resistencia a trimetoprim sulfametoxasole <sup>(88)</sup>. En nuestro estudio se encontró bajos niveles de resistencia en los coliformes fecales aislados de las muestras de carne, a todas las cefalosporinas y betalactámicos; sin embargo; para el aminoglucósido Kanamicina se encontró resistencia en las 73 muestras analizadas (84.8%), de forma similar se observó una marcada resistencia a las penicilinas en los aislados bacterianos en los que fue utilizado este antibiótico.

A pesar de que existen estudios que demuestran la presencia de bacterias antibióticos resistentes en carnes <sup>(87-89)</sup> lo cual podría estar implicado en la dispersión de estos patógenos a la población humana, en nuestro estudio los resultados indican que no hay presencia de este tipo de patógenos como contaminantes de la carne que actualmente se expende en la ciudad de León, Nicaragua.

## 10.CONCLUSIONES.

- El 84.9% de las muestras analizadas se encontraban contaminadas con Aeróbicos mesofílicos( coliformes fecales) y en un 15.1% de las carnes analizadas no se logró recuperar ningún tipo de bacterias
- Del 84.9% de coliformes fecales 34.9% eran *E. coli* pero ninguno de estos aislados tenían genes de virulencia y de resistencia.
- Se obtuvo un 84.8% de resistencia al aminoglucósido Kanamicina en el total de aislados bacterianos en las muestras analizadas, y muy bajos niveles de resistencia para el resto de los antibióticos testados.

## 11.RECOMENDACIONES.

- Al encontrarse contaminación con coliformes fecales en un alto porcentaje de las muestras de carne analizadas en los dos mercados en estudio se recomienda realizar estudios de contaminación de superficies y de manipuladores de alimentos en ambos mercados con el objetivo de encontrar el origen o la fuente de contaminación fecal de las carnes de consumo comercializadas en estos centros de compras.
- Se recomienda realizar un estudio longitudinal y ampliar el número de muestras de carne con el objetivo de aumentar la probabilidad de encontrar patotipos de *E. coli* diarrogénica.
- Realizar estudios que evalúen todos los procesos de producción de la carne con el objetivo de diferenciar entre contaminación endógena y exógena de las carnes de consumo de manera que esta información contribuya a la elaboración de estrategias de inocuidad de los alimentos en Nicaragua.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Repeto H A, Arrizurieta E.,E. Microangiopatía trombótica y síndrome urémico hemolítico. *Nefrología Clínica* [Internet]. Available from: <https://nefrologia.humv.es>.
2. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature reviews Microbiology*. 2010 Jan;8(1):26-38 [Accession Number]. Original Publication].
3. WHO global strategy for food safety: safer food for better health. In: Organization. WH, editor. Geneva: The Organization; 2002.
4. Gutierrez G. Estudio de caso – Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Nicaragua Available from: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/colera/Nicaragua.pdf>.
5. Brusa V, Aliverti V, Aliverti F, Ortega EE, de la Torre JH, Linares LH, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef retail markets from Argentina. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2012;2:171.
6. Kosek M, Bern C, Guerrant RL. The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003;81(3):197-204.
7. Iyer A, Kumosani T, Yaghmoor S, Barbour E, Azhar E, Harakeh S. *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in meat in Jeddah, Saudi Arabia. *Journal of infection in developing countries*. 2013 Nov;7(11):812-8.
8. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en 2011. Available from: [www.cisan.org.ar/articulo\\_ampliado.php?id=173&hash...](http://www.cisan.org.ar/articulo_ampliado.php?id=173&hash...)
9. Gould LH, Walsh, K. A., Vieira, A. R., et al. . Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks —United States, 1998–2008. June 28, 2013 *Surveillance Summaries / Vol. 62 / No. 2*.
10. Blanco-Rios FA, Casadiego-Ardila G, Pacheco PA. [The microbiological quality of food sent to a public health laboratory in 2009]. *Revista de salud publica*. 2011 Dec;13(6):953-65.
11. Jure MA, Condori S, Leotta GA, Chinen I, Miliwebsky E, Allori C, et al. [Detection, isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in fresh ground beef from butcher shops in Concepcion, Tucuman Province]. *Rev Argent Microbiol*. 2010 Oct-Dec;42(4):284-7.
12. Xia X, Meng J, McDermott PF, Ayers S, Blickenstaff K, Tran TT, et al. Presence and characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* and other potentially diarrheagenic *E. coli* strains in retail meats. *Applied and environmental microbiology*. 2010 Mar;76(6):1709-17.
13. Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Gonzalez EA, Bernardez MI, et al. Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ). 2003 Apr;228(4):345-51.

14. Blanco M, Blanco JE, Blanco J, Mora A, Prado C, Alonso MP, et al. Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle. *Veterinary microbiology*. 1997 Mar;54(3-4):309-19.
15. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, Gonzalez EA, et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-xi*). *Journal of clinical microbiology*. 2004 Feb;42(2):645-51.
16. Kobayashi H, Shimada J, Nakazawa M, Morozumi T, Pohjanvirta T, Pelkonen S, et al. Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle in Japan. *Applied and environmental microbiology*. 2001 Jan;67(1):484-9.
17. Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, Chinen I, Baschkier A, Chillemi G, et al. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *International journal of food microbiology*. 2004 Nov 1;96(2):189-98.
18. Kopper G, Calderón, G., Schneider, S., et al. . Enfermedades transmitidaspor alimentos y su impactosocioeconómico. In: AGRICULTURA ODLNUPL, ALIMENTACIÓN YL, Roma, editors.: FAO 2009; 2009. p. 187.
19. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases - the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International journal of food microbiology*. 2010 May 30;139 Suppl 1:S3-15.
20. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996–2012 2013;Vol. 62 N0 15.
21. Crim SM, Iwamoto M, Huang JY, Griffin PM, Gilliss D, Cronquist AB, et al. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food--Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. sites, 2006-2013. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2014 Apr 18;63(15):328-32.
22. Boletín Epidemiológico Semana No. 28 - Ministerio de Salud2013. Available from: [www.minsa.gob.ni](http://www.minsa.gob.ni)
23. Prado V, Solari V, Alvarez IM, Arellano C, Vidal R, Carreno M, et al. [Epidemiological situation of foodborne diseases in Santiago, Chile in 1999-2000]. *Revista medica de Chile*. 2002 May;130(5):495-501.
24. Food Safety and Foodborne Illness. In: Organización Mundial de la Salud, editor. 2007.
25. Safety of meat and processed meat. 2009.
26. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):990-3.
27. Naravaneni R, Jamil K. Rapid detection of food-borne pathogens by using molecular techniques. *Journal of medical microbiology*. 2005 Jan;54(Pt 1):51-4.
28. Buzby JC, Roberts T. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. *Gastroenterology*. 2009 May;136(6):1851-62.

29. Hasan B, Sandegren L, Melhus A, Drobni M, Hernandez J, Waldenstrom J, et al. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* in wild birds and free-range poultry, Bangladesh. *Emerging infectious diseases*. 2012 Dec;18(12):2055-8.
30. Robbins A, Anand M, Nicholas DC, Egan JS, Musser KA, Giguere S, et al. Ground beef recall associated with non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, United States. *Emerging infectious diseases*. 2014 Jan;20(1):165-7.
31. Bosilevac JM, Koohmaraie M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from commercial ground beef in the United States. *Applied and environmental microbiology*. 2011 Mar;77(6):2103-12.
32. RESUMEN DE LAS PATOLOGIAS MAS IMPORTANTES TRANSMITIDAS A TRAVES DE LOS ALIMENTOS. Available from: [www.unavarra.es/genmic/.../10-patologias%20alimentarias.htm](http://www.unavarra.es/genmic/.../10-patologias%20alimentarias.htm).
33. Rodriguez G. Principales Características y Diagnóstico de los Grupos Patógenos de *E. coli*. 2002;Mex 2002;44:464-475.
34. Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of animal science*. 2007 Mar;85(13 Suppl):E45-62.
35. Adams M, R., Moss, M. *Food Microbiology*. RSC PublishingThe Royal Society of Chemistry 2008.
36. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Mollby R, Weintraub A. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from Leon, Nicaragua. *Journal of medical microbiology*. 2009 May;58(Pt 5):630-7.
37. Bloch SK, Felczykowska A, Nejman-Falenczyk B. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak--have we learnt a lesson from it? *Acta biochimica Polonica*. 2012;59(4):483-8.
38. Brooks JT, Sowers EG, Wells JG, Greene KD, Griffin PM, Hoekstra RM, et al. Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *The Journal of infectious diseases*. 2005 Oct 15;192(8):1422-9.
39. Bosilevac JM, Koohmaraie M. Predicting the presence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by using molecular tests for Shiga toxins, intimin, and O serogroups. *Applied and environmental microbiology*. 2012 Oct;78(19):7152-5.
40. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*. 1998 Jan;11(1):142-201.
41. Martin A, Beutin L. Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International journal of food microbiology*. 2011 Mar 15;146(1):99-104.
42. Pacheco GL. Etiología de Las Diarreas Agudas en Niños menores de 5 años en Tabasco. [Posgrado]Junio 2007.
43. Sears CL, Kaper JB. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological reviews*. 1996 Mar;60(1):167-215.
44. Moredo F A. Prevalencia de *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* productor de toxina shiga en cerdos sin manifestación clínica de diarrea de la provincia de Buenos Aires. 2012: Universidad Nacional de la Plata; 2012.

45. Johannes L, Romer W. Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature reviews Microbiology*. 2010 Feb;8(2):105-16.
46. Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary microbiology*. 2010 Jan 27;140(3-4):360-70.
47. Brunder W, Schmidt H, Frosch M, Karch H. The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements. *Microbiology (Reading, England)*. 1999 May;145 ( Pt 5):1005-14.
48. Burland V, Shao Y, Perna NT, Plunkett G, Sofia HJ, Blattner FR. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic acids research*. 1998 Sep 15;26(18):4196-204.
49. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2009 Dec;73(4):750-74.
50. Ostroff SM, Tarr PI, Neill MA, Lewis JH, Hargrett-Bean N, Kobayashi JM. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157:H7 infections. *The Journal of infectious diseases*. 1989 Dec;160(6):994-8.
51. Vidal JE, Canizalez-Roman A, Gutierrez-Jimenez J, Navarro-Garcia F. [Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*]. *Salud publica de Mexico*. 2007 Sep-Oct;49(5):376-86.
52. Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science (New York, NY)*. 1991 Nov 1;254(5032):710-3.
53. Manual de Procedimientos de Bacteriología Médica. In: MINISTERIO DE SALUD GDN, editor. Edición 2004.
54. Rubtsova MY, Ulyashova MM, Bachmann TT, Schmid RD, Egorov AM. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. *Biochemistry Biokhimiia*. 2010 Dec;75(13):1628-49.
55. Martinez-Martinez L, Calvo J. [The growing problem of antibiotic resistance in clinically relevant Gram-negative bacteria: current situation]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*. 2010 Sep;28 Suppl 2:25-31.
56. Nelson EC, Elisha BG. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999 Apr;43(4):957-9.
57. Tracz DM, Boyd DA, Hizon R, Bryce E, McGeer A, Ofner-Agostini M, et al. ampC gene expression in promoter mutants of cefoxitin-resistant *Escherichia coli* clinical isolates. *FEMS microbiology letters*. 2007 May;270(2):265-71.
58. Fernandez-Cuenca F, Martinez-Martinez L, Amblar G, Biedenbach DJ, Jones RN, Pascual A. Susceptibility to amoxicillin-clavulanate among clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to cefoxitin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006 Feb;12(2):197-8.
59. Hanson ND, Sanders CC. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Current pharmaceutical design*. 1999 Nov;5(11):881-94.

60. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Chen HE, Lee CC, Chuang YC. Institutional spread of clonally related *Serratia marcescens* isolates with a novel AmpC cephalosporinase (S4): a 4-year experience in Taiwan. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008 Aug;61(4):460-7.
61. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. 2005 Oct;18(4):657-86.
62. Oteo J, Delgado-Iribarren A, Vega D, Bautista V, Rodriguez MC, Velasco M, et al. Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy. *International journal of antimicrobial agents*. 2008 Dec;32(6):534-7.
63. Mena A, Plasencia V, Garcia L, Hidalgo O, Ayestaran JI, Alberti S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Aug;44(8):2831-7.
64. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Romero L, Martinez-Martinez L, Muniain MA, Perea EJ, et al. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in nonhospitalized patients. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Mar;42(3):1089-94.
65. Reyes A, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemelman R, Gonzalez G. Prevalence and types of class 1 integrons in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* from several Chilean hospitals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003 Feb;51(2):317-21.
66. Rodriguez-Bano J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. *Expert review of anti-infective therapy*. 2008 Oct;6(5):671-83.
67. Hammerum AM, Heuer OE. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009 Apr 1;48(7):916-21.
68. Curtis ML, Franceschi, O., y col. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos en comedores de empresas privadas 2000; Vol. 50
69. Rivera Ceballos JF. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS, INDICADORES DE HIGIENE Y *Salmonella* EN HORNADO EXPENDIDO EN CUATRO LOCALES DE COMIDA TÍPICA DEL MERCADO MUNICIPAL DE SANGOLQUÍ [Pregrado]: UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA EQUINOCCIAL; 2012.
70. Andino R, F., y col. Un enfoque práctico para la inocuidad alimentaria. . 2010. Febrero 2010.
71. Guía de Interpretación de Resultados Microbiológicos de Alimentos In: Administración Nacional de Medicamentos ayTM, ANMAT editor.
72. Da silva N, Taniwaki, H., y col. MICROBIOLOGICAL EXAMINATION METHODS OF FOOD AND WATER A Laboratory Manual: CRC Press/Balkema; 2013.
73. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS . METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL. 2011.
74. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *Journal of clinical microbiology*. 2005 Feb;43(2):755-60.

75. Polymerase chain reaction (PCR), PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads. Available from: [https://www.gelifesciences.com/.../litdoc11002607AB\\_20110831023628...](https://www.gelifesciences.com/.../litdoc11002607AB_20110831023628...)
76. Cavalieri SJ, et al. Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. American Society for Microbiology [Internet]. 2005. Available from: [www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc...](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc...)
77. Pasteran F, Corso, A. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI)2010. Available from: [www.redbioquimicasf.com.ar/redes/whonet/novedades\\_clsi\\_2010.pdf](http://www.redbioquimicasf.com.ar/redes/whonet/novedades_clsi_2010.pdf).
78. Cockerill FR, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement2011; Vol. 31 No. 1. Available from: [xa.yimg.com/kq/groups/1648193/.../name/CLSI-2011-+Nasrullah.pdf](http://xa.yimg.com/kq/groups/1648193/.../name/CLSI-2011-+Nasrullah.pdf)
79. Fang H, Ataker F, Hedin G, Dornbusch K. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Feb;46(2):707-12.
80. Amaya E, Caceres M, Fang H, Ramirez AT, Palmgren AC, Nord CE, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit in Leon, Nicaragua. *International journal of antimicrobial agents*. 2009 Apr;33(4):386-7.
81. Pitout JD, Hossain A, Hanson ND. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology*. 2004 Dec;42(12):5715-21.
82. Syne SM, Ramsbhag A, Adesiyun AA. Microbiological hazard analysis of ready-to-eat meats processed at a food plant in Trinidad, West Indies. *Infection ecology & epidemiology*. 2013;3.
83. Magwedere K, Dang HA, Mills EW, Cutter CN, Roberts EL, DeBroy C. Incidence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains in beef, pork, chicken, deer, boar, bison, and rabbit retail meat. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*. 2013 Mar;25(2):254-8.
84. Akbar A, Anal AK, Ansari FA. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2013 Feb;3(2):163-8.
85. Carmo LP, Nielsen LR, da Costa PM, Alban L. Exposure assessment of extended-spectrum beta-lactamases/AmpC beta-lactamases-producing *Escherichia coli* in meat in Denmark. *Infection ecology & epidemiology*. 2014;4.
86. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2008 Nov 20;13(47).
87. Ellerbroek L, Narapati D, Phu Tai N, Poosaran N, Pinthong R, Sirimalaisuan A, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from imported chicken carcasses in Bhutan and from pig carcasses in Vietnam. *Journal of food protection*. 2010 Feb;73(2):376-9.

88. Chaisatit C, Tribuddharat C, Pulsrikarn C, Dejsirilert S. Molecular characterization of antibiotic-resistant bacteria in contaminated chicken meat sold at supermarkets in Bangkok, Thailand. *Japanese journal of infectious diseases*. 2012;65(6):527-34.
89. Adak GK, Meakins SM, Yip H, Lopman BA, O'Brien SJ. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerging infectious diseases*. 2005 Mar;11(3):365-72.

### 13.ANEXOS.

#### Anexo 1. Esquema general de las diluciones para el conteo en placa.

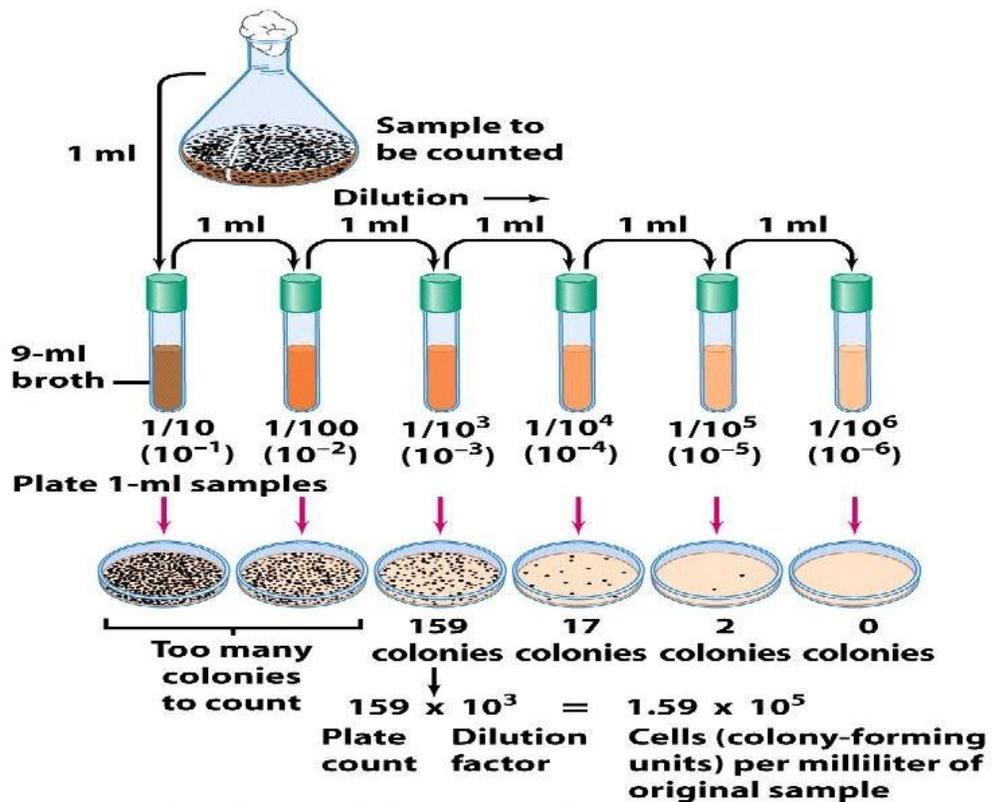


Figure 6-11 Brock Biology of Microorganisms 11/e  
© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

## **Anexo 2.**

Fórmula para el cálculo de UFC/g de carne

CFU/g o CFU/ml = N° de colonias en placa (entre 25 y 300) x inverso de la dilución x 1/ peso en gramos de la muestra

## **Anexo 3.**

### **Materiales a utilizar en el conteo bacteriológico en placa.**

- Placas de Petri, de vidrio (100 × 15 mm) o de plástico (90 x 15 mm).
- Pipetas de 10 - 100 µl, 200 - 1000 µl, 1- 5 ml.
- Tubos estériles
- Baño maría o incubadora de agar temple, 44 – 46 ° c.
- Incubadora a 37 ° c.
- Contador de colonias (DARKFIELD QUEBEC COLONY COUNTER. American Optical).
- Agar para recuento en placa (estándar y de métodos de agar (PCA)).
- Incubadora para el secado de la superficie de placas de agar, preferentemente en 50° c.
- Separadores de vidrio (espátulas Drigalski, varillas de vidrio, en forma de barra de hockey).
- Stomacher (homogeneizador peristáltico en su defecto realizar homogenización manual).
- Bolsas estériles para stomacher (en su defecto bolsas Ziploc).