



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y
MOLECULAR DE *Staphylococcus aureus*
RESISTENTE A METICILINA (SARM) AISLADO DE
MUESTRAS DE ALIMENTOS DE ORIGEN CÁRNICO
EN LA CIUDAD DE CARTAGENA**

LETSY LÓPEZ GUTIÉRREZ

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Medellín, Colombia
2013

**CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR
DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A METICILINA
(SARM) AISLADO DE MUESTRAS DE ALIMENTOS DE
ORIGEN CÁRNICO EN LA CIUDAD DE CARTAGENA**

LETSY LÓPEZ GUTIÉRREZ

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Director:

Médico Veterinario y Zootecnista Ph.D. Ciencia de Alimentos Héctor Suarez Mahecha

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Ingeniería Agrícola y Alimentos
Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Medellín, Colombia
2013

Para mi amado esposo Jaime, con mucho amor. Gracias por tu apoyo, el cual supero mis expectativas, ya que aplazaste tus sueños para que alcanzara los míos.

Para mi hermosa hija Ana Esther quien refleja el amor y la fidelidad de mi padre Celestial.

Los amo.

Agradecimientos

A Dios por derramar su gracia y sabiduría sobre mí.

A mi esposo y mi hija por su comprensión durante todo este proceso. A mi madre por sus oraciones.

Al Dr. Héctor Suarez Mahecha por sus orientaciones y su dedicación.

Al Dr. Manuel Torres Director de Investigaciones de la Universidad del Sinú EBZ Seccional Cartagena por apoyar la realización de la investigación.

Al Dr. Alfonso Bettin, de quien recibí asesoría permanente que enriqueció mi investigación.

A Liris González, auxiliar del Laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Universidad del Sinú EBZ seccional Cartagena, quien siempre me colaboró, gracias por tu valioso apoyo.

A los estudiantes del semillero de Investigación “Innovación e Inocuidad” de la Escuela de Nutrición y Dietética, semillero del Dr. Alfonso Bettin de la Escuela de Medicina de la Universidad del Sinú EBZ Seccional Cartagena.

A la Universidad de Cartagena por facilitarme las instalaciones del Laboratorio de Investigaciones.

A las Dras. Martha Mora, Adriana y Liliana del Laboratorio Clínico del Hospital Universitario de Cartagena, por toda su colaboración y apoyo.

A la Dra. Escilda Benavides Jefe del área de Básicas y al Dr. Carlos Parga por facilitarme las instalaciones del Laboratorio de Biología Molecular de Universidad del Sinú EBZ Seccional Cartagena.

A Diego Díaz Almeida estudiante de Medicina por su apoyo en la toma de muestra.

Dra. Emili Córdoba y Dr. Gustavo Orozco del área de Medicamentos y Alimentos del Departamento Distrital de Salud (DADIS), gracias por su colaboración permanente.

Y a todos los que colaboraron. Muchas gracias.

Dios les Bendiga a todos.

Resumen

Staphylococcus aureus es un microorganismo que posee características particulares de virulencia y resistencia a los antibióticos. En los humanos causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas. El principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina (SARM), que tradicionalmente se encontraban limitadas al ámbito hospitalario, produciendo infecciones nosocomiales a nivel mundial. Sin embargo, en años recientes las cepas SAMR han aparecido en ambientes no hospitalarios, provocando problemas de salud pública. La prevalencia de estas cepas en la comunidad se ha incrementado, lo que ha conllevado a la aparición de esta bacteria en personal no relacionado con el cuidado de la salud (manipuladores de alimentos, animales domésticos, equipos, utensilios). Si no se toman las medidas adecuadas para entender y controlar la cambiante epidemiología puede diseminarse estos patógenos en cualquier ambiente. Fue realizado un estudio descriptivo para caracterizar *Staphylococcus aureus* presentes en alimentos de origen cárnico, se analizaron 160 muestras de carne molida de res y carne de chuleta de cerdo de 40 expendios ubicados en las tres localidades de la ciudad de Cartagena (Histórica y del Caribe Norte (LH), Industrial de la Bahía (LI) y De la Virgen y Turística (LV). A través del cultivo microbiológico convencional se identificó *Staphylococcus aureus* en el 88% de las muestras; mientras que la técnica de PCR confirmó la presencia de *Staphylococcus aureus* en el 100% de las muestras. En el 72% de los expendios analizados se obtuvo recuentos >100 UFC/g, el 27% presentaron recuentos <100 UFC/g. El *Staphylococcus aureus* se encontró en mayor porcentaje en la localidad Virgen y Turística (48,2%), seguido de la localidad Histórica y del Caribe Norte con un 34,4%. Los aislados con características macroscópicas presuntivas del género *Staphylococcus aureus* fueron confirmadas por la técnica de PCR, a estas cepas fue realizada la identificación del gen *mecA* que codifica las cepas Meticilino resistentes. Fueron confirmadas como *Staphylococcus aureus* un total de (88%) de cepas; se identificaron 18% de cepas SARM y 82% de cepas SASM. En la identificación del gen *mecA* que codifica las cepas Meticilino resistentes y el gen *Luk* que codifican la toxina PVL. La presencia del gen se encontró en 7 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, de las cuales 6 cepas fueron identificadas como Meticilino resistentes y 1 como Meticilino sensible. En la prueba de resistencia, los *Staphylococcus aureus* aislados en las muestras de carne de res molida y carne de cerdo, presentaron marcada resistencia, entre el 12 a 56 %, a los antibióticos que se usan frecuentemente para tratar infecciones por este microorganismo como: Penicilina, Eritromicina, Amoxicilina – Clavulonato, Clindamicina y Ampicilina-Sulbatam, lo cual podría generar un problema de salud pública.

Palabras Claves: *Staphylococcus aureus*, SARM, inocuidad, bacteria, alimentos.

Abstract

Staphylococcus aureus is a microorganism that has particular characteristics of virulence and antibiotic resistance. In humans it causes a wide variety of infectious diseases. The main impact of this organism is due to the strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA), which were traditionally limited to the hospital environment, causing nosocomial infections worldwide. However, in recent years MRSA strains have appeared in non-hospital environments, causing public health problems. The prevalence of these strains in the community has increased, which has led to the emergence of this bacterium in people unrelated to health care (food handlers, pets, equipment, utensils). Failure to take appropriate steps to understand and control the changing epidemiology may be a transmission of these pathogens spread in any environment. A descriptive study was conducted to characterize *Staphylococcus aureus* present in meat-based foods, analyzed 160 samples of ground beef and pork 40 outlets located in three locations in the ciudad de Cartagena (Histórica y del Caribe Norte (LH), Industrial de la Bahía (LI) y De la Virgen y Turística (LV). Through conventional microbiological culture *Staphylococcus aureus* was identified in 88% of the samples analyzed, while PCR confirmed the presence of *Staphylococcus aureus* in 100% of the analyzes. In 72% of the outlets analyzed was obtained counts > 100 CFU / g, 27% had counts <100 CFU / g. *Staphylococcus aureus* was found in a higher percentage in the LV (48.2%), followed by LH with 34.4%. isolates with presumptive macroscopic characteristics of the genus *Staphylococcus aureus* were confirmed by the PCR technique, these strains identification was made *mecA* gene coding for methicillin-resistant strains. *Staphylococcus aureus* were confirmed through PCR in total (88%) of strains identified 18% of MRSA strains and 82% of MSSA strains. On gene identification *mecA* encoding methicillin resistant strains and the gene encoding the toxin Luk PVL. The presence of the gene was found in seven *Staphylococcus aureus* strains isolated, including 6 strains were identified as methicillin-resistant and methicillin-sensitive and one. On test of resistance of *Staphylococcus aureus* isolated in samples of ground beef and pork, presented marked resistance, between 12-56% to the antibiotics.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, safety, bacteria, food.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Introducción	1
1. Capítulo 1: Caracterización microbiológica de <i>Staphylococcus aureus</i> aislado de carne molida de res y cerdo.	5
1.1 Resumen	5
1.2 Abstract	6
1.3 Introducción	7
1.4 Materiales y Métodos.....	8
1.4.1 Toma de muestras	8
1.4.2 Cultivo.....	10
1.4.3 Lectura e interpretación de resultados	10
1.4.4 Extracción de ADN.....	11
1.4.5 Ensayos de PCR:.....	11
1.5 Resultados.....	11
1.6 Discusión.....	15
1.7 Conclusión.....	16
1.8 Bibliografía.....	17
2. Capítulo 2: Prevalencia de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (SAMR) en expendios comerciales de Cartagena	19
2.1 Resumen	19
2.1 Abstract	20
2.1 Introducción.....	21
2.2 Materiales y Métodos.....	23
2.3 Identificación Molecular.....	23
2.4 Ensayos de PCR	24
2.5 Resultados.....	24
2.6 Discusión.....	26
2.7 Conclusiones	27
3 Capítulo 3: Prevalencia de gen codifica toxina PVL aislado de alimentos de origen cárnico comercializados en la Ciudad de Cartagena	31
3.1 Resumen.....	31
3.2 Abstract	32
3.3 Introducción.....	33
3.4 Materiales y Métodos.....	33
3.4.1 Extracción de ADN.....	34
3.4.2 Ensayos de PCR.....	34
3.5 Resultados.....	35
3.6 Discusión.....	36
3.7 Conclusiones.....	36
3.8 Bibliografía.....	37
4. Capítulo 4. Análisis del Perfil de Susceptibilidad Antibiótica de <i>Staphylococcus aureus</i> aislados de productos cárnicos	39
4.1 Resumen	39
4.2 Abstract.....	40

4.3	Introducción.....	40
4.4	Materiales y Métodos.....	41
4.5	Resultados.....	42
4.6	Discusión.....	45
4.7	Conclusión.....	45
4.8	Bibliografía.....	46
5.	Conclusiones y Recomendaciones.....	47
5.1	Conclusiones	47
5.2	Recomendaciones.....	49
6.	Bibliografía.....	50

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Mapa localidades de expendios de carnes en la ciudad de Cartagena.....	9
Figura 1-2. Crecimiento presuntivo de <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Baire Parcker....	10
Figura 1-3. Total de expendios con recuentos presuntivos de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
Figura 1-4. Muestras con crecimiento presuntivo de <i>Staphylococcus aureus</i>	13
Figura 1-5. Electroforesis de PCR. Presencia del Gen Nuc en bacteria aislada de muestras de carne de chuleta de cerdo y carne molida de res.	14
Figura 1-6. Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> confirmadas por PCR.....	14
Figura 2-1. Resultado de electroforesis presencia del gen <i>MecA</i> en las muestras 24CM2 Y 55CC1.....	24
Figura 3-1. Resultados de muestras con presencia del gen que codifica la toxina PVL..	35
Figura 1-4. Perfil de susceptibilidad de cepas de SAMS.....	45

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Distribución de expendios de productos cárnicos por localidades.....	9
Tabla 1-2. Muestras con crecimiento presuntivo de <i>Staphylococcus aureus</i> distribuidos por localidades en la ciudad de Cartagena	12
Tabla 1-3. Recuentos de colonias presuntivas de <i>Staphylococcus aureus</i> distribuidas por expendios	13
Tabla 2-1. Prevalencia de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> SAMR y SAMS.....	25
Tabla 2-2. Localidades con cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> SAMR	255
Tabla 3-1. Gen que codifica la toxina aislados de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	35
Tabla 3-2. Recuento de Colonias UFC/gr vs presencia del gen que codifica la toxina PVL	35
Tabla 4-1. Susceptibilidad antibiótica de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> confirmado por PCR.....	422
Tabla 4-2. Porcentaje de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistente aisladas de productos cárnicos.....	43
Tabla 4-3. Porcentaje de Resistencia antibiótica de cepas SAMR	43
Tabla 4-4. Resistencia antimicrobiana de cepas con gen que codifica toxina PVL.....	44

Introducción

El *Staphylococcus aureus* o estafilococo dorado fue identificado por un cirujano Alexander Ogston en 1880, quien lo encontró como agente causal de la mayoría de abscesos de partes blandas. Este agente causa lesiones inflamatorias con contenido purulento, puede progresar por contigüidad a estructuras más profundas, y al llegar a torrente sanguíneo diseminarse y producir el mismo tipo de lesión en cualquier lugar del organismo. Adicionalmente, este agente tiene la capacidad de producir toxinas, las que aumentan la severidad del proceso, así exista una pequeña cantidad de agentes infecciosos.¹

Desde los años 90 aparece en Australia una nueva cepa de SARM, cuya particularidad es la de tener un comportamiento diferente a la cepa aislada a nivel intrahospitalario (SARM-AH), se adquiere en la comunidad y el enfermo no muestra antecedente de haber estado en contacto con ambientes o personas vinculadas a hospitales, por lo que se le denomina SARM-AC. Muestra un patrón de resistencia a la Meticilina, pero no necesariamente a todas las otras familias de antibióticos (su patrón de resistencia es variable). Suele producir una mayor frecuencia de infecciones entre sus portadores, y las infecciones suelen ser más agresivas, con destrucción tisular y mayor frecuencia de diseminación. La gran mayoría son portadoras de enzimas y toxinas; una de las más comunes lo porta casi el 90% de las cepas es la Panto Valentín Leucocidina (PVL), que le confiere la capacidad de causar destrucción de Leucocito y además causar lesiones necrotizantes en partes blandas y a nivel pulmonar. SARM-AC tiene una serie de propiedades que la hacen más peligrosa para el ser humano, ya que produce infecciones con más frecuencia, que suelen ser más graves y con mala respuesta a los antibióticos.^{2,3}

La tasa de infección por SARM ha aumentado durante las dos últimas décadas, siendo reportada como la causa más común de infección nosocomial, el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales de Estados Unidos (NNIS), informó un incremento del 40% en la frecuencia de cepas de SARM hacia 1999, comparado con el basal de 1994–1998. Adicionalmente se describe que la mortalidad en sujetos que presentan bacteriemia por este agente se encuentra entre 15–60%.^{4,5}

Staphylococcus aureus resistente a la Meticilina (SARM) posee resistencia a un amplio grupo de antibióticos, dando lugar a una alta morbilidad y mortalidad, no solo es resistente a los Beta-Lactámicos, sino también a Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas, Cloranfenicol y Macrólidos. La posibilidad de transmisión de SARM a través de los alimentos es desconocida hasta 1994, sin embargo, hoy se conoce que cuando algunas células de *Staphylococcus aureus* entran a un organismo inmuno competente, son destruidos por los jugos gástricos, pero en personas inmuno suprimidas si consumen una comida contaminada con esta bacteria puede pasar esta barrera y llegar al sistema circulatorio y causar infecciones graves que pueden evolucionar a una septicemia.⁶

La mayoría de los animales pueden ser colonizados por *Staphylococcus aureus*, se han reportado aislamientos de cepas de SARM de varios animales como cerdos, vacas, pollos y otros animales,^{7, 8, 9} especialmente se reportan caso de colonización por esta cepa de los cerdos, los agricultores y sus familiares. En los países bajos las personas que están en contacto con los cerdos es reconocido como un factor de riesgo para SARM¹⁰, se ha sugerido que existe una asociación entre la aparición de cepas de SARM en los cerdos y el uso de antibióticos en la agricultura.^{7, 11}

Durante el sacrificio de animales SARM-positivos, puede ocurrir una contaminación de los animales hacia las superficies y por consiguiente las canales pueden contaminarse.¹², la carne cruda puede contener SARM como resultado de la contaminación de las canales durante el sacrificio. Aunque el área nasal es considerado el principal sitio de la colonización con *Staphylococcus aureus*, estos organismos también están presentes en el tracto intestinal¹³. Durante el proceso de sacrificio las canales pueden contaminarse por el contenido del intestino o por contaminación del manipulador.

También se han encontrado cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes relacionadas con la industria alimenticia, se ha podido comprobar que colonizan predominantemente a personas que trabajan en la producción de alimentos de origen animal. Estudios han demostrado una alta prevalencia de *Staphylococcus aureus* multirresistentes en cerdos criados en la Unión Europea y Canadá.^{14, 15}

En un estudio realizado en abril del 2011 en EE.UU. en el que se analizaron 5136 muestras de carnes y aves de corral, se encontró que el 47% de las muestras estaban contaminadas con *Staphylococcus aureus*, el 52% de los aislados presentaron multirresistencia a los antibióticos, lo cual está relacionado con el amplio uso que tienen los antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal, donde a menudo se aplican como método de promoción y prevención de la enfermedad. También se evaluó en cinco ciudades la prevalencia y los perfiles de susceptibilidad de los antibióticos presentes en las carnes al por menor y aves de corral, encontrándose una alta prevalencia de múltiple resistencia a antibióticos de importancia clínica como Ciprofloxacina, Quinupristina/Dalfopristina, Clindamicina, Eritromicina, Oxacilina, y Daptomicina.¹⁶

En Bogotá Colombia se han realizado estudios en cual se informa de la presencia de casos de SARM-AC en pacientes sin ningún antecedente hospitalario.¹⁷ En otro estudio se identificaron 2308 aislados de *Staphylococcus aureus* provenientes de aislamientos ambulatorios, de los cuales 618 (26,8 %) eran *Staphylococcus aureus* Metilino resistente (SARM). Setenta y cuatro (3,2 %) de éstos, presentaban sensibilidad a todos los otros antibióticos (Eritromicina, Clindamicina), sugestivos de corresponder al fenotipo SARM-AC. Los datos de este estudio sugieren que los aislamientos de SARM-AC, pueden ser más común de lo que se piensa.¹⁸

En esta investigación se realizó cultivo para determinar la concentración de *Staphylococcus aureus* en carne molida de vaca y carne de cerdo que se comercializan en expendios de la Ciudad de Cartagena, las cepas compatibles con el microorganismo

de acuerdo con las características macroscópica fueron confirmadas mediante la técnica de PCR teniendo en cuenta el gen *NucA* que es específico para este microorganismo; se determinó la prevalencia del gen *MecA*, y del gen que codifica la toxina PVL presentes en SAMR-C, y el perfil de susceptibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de expendios que comercializan productos de origen cárnicos en la ciudad de Cartagena.

Capítulo 1: Caracterización microbiológica de *Staphylococcus aureus* aislado de carne molida de res y chuleta de cerdo.

Lersy López G¹, Hector Suarez M²

1.1 Resumen

Staphylococcus aureus es un microorganismo que posee características particulares de virulencia y resistencia a los antibióticos. En los humanos causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas. El principal impacto de este microorganismo se debe a las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Metilina (SAMR), que tradicionalmente se encontraban limitadas al ámbito hospitalario, produciendo infecciones nosocomiales a nivel mundial. Sin embargo, en años recientes las cepas SAMR han aparecido en ambientes no hospitalarios, provocando problemas de salud pública. La prevalencia de estas cepas en la comunidad se ha incrementado, lo que ha conllevado a la aparición de esta bacteria en personal no relacionado con el cuidado de la salud (manipuladores de alimentos, animales domésticos, equipos, utensilios). Si no se toman las medidas adecuadas para entender y controlar la cambiante epidemiología puede haber una diseminación de este patógeno en cualquier ambiente. Se realizó un estudio descriptivo para caracterizar *Staphylococcus aureus* presentes en alimentos de origen cárnico, se analizaron 160 muestras de carne molida de res y chuleta de cerdo de 40 expendios ubicados en las tres localidades de la ciudad de Cartagena (Histórica y del Caribe Norte (LH), Industrial de la Bahía (LI) y De la Virgen y Turística (LV). A través del cultivo microbiológico convencional se identificó *Staphylococcus aureus* en el 88% de las muestras, analizadas; mientras que la técnica de PCR confirmó la presencia de *Staphylococcus aureus* en el 100% de los análisis. En el 72% de los expendios analizados se obtuvo recuentos >100 UFC/g, el 27% presentaron recuentos <100 UFC/g. El *Staphylococcus aureus* se encontró en mayor porcentaje en la localidad Virgen y Turística (48,2%), seguido de la localidad Histórica y del Caribe Norte con un 34,4%. Conclusiones. El 32.5% de los expendios analizados están comercializando carne molida y chuleta de cerdo no apta para el consumo humano por presentar recuentos que sobrepasan los parámetros de referencia para *Staphylococcus aureus* en cárnicos crudos (100 – 1000 UFC/g).

Palabras Claves: SARM, inocuidad, bacteria, alimentos.

¹ Universidad del Sinú seccional Cartagena. Escuela Nutrición y Dietética. Grupo GIND.

² Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA.
Correspondencia: Héctor Suarez Mahecha: hsuarezm@unal.edu.co

1.2 Abstract

Staphylococcus aureus is a microorganism that has particular characteristics of virulence and antibiotic resistance. In humans it causes a wide variety of infectious diseases. The main impact of this organism is due to the strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA), which were traditionally limited to the hospital environment, causing nosocomial infections worldwide. However, in recent years MRSA strains have appeared in non-hospital environments, causing problems in public health problems. The prevalence of these strains in the community has increased, which has led to the emergence of this bacterium in people unrelated to health care (food handlers, pets, equipment, utensils). Failure to take appropriate steps to understand and control the changing epidemiology may be a transmission of these pathogens spread in any environment. A descriptive study was conducted to characterize *Staphylococcus aureus* present in meat-based foods, analyzed 160 samples of ground beef and pork 40 outlets located in three locations: ciudad de Cartagena (Historic y del Caribe Norte (LH), Industrial de la Bahía (LI) y De la virgin y Turistic (LV). Through conventional microbiological culture *Staphylococcus aureus* was identified in 88% of the samples analyzed, while PCR confirmed the presence of *Staphylococcus aureus* in 100% of the analyzes. In 72% of the outlets analyzed was obtained counts >100 CFU/g, 27% had counts <100 CFU/g. *Staphylococcus aureus* was found in a higher percentage in the town LV (48.2%), followed by LH with 34.4%. Conclusions: The 32.5% of analyzed are marketing outlets ground beef and pork meat unfit for human consumption submit counts that exceed benchmarks for *Staphylococcus aureus* in raw meat (100 - 1000 CFU / g).

Keywords: MRSA, safety, bacteria, food.

1.3 Introducción

Staphylococcus aureus, hace parte de la familia de los cocos Gram positivos y forma parte de la familia de las *Micrococcaceae*, el género más importante es *Staphylococcus*, el cual origina gran número de enfermedades y constituye uno de los agentes etiológicos que causan diversas patologías, entre las que se destacan infecciones de piel y tejidos blandos, bacteriemias, abscesos, septicemia, osteomielitis y neumonía, aunque este microorganismo suele ser parte de la flora normal humana, tiene un amplio espectro de enfermedades asociadas con elevada morbi-mortalidad, por sus cuadros infecciosos y ataque a órganos blanco. Se considera que por su actividad se encuentra relacionada con infecciones nosocomiales siendo este, un ambiente común, así como en la comunidad.¹

Staphylococcus aureus es una bacteria Mesófila aerobia facultativa capaz de crecer en amplios rangos de pH y A_w .² Es uno de los patógenos humanos asporógenos más resistente a condiciones ambientales adversas, logrando persistir a temperaturas de congelación y descongelación.³ Las concentraciones máximas de sal que permiten el crecimiento dependen de factores como: temperatura, pH, potencial redox, entre otros. Un millón de células de *Staphylococcus* por mililitro o gramo de alimentos se inactivan a una temperatura de 66°C durante 12 minutos o 60°C durante 78 - 83 minutos.²

Staphylococcus aureus puede producir toxiinfección alimentaria, en este sentido las bacterias se multiplican rápidamente en los alimentos y puede haber una gran colonia de bacterias sin que haya evidencia de descomposición del alimento. Los factores de riesgo están asociados a las siguientes condiciones: Ingestión de alimentos preparados por una persona con una infección en la piel, dado que estas infecciones comúnmente contienen *Staphylococcus aureus*, Ingestión de alimentos almacenados a temperatura ambiente, Ingestión de alimentos preparados en forma inadecuada.⁴

El principal factor de virulencia de *Staphylococcus spp* involucrado en la intoxicación alimentaria es la producción de Enterotoxinas termorresistentes, son polipéptidos antigénicos compactos no ramificados con un único puente disulfuro y se ha postulado que el sitio activo de la molécula se halla en la región de este puente. Tienen un peso molecular bajo (26.000-34.000 Da) y una estructura química muy similar entre ellas. *S. aureus* produce cinco toxinas típicas: SEA, SEB, SEC, SED y SEE las cuales producen emesis en primates.⁵

La contaminación de alimentos por *Staphylococcus aureus*, está asociada con una forma de gastroenteritis que se manifiesta clínicamente por un cuadro caracterizado por vómitos (76% de casos) y diarrea (77% de casos). El corto período de incubación de 1-6 horas orienta a la sospecha de enfermedad producida por ingestión de una o más Enterotoxinas preformadas en el alimento que ha sido contaminado con cepas de *Staphylococcus aureus*. Son raramente observados signos de toxicidad sistémica, como fiebre e hipotensión. En general, es un cuadro autolimitado que típicamente se resuelve en 24- 48 horas desde el inicio.¹

Es considerado que los alimentos se pueden contaminar con los jugos de las carnes de aves, res y cerdo.⁶ En Colombia, según la información registrada en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) durante el año 2009 se presentaron 899 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, de los cuales solo en el 56% se identificó agente el patógeno, según distribución por tipo de agente, el 18,4% corresponde a la presencia de *Staphylococcus* coagulasa positiva, tanto en alimentos (79%), como en muestras biológicas (12,7%) y superficies (8,5%); lo cual evidencia que es la primera causa de brotes de origen alimentario en el territorio nacional.⁷ El objetivo de esta investigación fue caracterizar el *Staphylococcus aureus* presente en alimentos de origen cárnico que se comercializan en la ciudad de Cartagena.

1.4 Materiales y Métodos.

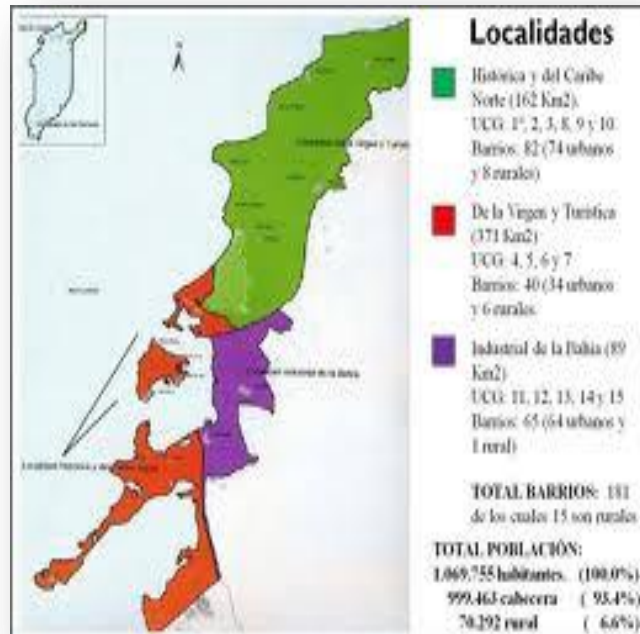
1.4.1 Toma de muestras

Se tomaron 160 muestras en 40 expendios distribuidos en las tres localidades de la Ciudad de Cartagena (Localidad Histórica y del Caribe, Industrial de la Bahía y de la Virgen y Turística). En la tabla. 1-1. se observa distribución de expendios analizados por Localidades y en la figura 1-1 se observa mapa de Cartagena.

Tabla 1-1. Distribución de expendios de carne de res y cerdo por localidades de la ciudad de Cartagena

LOCALIDADES	EXPENDIOS	PORCENTAJE
Histórica y del Caribe Norte.	19	47.5%
Industrial de la Bahía.	16	40.0%
De la Virgen y Turística.	5	12.5%

Figura 1-1. Mapa de las localidades de expendio de carnes en la Ciudad de Cartagena



Fuente: Alcaldía mayor de Cartagena de indias, Secretaria de planeación distrital.

Fue realizado un estudio descriptivo observacional, el criterio para la selección de los expendios fueron aquellos lugares donde se comercializaban los dos tipos de carne, los criterios estadísticos: varianza estimada en 0.19, de acuerdo con investigación preliminar; error del 5% y probabilidad mínima del 75%.

Los expendios (unidades de muestreo) fueron seleccionados aleatoriamente, en cada expendio se tomaron entre 100 - 300 g de los dos tipos de carne: carne molida de res y carne de chuleta de cerdo según criterio del investigador. La lectura de las muestras fue realizada con base a Norma Sanitaria RM 615-2003 Codex Alimentarium⁸, la cual establece como criterio de calidad aceptable para carnes picadas y molidas un rango de 100 –1000 UFC/g. La toma de muestra fue realizada desde el mes de julio de 2012 hasta el mes mayo de 2013, teniendo en cuenta las directrices establecidas en la Norma Técnica Colombiana NTC 4491-2.⁹

Los cultivos microbiológicos fueron realizados en el Laboratorio Ciencia de los Alimentos de la Universidad del Sinú EBZ Seccional Cartagena y las pruebas moleculares en el Laboratorio de Investigaciones de la Universidad de Cartagena.

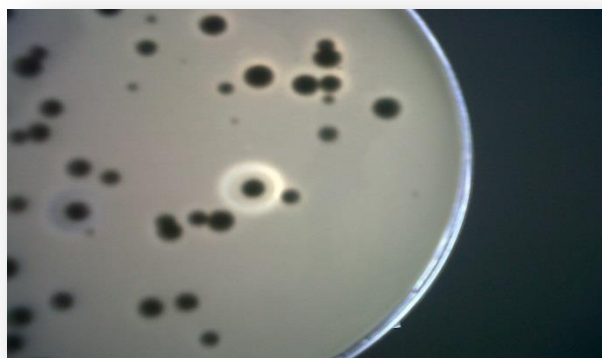
1.4.2 Cultivo.

La técnica utilizada para la realización del cultivo fue recuento en placa, en agar Baire Parcker (Merck) que se utiliza en la industria de alimentos para recuento de UFC/g de *Staphylococcus aureus*, fueron realizadas tres diluciones seriadas por muestras (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se sembraron cajas por duplicado de cada dilución, Los cultivos fueron incubados durante 48 horas a 35°C , según el Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para consumo humano del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA, 1998)¹⁰ y la Norma Técnica Colombiana NTC 4779.¹¹

1.4.3 Lectura e interpretación de resultados

Los cultivos fueron considerados presuntivos para crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuando se observaban colonias negras por la reducción de Telurito a Teluro que se adiciona al medio de cultivo, doble halo alrededor de la colonia por la presencia del fenómeno de lipólisis y proteólisis producidas por la acción de lipasas y proteasas presentes en este género microbiano como se observa en figura 1-2.¹

Figura 1-2. Crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus* en agar Baire Parcker (Merck)



Fue realizado conteo de las colonias y expresado en UFC/g. Las muestras en las cuales no fue observado crecimiento fueron reportadas como < 100 UFC/g. Se realizaron controles de especificidad y sensibilidad de los medios de cultivos con cepa ATCC 25923.

1.4.4 Extracción de ADN

El ADN genómico de cada aislamiento incluido en el estudio fue obtenido de acuerdo con el protocolo descrito por Bettin *et al.*, (2012).¹² Cada *Staphylococcus aureus* presuntivo fue cultivado en agar Plate Count (Merck) e incubado durante 24 horas a 37 °C. Cinco colonias fueron suspendidas en 1mL de Tris 0,5 M y centrifugado a 13.000 rpm x 5 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,5 mL de tampón TE (10 mL de Tris y 1 mL de EDTA, el pH fue mantenido en 8,0).

Se hirvió a 100°C durante 30 min, y luego se congeló a – 35°C durante 20 minutos, luego se descongeló a 65°C, y finalmente se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. El ADN bacteriano contenido en el sobrenadante se recogió en un tubo limpio y se almacenó a -20°C para la posterior amplificación del ADN por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR).

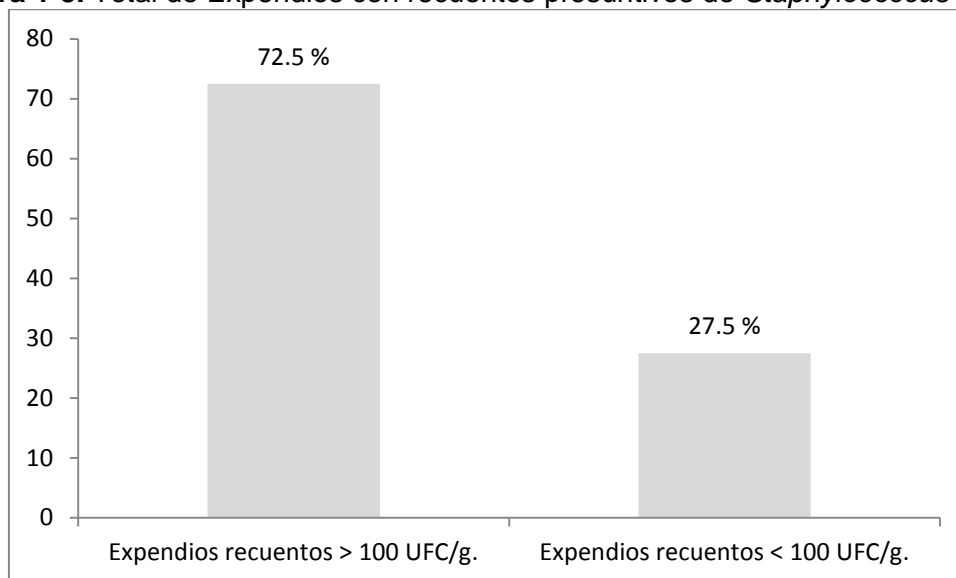
1.4.5 Ensayos de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR)

El ADN obtenido fue sometido a PCR para amplificar el gen de la Nucleasa termoestable (gen Nuc) específica del *Staphylococcus aureus*, se amplificó un fragmento de 300 pb del gen de acuerdo a lo descrito por Bettin *et al.*, (2012)¹². Se utilizaron como controles las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y ATCC 25923. El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega), 0.2 uM de cada cebador y 5uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Axigen bajo las siguientes condiciones de: ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Todos los productos fueron visualizados en Gel de agarosa al 1.5% con bromuro de Etidio (0.5 ug/mL), mediante un transiluminador de luz UV.

1.5 Resultados.

Se analizaron un total de 40 expendios de los cuales se tomaron 160 muestras, 80 muestras de carne molida de res y 80 muestras de carne de chuleta de cerdo. 76 (47,5%) muestras de la localidad Histórica y del Caribe Norte (LH), 64(40%) muestras de la localidad Industrial de la Bahía (LI) y 20 (12,5%) muestras de la Localidad Virgen y Turística (LV).

En la tabla 1-2 y figura 1-3 son presentados los resultados del análisis de expendios y recuentos de *Staphylococcus aureus*. De los 40 expendios analizados, en 29 locales (72.5%) se obtuvo recuentos >100 UFC/g presuntivo de *Staphylococcus aureus*, de acuerdo a características macroscópica del cultivo, en 11 expendios (27,5%) se obtuvo recuentos < 100 UFC/g.

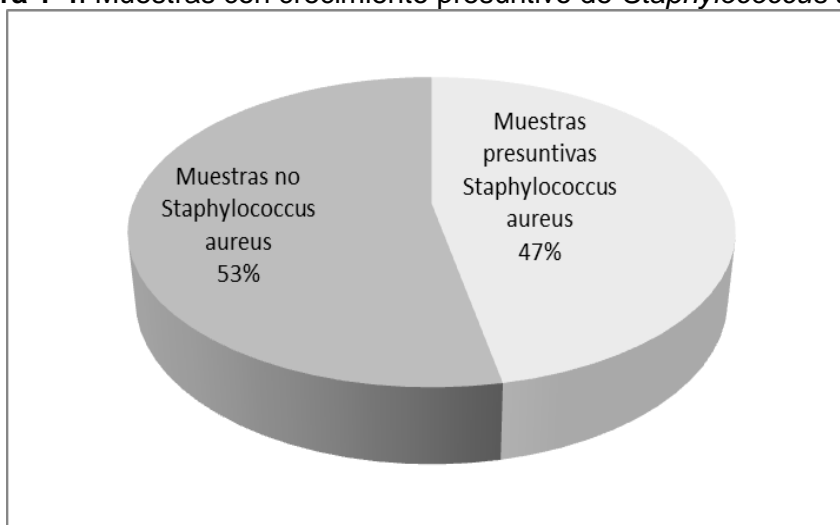
Figura 1-3. Total de Expendios con recuentos presuntivos de *Staphylococcus aureus*

De los 29 expendios en los cuales se obtuvo crecimiento, el mayor número de expendios contaminados correspondió a la localidad virgen y Turística (tabla 1-2).

Tabla 1-2 Muestras con crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus* distribuidos por localidades en la ciudad de Cartagena

	Localidad			Total expendios
	LH	LI	LV	
Numero expendios	10	14	5	29
Participación	34.4%	48.20%	12.4%	100%

En la **figura 1-4** es mostrado el crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus*. De los 40 expendios se analizaron mediante cultivo 160 muestras, encontrándose 47% de las muestras con recuentos mayores a 100 UFC/g y 53% de las muestras con recuentos menores a 100 UFC/g. Del 47% de muestras con crecimiento presuntivo para *Staphylococcus aureus*, corresponden a carne molida de res 59% y 49% a carne de chuleta de Cerdo.

Figura 1-4. Muestras con crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus*

En la **tabla 1-3** son presentados los resultados de los recuentos de colonias presuntivas de *Staphylococcus aureus* distribuidas por expendios. De los 29 expendios con crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus* se encontraron el 55% de expendios con recuentos entre 100 -1000 UFC/g y el 45% de expendios con recuentos >1000 UFC/g, de las cuales el 69% de las muestras se encuentran dentro de los parámetros de referencia (100–1000 UFC/g) y el 31% de las muestras presentaron recuentos superiores a los establecidos en la Norma Sanitaria RM615-2003 Codex Alimentarius.⁸ De las cuales el 57% de las muestras fueron tomadas en la localidad Industrial de la Bahía (LI).

Tabla 1-3. Recuentos de colonias presuntivas de *Staphylococcus aureus* distribuidas por expendios

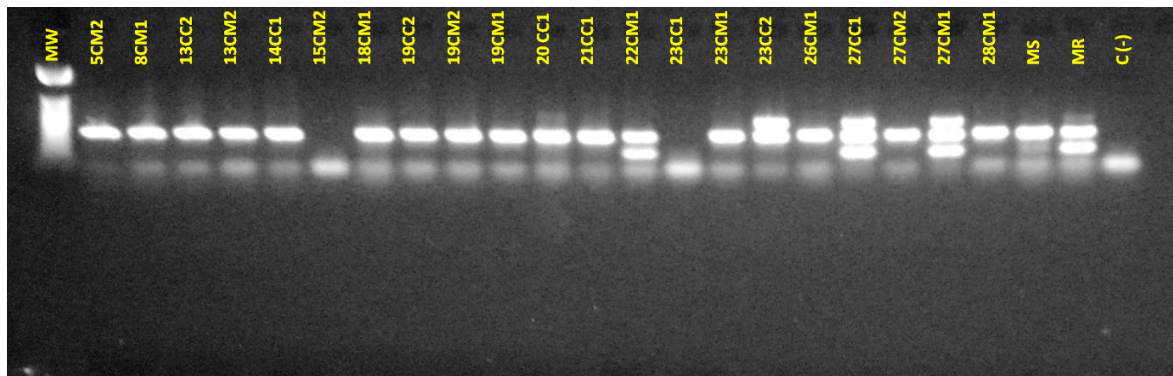
RECUEENTOS	EXPENDIOS	%	MUESTRAS	%
100 – 1000 UFC/g	16	55	52	69
> 1000 UFC/g	13	45	23	31

En la figura 1-5 son presentados los resultados del análisis por electroforesis de PCR realizada a bacteria aislada de muestras de carne de chuleta de cerdo y carne molida de Res. Las 75 muestras con crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus* fueron verificadas por la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR), mediante la determinación del gen Nuc que codifica la enzima Nucleasa termoestable específica de *Staphylococcus aureus*, se confirmaron un total de 88% de cepas, el 56% de las cepas fueron aisladas de carne molida de Res y el 44% de las cepas de carne de chuleta de cerdo.

El 12% de los aislados no corresponden a *Staphylococcus aureus*, pertenecen a las muestras identificadas con los códigos: 9CM2, 11CC1, 15CM2, 23CM1, 23CC1, 24CC1, 30CM1, 53CM1 y 55CM1. En dos de estas cepas (23CM1 y 24CC1) se obtuvo recuentos > 1000 UFC/g y se encontró la presencia del gen Meca que codifica las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a Metilina (SARM). En la figura 3 se observa resultado de la electroforesis de dos de las muestras 15 CM2 y 23CC1, en las cuales se

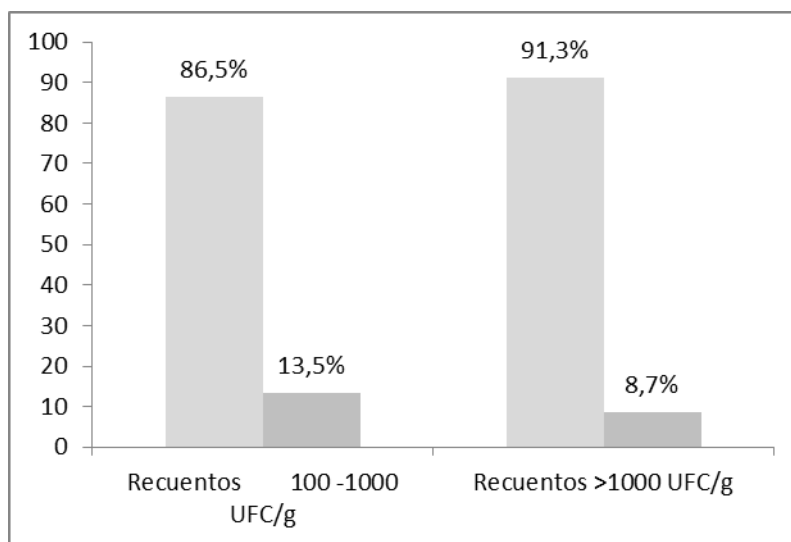
observa la ausencia del gen Nuc que codifica la enzima Nucleasa Termoestable específica de *Staphylococcus aureus*.

Figura 1-5. Electroforesis de PCR. Presencia del Gen Nuc en bacteria aislada de muestras de carne de chuleta de cerdo y carne molida de res.



En el figura 1-6 son presentados los resultados de las cepas de *Staphylococcus aureus* confirmadas por la técnica de PCR. De los 16 expendios en los cuales se obtuvo 52 muestras con recuentos entre 100–1000 UFC/g, el 86,5% de cepas se confirmaron como *Staphylococcus aureus* por la técnica de PCR y el 13,5% cepas fueron identificadas como no *Staphylococcus aureus*. De los 13 expendios en los cuales se obtuvo 23 muestras con recuentos >1000 UFC/g, el 91,3% de cepas se confirmaron como *Staphylococcus aureus* por PCR, y el 8,7% no son *Staphylococcus aureus*. De estas el 76% provenían de carne molida de Res y el 24% de chuleta de cerdo.

Figura 1-6. Cepas de *Staphylococcus aureus* confirmadas por la técnica de PCR



1.6 Discusión.

La presencia de *Staphylococcus aureus* en los alimentos de origen cárnico en concentraciones elevadas podrían tener un impacto sobre la salud de los consumidores, porque pueden presentar infecciones graves por este microorganismo ya que los productos cárnicos son ampliamente consumidos en el país, en un estudio sectorial de carne bovina en Colombia de la superintendencia de Industria y Comercio (2009 – 2011)¹³, se observa un incremento en el 2010 en el consumo de carne bovina de 18,8 kg por habitantes por año, frente a un 17,3% entre los años 2004 -2008 FEDEGAN (2012).¹⁴ La Asociación Nacional de Industriales (ANDI) indica que el consumo de carne de res es de 18 kg y el de cerdo, es de 4,1kg por persona DANE (2011).¹⁵

Nuestros resultados se correlacionan con un estudio realizado en Iowa E.U. en 2011, en el que se analizaron muestras de carne cruda de cerdo, pollo, carne de res y pavo de 22 expendios de alimentos. En el estudio fueron aisladas 27 cepas de *Staphylococcus aureus* de 165 muestras, dando una prevalencia general del 16,4%. En las carnes de pavo, cerdo, pollo y carne de res individuales se encontró una prevalencia de *Staphylococcus aureus* de 19,4%, 18,2%, 17,8% y 6,9%, respectivamente.¹⁶

En Colombia el Instituto Nacional de Salud INS con base en información suministrada por once direcciones territoriales de salud de Colombia (DTS) para los años 2007 a 2010, se encontró que de un total de 6.113 alimentos, estaban contaminados con *Staphylococcus coagulasa positiva*, 2.779 (45,46%) que corresponden al grupo de alimentos preparados no industriales. De estos últimos, 2.672 (96,15%) reportaron recuento menor de 100 UFC/g y 107 (3,85%) mayor de 100 UFC/g. Este estudio recomienda la implementación adecuada de programas de limpieza, desinfección y capacitación de los manipuladores, como estrategia de prevención de la contaminación, contaminación cruzada y recontaminación.¹⁷

Según información registrada en el Sistema de Vigilancia en Salud Pública en Colombia (SIVIGILA) durante el año 2009 se presentaron 899 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Según distribución por tipo de agente, el 18,4% corresponde a la presencia de *Staphylococcus coagulasa positiva*, tanto en alimentos (79%), como en muestras biológicas (12,7%) y superficies (8,5%); lo cual evidencia que es la primera causa de brotes de origen alimentario en el territorio nacional.¹⁸

Con relación a las técnicas utilizadas en la investigación podemos decir que la técnica de PCR se constituye en una herramienta importante en la identificación de *Staphylococcus aureus* en alimentos ya que los resultados se obtienen de forma rápida, específica y sensible, esto ha sido ampliamente reconocido en otras investigaciones.¹²

1.7 Conclusión

El 32.5% de los expendios de la ciudad de Cartagena incluidos en este estudio están comercializando carne molida de res y carne de chuleta de cerdo no apta para el consumo humano por presentar recuentos de *Staphylococcus aureus* >1000 UFC/g, los cuales sobrepasan los parámetros de referencia para productos cárnicos crudos (100-1000 UFC/g) establecidos en la Norma Sanitaria RM615-2013 Codex Alimentarius. La prevalencia del *Staphylococcus aureus* en las muestras analizadas que no cumplieron con los parámetros de referencia es del 13%. El 76% de las muestras de carne molida de res y el 24% de chuleta de cerdo presentaron recuentos > 1000 UFC/g). La localidad en la cual se obtuvo recuentos superiores a lo establecido en la norma se encuentra el 33% de los barrios de la Ciudad de Cartagena, el cual concentra población de estratos 2, 3 y 4. El cultivo microbiano para *Staphylococcus aureus* presentó una sensibilidad del 88% frente al 100% de la técnica de PCR.

1.8 Bibliografía

1. Murray Patrick R, Pfaller Michael A (2007) Microbiología médica. 5a ed. Últ. Reimpr. Elsevier España. Pg 221-236.
2. Jay JA, Loessner MJ, Golden DA (2005) Intrinsic and extrinsic parameters of foods that affect microbial growth. In: Heldman DR (ed) Modern Food Microbiology. Springer Science, New York, pp. 39-59.
3. FSAI. (The Food Safety Authority of Ireland). *Staphylococcus aureus*. http://www.fsai.ie/publications/factsheet/factsheet_Staphylococcus_aureus%20.pdf f. Fecha de consulta 19/10/10.
4. Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C, Petit L, Chesneau O, Brisabois A, De Buyser ML. (2007) Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol* 115(3):369-75.
5. Ono H, Omoe K, Imanishi K, Iwakabe Y, Hu D, Kato I, Saito N, Nakane A, Uchiyama T, Shinagawa K. (2008) Identification and Characterization of Two Novel *Staphylococcal* Enterotoxins, Types S and T. *Infect Immun*; 76 (11):4999–5005.
6. Kenneth M. Wener, MD (2007) Department of Infectious Diseases. Lahey Clinic, Burlington, MA. Review provided by Veri Med Healthcare Network.
7. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. SIVIGILA (2007 – 2010). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Bogotá. Disponible <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/MANUAL%20DEL%20SUARIO%20SIVIGILA%202010.pdf>.
8. Norma sanitaria que establece los criterios Microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. RM N° 615-2003 SA/DM. Codex Alimentarius.
9. Instituto Colombiano de Norma Técnica. ICONTEC. (2004) NTC 4491-2, Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensiones iniciales y diluciones decimales para los análisis microbiológicos. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.
10. Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para Consumo Humano. (1998) Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos INVIMA. Bogotá Colombia.
11. Instituto Colombiano Norma Técnica. ICONTEC. (2007) NTC 4779. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de Estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies).
12. Bettin A, Causil C, Reyes N, (2012) Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *Braz J Infect Dis*. 16(4):329-34.
13. Estudio sectorial Carne Bovina en Colombia (2009 – 2011) Superintendencia de Industria y Comercio http://www.sic.gov.co/recursos_user/documentos/publicaciones/pdf/Carne2012.pdf f.
14. Federación Colombiana de Ganaderos FEDEGAN (2012). Estadísticas Archivo de datos. Disponible en: http://portal.fedegan.org.co/portal/page?_pageid=93,158487&_dad=portal&_schema=PORTAL.

15. DANE Departamento Administrativo Nacional de Estadística. (2011). Resultados Encuesta Nacional Agropecuaria. Bogotá: Disponible en: http://www.agronet.gov.co/www/htm3b/public/ENA/ENA_2011.pdf.
16. Hanson B., Dressler A., Harper A., Scheibel R., Wardyn S., Roberts L., Kroeger J., Smith T (2011) Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health* 4: 169—174.
17. Instituto Nacional de Salud INS (2011), Evaluación de riesgos de *Staphylococcus aureus* Enterotoxigénico en alimentos preparados no industriales en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA. Bogotá D.C. Disponible: <http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/investigacion/ueria/Publicaciones/ER%20STAPHYLOCOCCUS.pdf>.
18. SIVIGILA Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública. (2007 – 2010). Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Bogotá. Disponible <http://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/MANUAL%20DEL%20SUARIO%20SIVIGILA%202010.pdf>.

Capítulo 2: Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en expendios comerciales de Cartagena

Lersy López G¹, Alfonso Bettin M¹, Hector Suarez M²

2.1 Resumen

El *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (SARM) es un patógeno oportunista que forma parte de la microflora humana, colonizando en un 30 % y 50% de la población humana, siendo la colonización más frecuente en fosas nasales y piel. También se pueden aislar de animales, según investigaciones realizadas la mayoría de los animales pueden ser colonizados por *Staphylococcus aureus*, y reportan aislamientos de cepas de SARM de varios animales como cerdos, bovinos, pollos y otros animales. Se realizó un estudio descriptivo para determinar la prevalencia de SARM en 40 expendios que comercializan carne molida de res y carne de cerdo, fueron analizadas 160 muestras a través de cultivo microbiológico en agar Baire Parcker (Merck), los aislados con características macroscópicas presuntivas del género *Staphylococcus aureus* fueron confirmadas por la técnica de PCR, a estas cepas fue realizada la identificación del gen *mecA* que codifica las cepas Meticilino resistentes. Fueron confirmadas como *Staphylococcus aureus* a través de la técnica de PCR un total de (88%) de cepas, se identificaron 18% de cepas SARM y 82% de cepas SASM. **Conclusión:** fueron encontrados 10 expendios con una prevalencia de *Staphylococcus aureus* SARM, el gen *MecA* se encuentra en el 18% de las cepas de *Staphylococcus aureus*, se encuentra en mayor porcentaje en carne molida de res en un 66%.

Palabras claves: SARM, SASM, PCR, carne, bacterias, ETAs.

2.2 Abstract

Staphylococcus aureus Methicillin resistant (MRSA) is an opportunistic pathogen that is part of human microflora, colonizing by 30% and 50% of the human population, being the most common colonization nostrils and skin. Also can be isolated from animals, according to research most *Staphylococcus aureus* animals can be colonized by *Staphylococcus aureus* isolates reported MRSA strains of various animals such as pigs, cattle, chickens and other animals. A descriptive study was conducted to determine the prevalence of MRSA in 40 outlets that sell ground beef and pork, 160 samples were analyzed by microbiological culture Parcker Baire Agar (Merck), isolates with presumptive macroscopic characteristics of the genus *Staphylococcus aureus* were confirmed by PCR, these strain underwent mecA search encoding methicillin resistant strains. Were confirmed by the PCR technique a total of 66 (88%) strains identified 18% of MRSA strains and 82% of MSSA strains. Conclusion: We obtained 10 outlets with a prevalence of *Staphylococcus aureus* MRSA MecA gene found in 18% of strains of *Staphylococcus aureus* and MecA gene is found in greater proportion in ground beef by 66%.

Keywords: MRSA, MSSA, PCR, Meat, Bacteria, ETAs

2.3 Introducción

Desde su aislamiento en 1961 hasta la fecha *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (SAMR) ha sido considerado como uno de los principales patógenos nosocomiales en todo el mundo; sin embargo, en las dos últimas décadas el panorama de las infecciones por esta bacteria se ha tornado más complejo debido a la emergencia y diseminación de cepas de origen comunitario (CA) que se conocen con la sigla SARM-CA.¹ Estas cepas difieren de las hospitalarias tradicionales no solo en el comportamiento epidemiológico sino también en la susceptibilidad a antibióticos y virulencia.²

Las cepas de SAMR-CA se han mostrado como más virulentas y han ocasionado brotes graves en comunidades cerradas como grupos familiares, militares, recluso, niño en guarderías y deportistas.³ La mayoría de estas cepas producen una toxina Pantón-Valentine Leucocidina (PVL), que se ha asociado con el agravamiento de la enfermedad en adultos, jóvenes y niños; y contienen además los tipos IV y V del casete cromosómico *MecA* (SCC*mec*), que por ser pequeños se pueden diseminar con mayor facilidad.^{4, 5}

Por otro lado, la importancia del *Staphylococcus aureus*, en especial de las cepas SARM, radica en la capacidad de producir colonizaciones intermitentes (niños, 10-40 % y adultos 30 %); siendo el sitio más común, la cavidad nasal, las cuales pueden progresar a infecciones con distintos grados de severidad.⁶

El gen *mecA* es un trozo de ADN de un tamaño aprox. de 2 Kb que posee dos elementos reguladores (*mecR1- mecI*) que controlan la transcripción del gen el cual se encuentra ubicado en un elemento genético denominado SCC*mec* y que varía de acuerdo a su comportamiento tanto en el hospital como en la comunidad. Este gen está encargado de codificar una proteína la cual es modificada (proteína fijadora de penicilina PBP2a o 2') el cual confiere al microorganismo resistencia a la metilina. La PBP2a es capaz de mantener la integridad de la pared bacteriana durante el crecimiento y la división celular, cuando las PBPs son inhibidas por los antibióticos β -Lactámicos impidiendo que el antibiótico pueda unirse al lugar donde va a ejercer la acción la enzima transpeptidasa, cuya función es sintetizar la pared bacteriana.⁷

La resistencia a Meticilina se codifica en el gen *mecA* que se almacena y transmite en el *cassette* del cromosoma *mec* (SSC *mec*). Este vehículo puede llevar adicionalmente otros genes como el gen Tn554, que confiere resistencia a Macrólidos, Clindamicina y Estreptograminas, y el gen pT181, que confiere resistencia a Tetraciclinas. El mismo SSC *mec* puede transportar genes de virulencia como el Luk F o Luk-SV, que codifican la PVL, los genes para la Enterotoxina B y C y la toxina de shock tóxico.^{8, 9}

Con relación a las cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes relacionadas con la industria alimenticia se ha podido comprobar que coloniza predominantemente a personas que trabajan en la producción de alimentos de origen animal, se han reportado casos en los países bajos de Europa.¹⁰ Estudios han demostrado la alta prevalencia de *Staphylococcus aureus* multirresistentes en cerdos criados en la Unión Europea y Canadá.^{11, 12}

En Bogotá, Colombia se han realizado estudios en cuales se han informado de la presencia de casos de SARM-AC en pacientes sin ningún antecedente hospitalario.¹³ Otro estudio en la misma ciudad mostro que el 26,8% eran *Staphylococcus aureus* Meticilino resistente (SARM).¹⁴

Durante el sacrificio de animales SARM-positivos, puede ocurrir una contaminación de los animales hacia las superficies y por consiguiente las canales pueden contaminarse.¹⁵ La carne cruda puede contener SARM como resultado de la contaminación de las canales durante el sacrificio, aunque el área nasal es considerado el principal sitio de la colonización con *Staphylococcus aureus*, estos organismos también están presentes en el tracto intestinal.¹⁶

Se ha identificado cepas de SARM en cerdos en Francia, los Países Bajos, Dinamarca y Singapur^{17, 18, 19, 20}, la exposición a los cerdos ha sido identificado como un factor de riesgo significativo para la colonización de SARM hacia los seres humanos.^{21, 22} Informes recientes han documentado la transmisión de SARM aparente entre los cerdos, los criadores de cerdos y sus familiares.^{17, 23} Por lo tanto, es probable que el personal que trabaja con los cerdos este en mayor riesgo de colonización por SARM en comparación con la población canadiense general, como se ha informado en los Países Bajos.¹⁷ Además de los riesgos de salud pública para el personal de manipula cerdos, un informe reciente implica al SARM como agente causal de dermatitis exudativa en los cerdos.²⁴

En abril del 2011 en EE.UU. se analizaron 5136 muestras de carnes y aves de corral, encontrándose que el 47% de las muestras estaban contaminadas con *Staphylococcus aureus*, el 52% de los aislados presentaron multirresistencia a los antibióticos, lo cual está relacionado con el amplio uso que tienen los antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal, donde a menudo se aplican como método de promoción y prevención de la enfermedad.²⁵ En este estudio también se evaluó en cinco ciudades de EE.UU. La prevalencia y los perfiles de susceptibilidad de los antibióticos presentes en las carnes al por menor y aves de corral, encontrándose una alta prevalencia de múltiple resistencia a antibióticos de importancia clínica como Ciprofloxacina, Quinupristina/Dalfopristina, Clindamicina, Eritromicina, Oxacilina, y Daptomicina.²⁶

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Toma de Muestra

En este estudio de tipo descriptivo observacional fueron analizados 40 expendios distribuidos en tres localidades de la Ciudad de Cartagena: 19(47,5%) en la Localidad Histórica y del Caribe; 16 (40%) en la localidad Industrial de la Bahía; y 5(12,5%) en la localidad Virgen y Turística; donde el criterio estadístico para la selección de expendios que comercializaban los dos tipos de carne fue: varianza estimada en 0.19, de acuerdo con investigación preliminar; error del 5% y probabilidad mínima del 75%. Los expendios (unidades de muestreo) fueron seleccionados aleatoriamente, en cada expendio fueron tomadas entre 100 - 300 g de los dos tipos de carne: carne molida de res y carne de chuleta de cerdo. En cada unidad de muestreo, fueron tomadas muestras por duplicado. La lectura de las muestras fue realizada con base a Norma Sanitaria RM 615-2003 Codex Alimentariun,²⁷ la cual establece como criterio de calidad aceptable para carnes picadas y molidas un rango de 100 –1000 UFC/g. La toma de muestra fue realizada desde el mes de julio de 2012 hasta el mes mayo de 2013, teniendo en cuenta las directrices establecidas en la Norma Técnica Colombiana NTC 4491-2.²⁸

2.4.2 Análisis microbiológico.

Las muestras para el análisis fueron debidamente rotuladas, refrigeradas a 4 °C y transportadas para el procesamiento al laboratorio de Ciencia de los Alimentos de la Universidad del Sinú EBZ seccional Cartagena. Fue realizado cultivo microbiológico para recuento de *Staphylococcus aureus* mediante la técnica de recuento en placa, en agar Baire Parcker (Merck), el procedimiento consistió en realizar tres diluciones seriadas por muestras (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), se sembraron en cajas por duplicado de cada dilución, luego las cajas fueron incubados durante 48 horas a 35°C, según el manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA, 1998)²⁹ y la Norma Técnica Colombiana NTC 4779.³⁰

Los cultivos fueron considerados presuntivos para crecimiento de *Staphylococcus aureus* cuando se observaban colonias negras por la reducción de Telurito a Teluro que es adicionado al medio de cultivo, doble halo alrededor de la colonia por la presencia del fenómeno de lipólisis y proteólisis producidas por la acción de lipasas y proteasas presentes en este género bacteriano.³¹ Los cultivos con crecimiento presuntivo de *Staphylococcus aureus* fueron confirmados con métodos microbiológicos de rutina. Fue realizado conteo de colonias y expresado en UFC/g. Las muestras en las cuales no fue observado crecimiento fueron reportadas como < 100 UFC/g, se realizaron controles de especificidad y sensibilidad de los medios de cultivos con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.4.3 Identificación molecular

El ADN genómico de cada aislamiento fue obtenido de acuerdo con el protocolo descrito por Bettin *et al.*, (2012).³² Cada *Staphylococcus aureus* presuntivo fue cultivado en agar

Plate Count (Merck) e incubado durante 24 horas a 37 °C. Cinco colonias fueron suspendidas en 1mL de Tris 0,5 M y centrifugado a 13.000 rpm x 5 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 0,5 mL de tampón TE (10 mL de Tris y 1 mL de EDTA, el pH fue mantenido en 8,0) y sometido a 100°C durante 30 min, posteriormente fue congelado a -35°C durante 20 minutos, después se descongeló a 65°C, y finalmente se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 min. El ADN bacteriano contenido en el sobrenadante se recogió en un tubo limpio y se almacenó a -20°C para la posterior amplificación del ADN segunda etapa de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa multiplex (PCR).

2.4.4 Ensayos de PCR

Los *Staphylococcus aureus* aislados por métodos microbiológicos fueron sometidos ensayos de reacción en cadena de la polimerasa multiplex PCR para evaluar la presencia gen Nuc Nuc1F - Nuc2R que amplifica un fragmento de 300 pb del gen Nuc que codifica la enzima Nucleasa Termoestable, mecA (determinante de resistencia a la Meticilina), conjunto de tres pares de cebadores: MecA1F - MecA2R que amplifica un Fragmento de 147 pb del gen mecA. Se utilizaron como controles cepas ATCC 33591 (mecA +; Nuc +) y ATCC 25923 (mecA -; Nuc).

2.5 Resultados

Se analizaron un total de 40 expendios de los cuales se tomaron 160 muestras, 80 muestras de carne molida de res y 80 muestras de carne de chuleta de cerdo. 76 (47,5%) muestras de la localidad Histórica y del Caribe Norte (LH), 64(40%) muestras de la localidad Industrial de la Bahía (LI) y 20 (12,5%) muestras de la Localidad Virgen y Turística (LV).

Los resultados del análisis de prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* SARM y SASM son presentados en la tabla 2-1. De las 160 muestras analizadas en setenta y cinco muestras (46%) se obtuvo recuentos >100 UFC/g presuntivas de *Staphylococcus aureus*, en ochenta y cinco (54%) muestras se obtuvo crecimiento microbiano <100 UFC/g. Se encontraron cincuenta y dos (65%) muestras con recuentos entre 100–1000 UFC/g y veintitrés (35%) muestras con recuentos >1000 UFC/g superiores a lo permitido Norma sanitaria RM615-2003 Codex Alimentarius.²⁷

Las 52 muestras con recuentos entre 100–1000 UFC/g se confirmaron por PCR, se identificaron cuarenta y cinco (86%) cepas como *Staphylococcus aureus* y siete (14%) cepas como no *Staphylococcus aureus*. De las 23 muestras con recuentos > 1000 UFC/g veintiuno (91%) fueron confirmadas como *Staphylococcus aureus* y dos (9%) como no *Staphylococcus aureus*.

En la figura 2-1 son mostrados los resultados de electroforesis para la presencia del gen MecA en las muestras 24CM2 y 55CC1. Se identificaron de las 45 muestras, diez (22%)

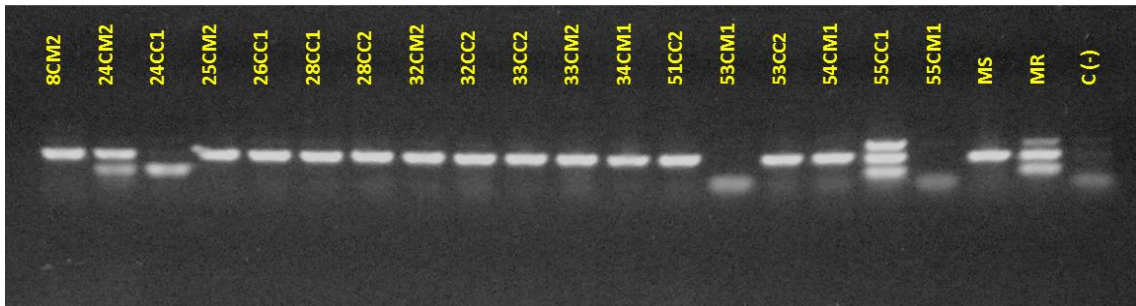
cepas con el gen *MecA* que codifica SARM y treinta y cinco (78%) cepas SASM. De las 21 muestras con recuentos > 1000 UFC/g, se aislaron dos (8.3%) cepas SARM y diecinueve (91.7%) SASM.

El total de cepas de *Staphylococcus aureus* con el gen *MecA* son doce (18%), ocho (66%) corresponden a carne molida de res y cuatro (34%) a carne de chuleta de cerdo.

Tabla 2-1. Prevalencia de cepas de *Staphylococcus aureus* SARM y SASM

RECUENTOS	N° MUESTRAS	SARM	SASM
100 – 1000 UFC/gr.	45	10 (22%)	35 (35%)
>1000 UFC/gr.	21	2 (8,3%)	19 (92%)
TOTAL	66	12 (18%)	54 (82%)

Figura 2-1. Resultados de Electroforesis presencia del gen *MecA* en las muestras 24CM2 y 55CC1.



En la tabla 2-2 son presentados las localidades con cepas de *Staphylococcus aureus* SAMR. Se detectaron 10 expendios en los cuales se encontró el gen *MecA*, cuatro (40%) en la localidad Virgen y Turística, cuatro (40%) en la Localidad Industrial de la Bahía y dos (20%) en la localidad Histórica y del Caribe.

Tabla 2-2. Localidades con cepas de *Staphylococcus aureus* SAMR

LOCALIDADES	EXPENDIOS SAMR	PORCENTAJE
Histórica y del Caribe Norte (LH)	2	20%
Industrial de la Bahía (LI)	4	40%
De la Virgen y Turística (LV)	4	40%

2.6 Discusión

La aparición de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la Meticilina en la comunidad, las cuales presentan características diferentes a las cepas SARM de origen hospitalario, ha provocado una alerta entre los centros y organizaciones de salud dedicados al estudio y control de este microorganismo. Las infecciones por SARM – CA son un problema emergente en muchas partes del mundo. Su dimensión adecuada aún no se conoce, el cambio epidemiológico, manifestación clínica y control pueden convertirse en un significativo problema de salud pública en un futuro cercano. Se requiere establecer medidas sanitarias para controlar la reemergencia de este agente patógeno y, de ser posible, eliminarlo a tiempo para evitar que se convierta en una grave amenaza para la comunidad.

La mayoría de los animales pueden ser colonizados por *Staphylococcus aureus*, otras investigaciones también reportan aislamientos de cepas de SARM de varios animales como cerdos, vacas, pollos y otros animales,^{19, 23, 33} especialmente se reportan caso de colonización por esta cepa de los cerdos, los agricultores y sus familiares. En los países bajos las personas que están en contacto con los cerdos es reconocido como un factor de riesgo para SARM,²⁴ se ha sugerido que existe una asociación entre la aparición de cepas de SARM en los cerdos y el uso de antibióticos en la agricultura.^{19, 34}

Es de gran importancia el hallazgo SARM en los alimentos de origen cárnico que se comercializan en la ciudad de Cartagena debido a que este microorganismo ha cobrado gran importancia en el mundo en la última década por el aumento en virulencia y por ende en la patogenicidad. Tras la identificación y aparición de nuevos casos en distintos lugares geográficos ha sido confirmada las implicaciones en salud pública tanto en países desarrollados como en vía de desarrollo.^{35, 36, 13}

Diversos estudios muestran la prevalencia de SARM en carne cruda,^{15, 37} coincidiendo con nuestros resultados. La presencia de esta cepa en los alimentos puede deberse a contaminación de las canales durante el sacrificio.¹⁵ o por deficiencia en las prácticas higiénicas del manipulador, ya que el área nasal es considerado el principal sitio de la colonización con *Staphylococcus aureus*, estos organismos también están presentes en el tracto intestinal.¹⁶

2.7 Conclusiones

El 25% de los expendios analizados presentan prevalencia para *Staphylococcus aureus* SARM.

El gen *MecA* que codifica SARM se encuentra en el 18% de las cepas confirmadas como *Staphylococcus aureus*, el 82% de las cepas aisladas fueron identificadas como SARM.

El tipo de carne analizado en el cual se obtuvo en mayor porcentaje el gen *MecA* fue Carne Molida de res con 66%.

Los *Staphylococcus aureus* SARM se encuentran distribuidos en las tres localidades de la ciudad de Cartagena, 40% en la localidad Virgen y Turística, 40% en la localidad Industrial de la Bahía y 20% en la localidad Histórica y del Caribe.

2.8 Bibliografía

1. Bustos Martínez Jaime A, Aída Hamdan-Partida, Marcia Gutiérrez Cárdenas. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Depto. de Atención a la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Calzada del Hueso 1100. Col. Villa Quietud, C.P. 04960. México, D.F., México Rev Biomed; 17:287-305.
2. Zetola N, Francis J, Nuermberger E, Bishai W. (2005). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis*; 5: 275-286.
3. Ho P, Cheung C, Mak G, Tse C, Ng T, Cheung C. (2001). Molecular epidemiology and household transmission of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Hong Kong. *Deign Microbial Infect Dis*; 57: 145-151. *Infect Dis*. 2001 2001;7: 178-182.
4. McClure J, Conly J, Lau V, Elsayed S, Louie T, Hutchins W, et al. (2006). Novel Multiplex PCR assay for detection of the *Staphylococcal* virulence marker Pantone-Valentine leukocidin genes and simultaneous discrimination of methicillin-susceptible from-resistant *Staphylococci*. *J Clin Microbiol*; 44: 1141-1144.
5. Hiramatsu K, Cuil L, Kuroda M, Ito T (2001). The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 486-493.
6. Safdar N Bradley E. (2008). The Risk of Infection after Nasal Colonization with *Staphylococcus aureus*. *The American Journal of Medicine*; 121 (4):132-8.
7. Salmelina S, Lytllkainee O, Vuoplo-varklla J. (2002). Community-Acquired ethicillin - Resistant *Staphylococcus aureus*, Finland. *Emerg Infect Dis*; 6: 602-7.
8. Karska Barbara - Wysockib, Mari Bazona, Wanda Smora giewiczza. (2010). Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiological Research* 165; 674—686.
9. Zuo, G.Y.; Wang, G.C.; Zhao, Y.B.; Xu, G.L.; Hao, X.Y.; Han, J.; Zhao, O. (2008). Screening of Chinese medicinal plants for inhibition against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Ethnopharmacol*. 120 (2):287-90.
10. Van Loo I, Huijsdens X, Tiemersma E, et al., (2007). Emergence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg Infect Dis*; 13:1834–9.
11. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. (2008). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol*; 128:298–303.
12. Smith TC, Pearson N.(2010). The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. *Vector Borne Zoonotic Dis* [Epub ahead of print]. doi:10.1089/vbz.2010.007.
13. Álvarez CA, Barrientes OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincon S, et al. (2006). Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. *Emerg Infect Dis*. (12):2000-1.
14. Cortes Jorge Alberto, Carlos Andrés Gómez, Sonia Isabel Cuervo, Aura Lucía Leal y GREBO (2007). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogotá, Colombia: Public Health implications. *Rev. Salud pública*. 9 (3):448-454.

15. Boer de E, J.T.M. Zwartkruis- Nahuis, B. Wit , X.W. Huijsdens, A.J. de Neeling, T. Bosch, R.A.A. van Oosterom, A. Vila, A.E. Heuvelink. (2009). Prevalence of Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in meat. International Journal of Food Microbiology 134; 52–56.
16. Bhalla, A., Aron, D.C., Donskey, C.J. (2007). *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of S. aureus on skin of hospitalized patients. BMC Infectious Diseases 7, 105.
17. Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C., Wulf, M., (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerg. Infect. Dis. 11, 1965–1966.
18. Guardabassi, L., Stegger, M., Skov, R., (2007). Retrospective detection of methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 in Danish Slaughter pigs. Vet. Microbiol. 122, 384–386.
19. De Neeling, A.J., van den Broek, M.J.M., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D.C., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W. (2007). High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Veterinary Microbiology 122, 366–372.
20. Sergio, D.M.B., Koh, T.H., Hsu, L., Ogden, B.E., Goh, A.L.H., Chow, P.K.H. (2007). Investigation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs used for research. J. Med. Microbiol. 56, 1107–1109.
21. Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E., Beaujean, D.J.M.A. (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig breeders and cattle breeders. Ned. Tijdschr. Geneesk. 150, 1710–1712.
22. Rijen, M.V., Keulen, P.V., Kluytmans, J. (2007). Increase of pig and calf related MRSA in a Dutch hospital. Clin. Microbiol. Infect. 13, S446–S447.
23. Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E.O.C., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J.B., de Neeling, A.J. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5, 26.
24. Van Duijkeren, E., Jansen, M.D., Flemming, S.C., De Neeling, H., Wagenaar, J.A., Schoormans, A.H.W., Van Nes, A., Fluit, A.C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. Emerg. Infect. Dis. 13, 1408–1410.
25. Gilchrist MJ, Greko C, Wallinga DB, Beran GW, Riley DG, Thorne PS. (2007). The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. Environ Health Perspect; 115:313–6.
26. Andrew E. Waters, Tania Contento-Cuomo, Jordan Buchhagen, Cindy M. Liu, Lindsey Watson, Kimberly Pearce, Jeffrey T. Foster, Jolene Bowers, Elizabeth M. Driebe, David M. Engelthaler, Paul S. Keim, and Lance B. Price. (2011). Multidrug -resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. Clinical Infectious Diseases Advance Access published April 15, 2011.
27. Norma sanitaria que establece los criterios Microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. RM N° 615-2003 SA/DM. Codex Alimentarius.
28. Instituto Colombiano de Norma Técnica. ICONTEC. (2004) NTC 4491-2, Microbiología de alimentos y de alimentos para animales. Preparación de muestras para ensayo, suspensiones iniciales y diluciones decimales para los análisis microbiológicos. Parte 2: Reglas específicas para la preparación de carne y productos cárnicos.

29. Manual de Técnicas de Análisis para Control de Calidad Microbiológico de Alimentos para Consumo Humano. (1998) Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Vigilancia de Alimentos y Medicamentos INVIMA. Bogotá Colombia.
30. Instituto Colombiano Norma Técnica. ICONTEC. (2007) NTC 4779. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para el recuento de Estafilococos coagulasa positiva (*Staphylococcus aureus* y otras especies).
31. Murray Patrick R, Pfaller Michael A (2007) Microbiología médica. 5a ed. Últ. Reimpr. Elsevier España. Pg 221-236.
32. Bettin A, Causil C, Reyes N, Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *Braz J Infect Dis.* 2012 Jul-Aug; 16(4):329-34. Doi: 10.1016/j.bjid.2012.06.017.
33. Lee, J.H., 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mec* genes. *Veterinary Microbiology* 113, 137–141.
34. Wulf, M., Voss, A. (2008). MRSA in livestock animals — an epidemic waiting to happen. *Clinical Microbiology and Infection* 14, 519–521.
35. Chambers H. F. (2001). Methicillin- Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev.* 10(4):781-791.
36. Deurenberg HR, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobbering EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006 13; 222-235.
37. Hanson B., Dressler A., Harper A., Scheibel R., Wardyn S., Roberts L., Kroeger J., Smith T. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health* 4, 169—174.

Capítulo 3: Prevalencia de gen codifica toxina PVL aislado de alimentos de origen cárnico comercializados en la Ciudad de Cartagena

Lersy López G²¹, Alfonso Bettin M¹, Hector Suárez M³

3.1 Resumen

Bacterias como *Staphylococcus aureus* adquiridos en la comunidad presentan factores de virulencia específicos Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV); ésta es una citotoxina que produce destrucción de los leucocitos, necrosis tisular y que está asociada a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario (SARM-AC), a neumonía necrotizante estafilocócica. Las infecciones causadas por la LPV son debidas a cepas con actividad leucocítica y dermonecrótica debida a la presencia de dos componentes uno de clase S y otro F, que están codificados por los genes LukSPV LukFPV. Se realizó un estudio para determinar la prevalencia de SARM en 40 expendios que comercializan carne molida de res y carne de cerdo, se analizaron 160 muestras a través de cultivo microbiológico en Agar Baire Parcker (Merck), los aislados con características macroscópicas presuntivas del género *Staphylococcus aureus* fueron confirmadas por la técnica de PCR, a estas cepa fue realizada la búsqueda del gen mecA que codifica las cepas Meticilino resistentes y el gen Luk que codifican la toxina PVL. La presencia del gen se encontró en 7 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas, de las cuales 6 cepas fueron identificadas como Meticilino Resistentes y 1 como Meticilino sensible. El 10% de los *Staphylococcus aureus* aislados poseen el gen que codifica la toxina PVL, el 71% del gen fue identificado en muestras de carne de cerdo y el 28% en carne molida de res, de esta forma estos alimentos pueden constituir una fuente de diseminación del gen que codifica LPV.

Palabras claves. Leucocidina de Pantón-Valentine LPV, SARM, SARM.

¹ Universidad del Sinú seccional Cartagena. Escuela de Nutrición y Dietética. Grupo GIND.

² Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA.
Correspondencia: Héctor Suárez Mahecha: hsuarezm@unal.edu.co

3.2 Abstract

Bacteria such as *Staphylococcus aureus* have community acquired specific virulence factors Pantón-Valentine leukocidin (PVL), this is a cytotoxin that produces destruction of leukocytes, tissue necrosis and is associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of community origin (MRSA -AC), a staphylococcal necrotizing pneumonia. Infections caused by the LPV are due to strains with activity buffy and dermonecrotic due to the presence two component one of class S and another F that are encoded by genes LukSPV LukFPV. The objective of this research was to conduct a descriptive study to determine the prevalence of MRSA in 40 outlets that sell ground beef and pork, 160 samples were analyzed by microbiological culture Parcker Baire Agar (Merck), isolates with presumptive macroscopic characteristics of the genus *Staphylococcus aureus* were confirmed by PCR, these strain was carried mecA search encoding methicillin resistant strains and the gene encoding the toxin Luk PVL. La presence of the gene was found in 7 strains of *Staphylococcus aureus* isolated, of which 6 strains were identified as Methicillin Resistant and 1 as the Methicillin sensitive. Conclusion: on 10% of the *Staphylococcus aureus* isolates possess the gene encoding the toxin PVL, 71% of gene was identified in samples pork and 28% in ground beef, of this form these foods may constitute a source of dissemination can the gene encoding LPV.

Keywords. Leucocidin of Pantón-Valentine LPV, SAMR, SAMS.

3.3 Introducción

Bacterias como *Staphylococcus aureus* son adquiridos en la comunidad por el consumo de alimentos y pueden presentar factores de virulencia específicos como la Leucocidina de Pantón-Valentine (LPV); ésta es una citotoxina que produce destrucción de los leucocitos, necrosis tisular y está asociada a la neumonía necrotizante estafilocócica, las infecciones causadas por la LPV son debidas a cepas con actividad leucocítica y dermonecrótica debida a la presencia de dos componentes uno de clase S y otro F, que están codificados por los genes *LukSPV*, *LukFPV*.¹

Pantón-Valentine Leucocidina (PVL) es una citotoxina que pueden destruir las células blancas de la sangre y causar necrosis tisular extensa e infección aguda. La toxina fue descrita por primera vez por Pantón en 1932.^{2, 3} Las afecciones por *Staphylococcus aureus* PVL-positivo *aureus* más comúnmente son: Infecciones piógenas en la piel, celulitis y necrosis en tejidos. También puede causar artritis séptica, osteomielitis, piomiositis, bacteriemia, púrpura fulminante (típicamente caracterizado por la coagulación intravascular diseminada y púrpura cutánea), y neumonía necrotizante.⁴ La infección clínica tiende a acompañar a otros factores de riesgo como: hacinamiento, la participación en los deportes de contacto cercanos (que puede causar abrasiones de la piel), por ejemplo, rugby, lucha entre otros. La permanencia en el ejército, hogar, entorno escolar, utilización de objetos contaminados: compartir toallas, cuchillas de afeitar, Higiene pobre de manos, piel lastimada y consumo de drogas ilegales son factores que pueden facilitar las afecciones por esta bacteria.⁵ Debido a la capacidad invasiva y virulenta que posee esta toxina, ha cobrado una gran importancia y preocupación en la sociedad, por lo que se están realizando numerosos estudios en diferentes países, sobre aislamiento de SARM con capacidad de producir la toxina.^{6, 7, 8}

3.4 Materiales y Métodos

3.4.1 Toma de Muestra y realización de cultivo.

En este estudio de tipo descriptivo observacional fueron analizados 40 expendios distribuidos en tres localidades de la Ciudad de Cartagena: 19(47,5%) en la Localidad Histórica y del Caribe; 16 (40%) en la localidad Industrial de la Bahía; y 5(12,5%) en la localidad Virgen y Turística; donde el criterio estadístico para la selección de expendios que comercializaban los dos tipos de carne fue: varianza estimada en 0.19, de acuerdo con investigación preliminar; error del 5% y probabilidad mínima del 75%. Los expendios (unidades de muestreo) fueron seleccionados aleatoriamente, en cada expendio fueron tomadas entre 100 - 300 g de los dos tipos de carne: carne molida de res y carne de chuleta de cerdo. En cada unidad de muestreo, fueron tomadas muestras por duplicado. La lectura de las muestras fue realizada con base a Norma Sanitaria RM 615-2003 Codex Alimentarius.⁹

Se analizaron 160 muestras a través de cultivo microbiológico en Agar Baire Parcker (Merck), los aislados con características macroscópicas presuntivas del género *Staphylococcus aureus* fueron confirmadas por la técnica de Reacción en cadena de Polimerasa (PCR), a estas cepas se le realizó la búsqueda del gen *LuK* que codifica la toxina PVL.

3.4.2 Extracción de ADN

El ADN genómico de cada aislamiento incluido en el estudio fue obtenido de acuerdo con el protocolo descrito por Bettin, *et al.*, (2012).¹⁰

Cada *Staphylococcus aureus* presuntivo fue cultivado en agar Plate Count (Merck) y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Cinco colonias se suspendieron en 1 mL de Tris 0,5 M, se centrifugó a 13.000 rpm x 5 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspende. Se resuspendió en 0,5 mL de tampón TE (10 mL de Tris y 1 mL de EDTA mL, pH: 8,0). Se hierve a 100 C durante 30 min, y luego se congela a -35°C durante 20 minutos, luego se descongelan a 65 °C, y finalmente se centrifugó a 13.000 RPM durante 15 min. ADN bacteriano lo contiene el sobrenadante. Se recogió el sobrenadante en un tubo limpio y se almacenó a -20 °C para su posterior realización de la PCR.

3.4.3 Ensayos de PCR

Los *Staphylococcus aureus* aislados por métodos microbiológicos fueron sometidos ensayos de reacción en cadena de la polimerasa multiplex para evaluar la presencia de *LukF-PV* (que codifica parte de la toxina LPV), se determinó los genes *LukPV1F* y *LukPV2R* que amplifica un fragmento de 437 pb del PVL. Se utilizaron como controles cepas ATCC 33591 (*mecA* +; *Nuc* +; *PVL* -) y ATCC 25923 (*mecA* -; *Nuc* +; *PVL* +) para *mecA* y Amplificación de LPV y el agua pura se utilizó como control para el ensayo de PCR.

El ADN fue amplificado en un volumen de reacción de 25uL que contenía 12.5 uL de la mezcla de PCR (PCR master Mix; Promega), 0.2 uM de cada cebador y 5 uL de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Aixigen bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 min, 50°C por 1 min, y 72°C por 2 min, con un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Como controles se utilizaron las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 *mecA* (+); *Nuc* (+); *PVL* (-) y ATCC 25923 *mecA* (-); *Nuc* (+); *PVL* (+).

3.5 Resultados

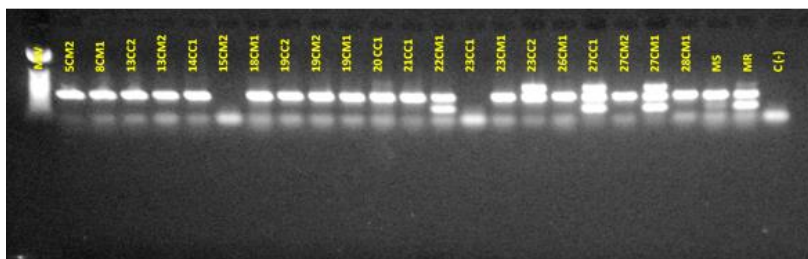
En la tabla 3-1 son presentados los resultados de genes que codifican la toxina aislados de cepas de *Staphylococcus aureus*. La presencia del gen se encontró en 7 cepas de las 66 confirmadas como *Staphylococcus aureus* a través de la técnica de PCR, de las cuales 6 cepas (5CM1, 5CC1, 27CM1, 27CC1, 31CC1 y 55CC1), fueron identificadas como Meticilino Resistentes y 1 cepa como Meticilino sensible (23CC2).

En la figura 3-1 son presentados los resultados del análisis por electroforesis de muestras con presencia del gen LukFPV que codifica la toxina PVL. El gen que codifican la toxina PVL fueron aisladas en el (71%) de las muestras de carne de Chuleta de Cerdo y en el (28%) de las muestras de carne molida de res, una de las cepas aisladas de carne de cerdo fue identificada como *Staphylococcus aureus* Meticilino sensible (SAMS).

Tabla 3-1. Gen que codifican la toxina PVL aislados de cepas de *Staphylococcus aureus*

RECUENTOS	MUESTRAS	%	SARM	SASM
100 – 1000 UFC/g.	5	71	5	1
>1000 UFC/g.	2	29	2	0

Figura 3-1. Resultados de Electroforesis con muestras que presentan el gen LukFPV que codifica la toxina PVL



Cinco de las muestras que presentaron el gen *MecA* y el gen que codifica la toxina PVL, fueron aislada de muestras de carne con recuentos de colonias que se encontraron dentro de los parámetros de referencia entre 100 – 1000 UFC/gr, (tabla 3-2) lo cual se considera aptas para el consumo humano, mientras que solo dos muestras con el gen son rechazadas por presentar recuentos mayores a 1000 UFC/g, de acuerdo a los parámetros establecidos en la Norma Sanitaria RM 615-2003 Codex Alimentarius.⁹ Los expendios donde se encontró los genes de la toxina se encuentran ubicados en la localidad LH: 2, LI: 2 y LV: 2.

Tabla 3-2. Recuento de colonias UFC/g vs presencia del gen que codifica la Toxina PVL.

MUESTRAS	RECUESTO DE COLONIAS UFC/g.	METICILINO RESISTENTE	TOXINA PVL
5CM1	1500	Positivo	Positivo
5CC1	500	Positivo	Positivo
23CC2	200	Negativo	Positivo
27CM1	600	Positivo	Positivo
27CC1	600	Positivo	Positivo
31CC1	200	Positivo	Positivo
55CC1	1700	Positivo	Positivo

3.6 Discusión

La presencia del gen que codifica la toxina PVL en expendios ubicados en las tres localidades de la ciudad de Cartagena se constituye en un riesgo para la población, porque podría presentarse patologías asociadas a esta toxina que tiene la capacidad de causar destrucción de leucocito y además causar lesiones necrotizantes en partes blandas y a nivel pulmonar.¹ Debido a la capacidad invasiva y virulenta que posee esta toxina, ha cobrado una gran importancia y preocupación en la sociedad, por lo que se están realizando numerosos estudios en diferentes países, sobre aislamiento de SARM con capacidad de producir la toxina.^{6, 7, 8}

Otros estudio reportan dos cepas de SARM aisladas de carne de cerdo, dando una prevalencia global del 1,2%. Un SARM aislado fue positivo para el gen PVL.¹¹

De Colombia no se encontraron estudios donde se reporte la prevalencia de este gen en alimentos. Por tal motivo la prevalencia obtenida en nuestro estudio del 10% en los *Staphylococcus aureus* aislados se constituye en un problema de salud pública, debido a que encontró el gen en muestras que se consideran aptas para el consumo humano por presentar recuentos dentro los parámetros de referencia para carnes crudas picadas y Molidas (100–1000 UFC/g), establecidos en la Norma Sanitaria RM615-2003 Codex Alimentarius.

3.7 Conclusión

Se confirma la circulación y posible diseminación de cepas SARM productoras de gen que codifican la toxina PVL en alimentos de origen cárnico, representando un riesgo para los consumidores de productos cárnico de la ciudad de Cartagena.

3.8 Bibliografía

1. Rossney AS, Shore AC, Morgan PM, Fitzgibbon MM, O'Connell B, Coleman DC(2007). The emergence and importation of diverse genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) harboring the Panton-Valentine Leukocidin Gene (pvl) reveal that pvl is a poor marker for community-acquired MRSA strains in Ireland. *J. Clin. Microbiol.* 45; 8: 2554-63.
2. Dyer O, Nueva cepa MRSA no es a nivel de epidemia, dice el experto. *BMJ.* 2007 06 de enero, 334 (7583): 10.
3. Holmes A, Ganner M, McGuane S. (2005). *Staphylococcus aureus* aislados de llevar Panton-Valentine leucocidina genes en Inglaterra y Gales: frecuencia, caracterización, y la asociación con la enfermedad clínica. *J Clin Microbiol*; 43 (5):2384-90.
4. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P. (2002). Asociación entre cepas de *Staphylococcus aureus* portadores del gen de Panton-Valentine Leucocidina y neumonía necrotizante altamente letal en pacientes inmunocompetentes jóvenes. *Lancet.* 02 de marzo, 359 (9308) :753-9.
5. Gilbert M, J MacDonald, Gregson D. (2006). Outbreak en Alberta adquirida en la comunidad (USA300) *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en personas con antecedentes de consumo de drogas, la falta de vivienda o el encarcelamiento. *CMAJ.* Jul 18; 175 (2)149-54. Epub 2006 Jun 27.
6. Wannet, W. J. B., E. Spalburg, M. E. O. C Heck, G. N. Pluister, R. J. L. Willems, and A. J. de Neeling. 2004. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic Berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin. *J. Clin. Microbiol.* 42:3077-3082.
7. Witte W, Cuny C, Strommenger B, Braulke C, Heuk D. (2005). Emergence of a new community - acquired MRSA strain in Germany. *Euro Surveill.* 9: 16 -18.
8. Robert J. Etienne J, Bertrand X on Behalf of Onebra (Observatoire National de L' Epidémiologie de la Resistance Bacterienne aux Antibiotique). (2005). Methicillin – resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton – Valentine Leukocidin in a restrospective case serie from 12 french hospital laboratories, 2000 -2003. *Clin Microbiol Infec.* 11: 585 -587.
9. Norma sanitaria que establece los criterios Microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. RM N° 615-2003 SA/DM. Codex Alimentarius.
10. Bettin A, Causil C, Reyes N. (2012). Molecular identification and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* nasal isolates from medical students in Cartagena, Colombia. *Braz J Infect Dis.* Jul-Aug; 16(4):329-34. Doi: 10.1016/j.bjid.2012.06.017.
11. Hanson B., Dressler A., Harper A., Scheibel R., Wardyn S., Roberts L., Kroeger J., Smith T. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health* (2011) 4, 169—174.

Capítulo 4. Análisis del Perfil de Susceptibilidad Antibiótica de *Staphylococcus aureus* aislado de productos cárnicos

Lersy López G¹³, Héctor Suárez M²

4.1 Resumen

Antes del uso de los antibióticos una Bacteremia causada por *Staphylococcus aureus* producía una mortalidad aproximada del 82%. Aún ahora este porcentaje permanece elevado, entre el 25 y 63%. En años recientes han reemergido las infecciones por *Staphylococcus aureus*, esto se debe en parte a que la bacteria se ha vuelto resistente a los antibióticos con los que normalmente se le combate, aunado a su diseminación en la población sana. Con relación a las cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes relacionadas con la industria alimenticia, se ha podido comprobar que coloniza predominantemente a personas que trabajan en la producción de alimentos de origen animal. Otros estudios han demostrado la alta prevalencia de *Staphylococcus aureus* multirresistentes en cerdos criados en la Unión Europea y Canadá. En este estudio se realizó el perfil de susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras de Carne molida de res y carne de chuleta de cerdo que se comercializan en 40 expendios de las localidades: Virgen y Turística, Industrial de la Bahía y localidad Histórica y zona norte. Para las cepas SARM se utilizaron paneles para Gram positivos deshidratados del método automatizado MicroScan, Marca Siemens; para las cepas SASM se utilizó el método de difusión en disco de Kirby bauver. Se encontró que los *Staphylococcus aureus* aislados en las muestras de carne de res molida y carne de chuleta de cerdo, presentaron multiresistencia, entre el 2% - 12 % a los antibióticos que se usan frecuentemente para tratar infecciones por este microorganismo como: Penicilina, Eritromicina, Amoxicilina – Clavulonato, Clindamicina y Ampicilina-Sulbatam. Se encontró un 12% de cepas multirresistentes lo cual podría generar un problema de salud pública.

Palabra Clave: Resistencia Bacteriana, antibióticos, alimentos, inocuidad.

¹ Universidad del Sinú seccional Cartagena. Escuela de Nutrición y Dietética. Grupo GIND.

² Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA. Correspondencia: Héctor Suarez Mahecha: hsuarezm@unal.edu.co

4.2 Abstract

Before the use of antibiotics bacteremia caused by *Staphylococcus aureus* produced a mortality rate of approximately 82%. Even now this percentage remains high, between 25 and 63%. Recent years have reemerged *Staphylococcus aureus* infections. This is in part because the bacteria have become resistant to an antibiotic which usually is fought, together with its spread in the healthy population. With regard to the *Staphylococcus aureus*-related MDR food industry, it has been shown that predominantly colonizes people working in the production of food of animal origin. Other studies have shown the high prevalence of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs reared in the EU and Canada. This study was conducted susceptibility profile of *Staphylococcus aureus* isolated from samples of ground beef and pork sold in 40 outlets localities: Virgin and Tourism, Bay Industrial and Historical and northern town. The method used for MRSA know was the automated MicroScan, Mark Siemens, were used for Gram positive dehydrated panels provided by Siemens, for MSSA strains used the disk diffusion method of Kirby Bauer. Results and Conclusions: Through the meat foods such as pork and beef are spreading multidrug-resistant strains, which becomes a public health issue. The *Staphylococcus aureus* isolated in samples of ground beef and pork, showed a marked multiresistance between 2-12% to the antibiotics commonly used to treat infections caused by this microorganism such as penicillin, erythromycin, amoxicillin – Clavulonato, Clindamycin and Ampicillin-Sulbatam.

Keyword: Bacterial Multidrug.

4.3 Introducción

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina de origen comunitario (SARM-AC) han emergido como serio problema en la sociedad y son consideradas como una de la primeras causas de infección de piel y tejidos blandos, por ejemplo; en un estudio retrospectivo realizado en USA, en un periodo comprendido entre marzo del 2006 a febrero del 2007, se observó que de 33 pacientes, 18 (55%) presentaron infección en piel y tejidos blandos por SARM-AC, de los cuales, 17 (94%) mostraron susceptibilidad a Trimetoprim Sulfametoxazol y Tetraciclina y 7 (61%) susceptibilidad a levofloxacina (36%), en comparación con los *Staphylococcus aureus* de origen hospitalario (SARM-AH). Uno de los elementos preocupantes de estas nuevas cepas es la presentación clínica generalmente más agresiva y asociada a síndromes infrecuentes como son las fascitis y neumonías necrotizantes de ahí la importancia de conocer las características microbiológicas de este tipo de organismos, lo que implica un abordaje interdisciplinario.¹ Infortunadamente, las opciones terapéuticas para pacientes con infecciones SARM son limitadas; la opción primaria es terapia con vancomicina intravenosa, ya que otros antimicrobianos, incluyendo las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación, son inefectivas contra SARM.²

Las modificaciones que ha presentado el SARM-AC en relación con los perfiles de susceptibilidad en las infecciones suponen un riesgo para la comunidad de adquirir estos patógenos por diseminación. Los perfiles de resistencia descritos en la literatura tanto para el ámbito comunitario como clínico, buscan plantear y contribuir a una terapéutica acorde a las necesidades y características de nuestra población, definiendo una mejor calidad de vida para los pacientes, disminución de costos y estancia hospitalaria, así la implementación de técnicas moleculares que permitirán determinar el comportamiento microbiológico del *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina asociado a la comunidad (SARM-AC) en Latinoamérica, con el fin de tomar y reforzar medidas para su control.³

En un estudio realizado en Colombia encontraron que la prevalencia de resistencia para Eritromicina y Clindamicina en *Staphylococcus aureus*, se encontraba entre el 57 y 58%, respectivamente. Los aislamientos de SARM presentaron altas tasas de resistencia para Eritromicina (94%).⁴ En el año 2011 en EE.UU, se realizó una investigación en la que se analizaron 5136 muestras de carnes y aves de corral, se encontró que el 47% de las muestras estaban contaminadas con *Staphylococcus aureus*, el 52% de los aislados presentaron multiresistencia a los antibióticos, lo cual está relacionado con el amplio uso que tienen los antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal, donde a menudo se aplican como método de prevención de la enfermedad.⁵

También se evaluó en cinco ciudades la prevalencia y los perfiles de susceptibilidad de los antibióticos presentes en las carnes al por menor y aves de corral, encontrándose una alta prevalencia de múltiple resistencia a antibióticos de importancia clínica como Ciprofloxacina, Quinupristina/Dalfopristina, Clindamicina, Eritromicina, Oxacilina, y Daptomicina.⁶ En este estudio se realizó el perfil de susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras de carne molida de res y carne de chuleta de cerdo comercializadas en la ciudad de Cartagena.

4.4 Materiales y métodos

Se realizó estudio descriptivo para determinar el perfil de susceptibilidad de cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de muestras de carne molida de res y carne de chuleta de cerdo que se comercializan en 40 expendios de las localidades: Virgen y Turística, Industrial de la Bahía y localidad Histórica y zona norte. El método utilizado para las cepas SARM automatizado MicroScan, Marca Siemens, se utilizaron paneles para Gram positivos deshidratados, para las cepas SASM se utilizó el método de difusión en disco de Kirby bauer.⁷

A las cepas SASM se le determinó la susceptibilidad frente a los siguientes antimicrobianos: Gentamicina 10 mg, Eritromicina 15 mg, Trimetropin/Sulfametazole 23,75 mg y 1,25 mg, Clindamicina 2 mg y Rifampicina 5 mg, los antibióticos utilizados fueron suministrados por la casa comercial Difco. La Resistencia a Oxacilina mediada por el gen *mecA* se realizó como prueba de tamizaje la técnica de Microdilución en agar y difusión en disco con Cefoxitin de 30 ng (Difco) en Agar Mueller-Hinton. Las placas se incubaron a 35 °C entre 16 a 20 horas. La lectura e interpretación se realizó con base al libro guía del comité de Estándar de laboratorio Clínico que rige para América (CLSI,

2013).⁸ Se utilizaron cepa control de *S. aureus* ATCC 43300: mecA positivo. Los ensayos fueron incubados 24 horas a 35 °C.

4.5 Resultados

La tabla 4-1 muestra los resultados de susceptibilidad antibiótica de cepas de *Staphylococcus aureus* a diferentes antibióticos. Fueron confirmadas 66 cepas por PCR como *Staphylococcus aureus* como resistente a los siguientes antibióticos: 56% a Penicilina, 35% a Eritromicina, 33% Amoxicilina–Clavulonato, 30% a Clindamicina, 12% a Ampicilina - Sulbatam y Cefazolina, 1.5% a Trimetropin Sulfa y Rifampicina. El 100% de las cepas fueron sensibles a Linezolid, Ciprofloxacina, Gentamicina y Moxifloxacina.

Tabla 4-1. Susceptibilidad antibiótica de cepas de *Staphylococcus aureus* confirmado por PCR.

ANTIBIÓTICOS	S	%	R	%
Amoxicilina - Clavulonato	44	67%	22	33%
Ampicilina – Sulbatam	58	88%	8	12%
Cefazolina	58	88%	8	12%
Ciprofloxacina	66	100%	0	0%
Clindamicina	46	70%	20	30%
Eritromicina	43	65%	23	35%
Gentamicina	66	100%	0	0%
Levofloxacina	65	98,5%	1	1.5 %
Linezolid	66	100%	0	0%
Moxifloxacina	66	100%	0	0%
Penicilina	29	44%	37	36%
Rifampicina	65	98,5%	1	1.5%
Trimetropin sulfametazole	65	98.5%	1	1.5%
Tetraciclinas	53	80%	13	20%

Total cepas: 66

En la tabla 4-2 son presentados los resultados porcentuales de cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes aisladas de productos cárnicos. Se observa multirresistencia antibiótica en las 66 cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*, el 12% son resistentes a tres antibióticos, entre los que se destacan: Amoxicilina–Clavulonato, Eritromicina y Clindamicina; un 12% de las cepas con multirresistencia a 4 antibióticos (Amoxicilina – Clavulonato, Eritromicina, Clindamicina y Tetraciclinas); 9% a 5 antibióticos (Amoxicilina– Clavulonato, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclinas y Cefazolina).

Se destaca la muestra 27CM2 que es resistente a 8 antibióticos (Amoxicilina-Clavulonato, Eritromicina, Clindamicina, Tetraciclinas y Cefazolina, Penicilina, Rifampicina y Ampicilina Sulbatam). Esta cepa fue identificada como SAMS y no posee el gen que codifica la toxina PVL.

Tabla 4-2. Porcentaje de cepas de *Staphylococcus aureus* multirresistentes aisladas de productos cárnicos

Cepas <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes	%	Cantidad de Antibióticos
8	12%	3
8	12%	4
6	9%	5
1	2%	8

Total cepas: 66

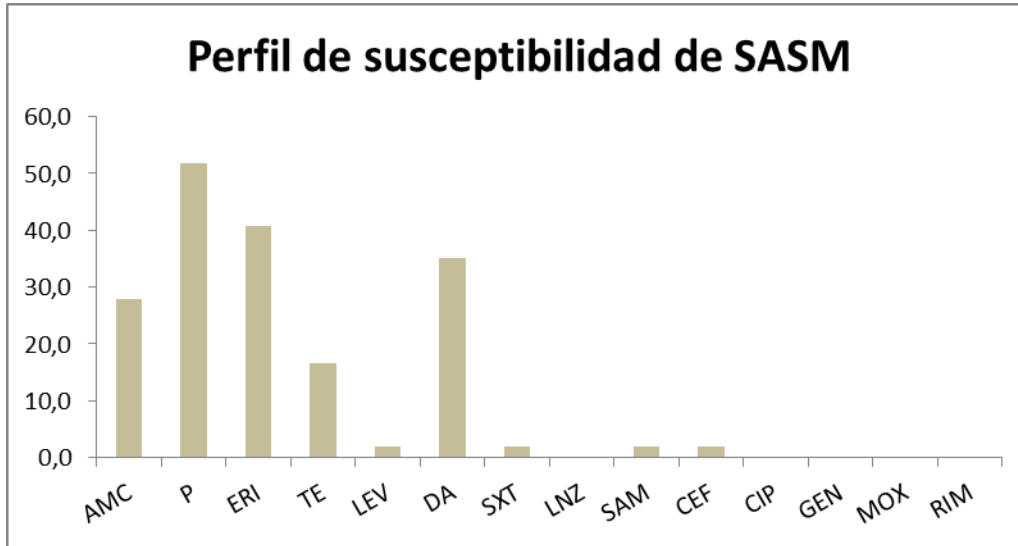
En la tabla 4.3 son presentados los resultados de resistencia antibiótica de cepas SARM. Las cepas Meticilino resistentes son resistentes a los siguientes antibióticos: 57% Amoxicilina-Clavulonato, Ampicilina – Sulbatam y Cefazolina, 85% a Penicilina, 7% a Eritromicina y Clindamicina, 35% a Tetraciclina, el 100% de las cepas son sensibles a: Linezolid, Trimetropin Sulfa, Levofloxacin, Ciprofloxacina, Gentamicina, Moxifloxacina y Rifampicina.

Tabla 4-3. Porcentaje de Resistencia antibiótica de cepas SAMR

Resistencia antibiótica de cepas Meticilino Resistentes		
Antibióticos	N	%
Amoxicilina - Clavulonato	8	57%
Ampicilina - Sulbatam	8	57%
Cefazolina	8	57%
Clindamicina	1	7%
Eritromicina	1	7%
Penicilina	12	85%
Tetraciclinas	5	35%

Total cepas: 14

En la figura 4-1 muestra los resultados del perfil de susceptibilidad de cepas SASM aisladas de productos cárnicos, son resistentes a los siguientes antibióticos: Amoxicilina Clavulonato (27,78%), penicilina (51,85%), Eritromicina (40,7%), Tetraciclinas (16,67%), Levofloxacin (1,85%), Clindamicina (35,1%), Trimetropin Sulfametazole (1,85%), Ampicilina Sulbatam (1,85%), Cefazolina (1,85%). Son sensibles en un 100% a: Ciprofloxacina, Gentamicina, Rifampicina y Moxifloxacina.

Figura 4-1. Perfil de susceptibilidad de cepas SARM aisladas de productos cárnicos

En la tabla 4-4 son presentados los resultados de resistencia antimicrobiana de cepas con gen que codifica toxina PVL. Las cepas de *Staphylococcus aureus* con el gen Luk que codifica toxina PVL son resistentes a: 100% a Penicilinas, 71% a Amoxicilina-Clavulonato y Ampicilina- Sulbatam, el 43% a Tetraciclinas, el 1% a Clindamicina y Eritromicina; el 100% de las Cepas son sensibles a Trimetropin Sulfa, Linezolid, Ciprofloxacina, Gentamicina, Moxifloxacina, Levofloxacina y Rifampicina.

Tabla 4-4. Resistencia antimicrobiana de cepas con gen LukFPV que codifica toxina PVL.

Resistencia antibiótica de cepas con gen LukFPV que codifica la toxina PVL		
Antibióticos	N	%
Amoxicilina – Clavulonato	5	71%
Ampicilina – Sulbatam	5	71%
Clindamicina	1	1%
Eritromicina	1	1%
Tetraciclinas	3	43%
Total cepas: 7		

4.6 Discusión

La multirresistencia a los antibióticos está asociada a mal uso de estos fármacos y al desarrollo evolutivo de los microorganismos que pueden generar mecanismos que impidan la acción de los antimicrobianos. Se realizó un estudio donde se analizaron 5136 muestras de carnes y aves de corral, se encontró que el 47% de las muestras estaban contaminadas con *Staphylococcus aureus*, de los cuales el 52% de los aislados presentaron multirresistencia a los antibióticos, lo cual está relacionado con el amplio uso que tienen los antimicrobianos en la producción de alimentos de origen animal, donde a menudo se aplican como método de promoción y prevención de la enfermedad.⁵ También es posible que las cepas multirresistentes en alimentos provengan de los manipuladores, en este sentido se reportaron dos brotes causados por una cepa de SARM, los cuales fueron causados por contaminación de manipuladores de alimentos que portaban las cepas epidémicas en sus fosas nasales.⁹

En cinco ciudades de EE.UU, se realizó un estudio en carnes de vacuno y aves de corral, se encontró múltiple resistencia a antibióticos de importancia clínica como Ciprofloxacina, Quinupristina/Dalfopristina, Clindamicina, Eritromicina, Oxacilina, y Daptomicina.⁶ Este estudio se correlaciona con nuestros resultados, ya que fue encontrada elevada resistencia a antibióticos utilizados para tratar comúnmente las infecciones ocasionadas por esta bacteria. El SARM al parecer ha respondido bien a terapias basadas en Clindamicina e incluso Trimetropin Sulfametazole en comunidades con alta prevalencia de *Staphylococcus* Meticilino Resistente, para manejo de infecciones menores a nivel de tejidos blandos.¹⁰ En nuestro estudio el 7% de las cepas SARM son resistentes a Clindamicina.

4.7 Conclusión

Fue encontrada una marcada resistencia antibiótica de cepas de *Staphylococcus aureus*, en cepas Meticilino Resistente y en aquellas que poseen el gen que codifica la toxina PVL, obteniéndose una multirresistencia entre el 2 y 12% para 8 y 3 antibióticos respectivamente.

4.8 Bibliografía

1. Garnier F, Tristan A, Francois B, Etienne J, Delagecorre M, Martin C, *et al.* 2006. Pneumonia and new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone. *Emerg Infect Dis*; 12: 498-500.
2. Mamani, Edgardo, LUJAN, Daniel y PAJUELO, Giovanni. Perfil de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus*: Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. *An. Fac. med.*, abr.-jun. 2006, vol.67, no.2, p.120-124. ISSN 1025-5583.
3. Maltezou HC, Giamerellou H. 2006. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*. 27(2):87-96.
4. Reyes J, Hidalgo M, Diaz L, Rincon S, Moreno J, Vanegas N, *et al.* 2007. Characterization of macrolide resistance in Gram-positive cocci from Colombia hospitals: a countrywide surveillance. *Int J Infect Dis*. 11;4: 329-36.
5. Gilchrist MJ, Greko C, Wallinga DB, Beran GW, Riley DG, Thorne PS. 2007. The potential role of concentrated animal feeding operations in infectious disease epidemics and antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*; 115:313–6.
6. Andrew E. Waters, Tania Contente-Cuomo, Jordan Buchhagen, Cindy M. Liu, Lindsey Watson, Kimberly Pearce, Jeffrey T. Foster, Jolene Bowers, Elizabeth M. Driebe, David M. Engelthaler, Paul S. Keim, and Lance B. Price. 2011. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. *Clinical Infectious Diseases Advance Access published April 15, 2011*.
7. Manual de Actualización en Resistencia Bacteriana y Normas CLSI M100 – S20 2010. Grupo para el control de la Resistencia Bacteriana de Bogotá. (GREBO). Secretaria de Salud. Alcaldía Mayor de Bogotá.
8. CLSI .2013. Performance Standandars for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. USA2013.
9. Jones, T.F., Kellum, M.E., Porter, S.S., Bell, M., Schaffner, W., 2002. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Disease* 8, 82–84.
10. Jorgenser J. *et al.* 2000. Antimicrobial Susceptibility testing. Special needs for Fastidious organism and difficult-to-detect resistance mechanisms. *Clinical Infectious diseases*; 30:799-808.

5.0 Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

El 32.5% de los expendios incluidos en este estudio están comercializando carne molida y carne de chuleta cerdo no apta para el consumo humano por presentar recuentos de *Staphylococcus aureus* > 1000 UFC/g, los cuales sobrepasan los parámetros de referencia para productos cárnicos crudos (100 – 1000UFC/g), establecidos en la Norma Sanitaria RM615-2003 Codex Alimentarius.

La prevalencia del *Staphylococcus aureus* en las muestras analizadas que no cumplieron con los parámetros de referencia es del 13%.

76% de las muestras de carne molida y el 24% de la carne de chuleta de cerdo presentaron recuentos > 1000 UFC/g.

El cultivo microbiano para *Staphylococcus aureus* tuvo una sensibilidad del 88% frente al 100% de la técnica de PCR.

El *Staphylococcus aureus* se encuentra distribuido en barrios localizados en las tres localidades de la Ciudad de Cartagena.

Se obtuvo 10 expendios con recuentos superiores *Staphylococcus aureus* SARM, que corresponde a una prevalencia del 25% de los expendios analizados.

El gen MecA que codifica SARM se encuentra en el 18% de las cepas confirmadas como *Staphylococcus aureus*, el 82% de las cepas aisladas fueron identificadas como SASM.

El tipo de carne analizado en el cual se obtuvo en mayor porcentaje el gen MecA fue Carne de res molida 66%.

Los *Staphylococcus aureus* SARM se encuentran distribuidos en las tres localidades de la ciudad de Cartagena, 40% en la localidad Virgen y Turística, 40% en la localidad Industrial de la Bahía y 20% en la localidad Histórica y del Caribe.

El 10% de los *Staphylococcus aureus* aislados poseen el gen que codifica la toxina PVL.

El 71% del gen LukFPV fue identificado en muestras de carne de Cerdo y el 28% en carne molida.

Se confirma la circulación y posible diseminación de cepas SARM productoras de la toxina PVL, representando un riesgo para los consumidores de productos cárnicos de la ciudad de Cartagena.

El gen identificado se encuentra presente en las tres localidades de la ciudad de Cartagena.

El 71% del gen fue identificado en muestras con recuentos de *Staphylococcus aureus* dentro los parámetros de referencia, lo cual se constituye un riesgo para la comunidad porque se encuentra circulando una cepa con una alta patogenicidad.

Los alimentos son una fuente de diseminación de este gen, la tipificación de las cepas aisladas de alimentos y de las que causan infección podrían dar información sobre el tipo de reservorio de este microorganismo que circula en la ciudad de Cartagena.

A través de los alimentos de origen cárnico como cerdo y carne de res se están diseminando cepas multirresistentes, lo cual se convierte en un problema de salud pública.

Los *Staphylococcus aureus* aislados en las muestras de carne de res molida y carne de cerdo, presentaron una marcada resistencia entre el 12 – 56 % a los antibióticos que se usan frecuentemente para tratar infecciones por este microorganismo tales como: Eritromicina, Amoxicilina – Clavulonato, Clindamicina y Ampicilina-Sulbatam.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistentes presentan una elevada resistencia del 57% a los antibióticos con inhibidores de las Betalatasas que son utilizados en infecciones graves.

Las cepas aisladas de Carne de Res Molida y Carne de Chuleta de Cerdo son multirresistentes, un 12% para 3 y 4 antibióticos; y un 9% para 5 antibióticos.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* con el gen Luk que codifica toxina PVL son resistentes en, 71% a Amoxicilina- Clavulonato y Ampicilina- Sulbatam; y un 43% a Tetraciclinas, antimicrobianos utilizados como elección en gérmenes con elevada resistencia.

5.2 Recomendaciones

A las entidades de Salud de la Ciudad, realizar mayores controles en la vigilancia del cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura en expendios que comercializan productos cárnicos en la Ciudad de Cartagena.

Realizar búsqueda del SARM en manipuladores de alimentos que laboran en expendios de productos de origen cárnico en la ciudad.

Realizar tipificación molecular de las cepas aisladas de productos cárnicos y las cepas que causan infección, para determinar el tipo de reservorio de estos microorganismos que circulan en la Ciudad.

6. Bibliografía.

1. Echevarría zarate, Juan e iglesias Quilca, David. 2003. Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Rev Med Hered, Oct. 2003, vol.14, no.4, p.195-203. ISSN 1018-130X.
2. Karska Barbara - Wysockib, Mari Bazona, Wanda Smora giewiczza. 2010. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbiological Research 165; 674—686.
3. Tohidpour A., M. Sattari, R. 2006. Efecto antibacteriano de los aceites esenciales de dos plantas medicinales contra resistente a la Meticilina *Staphylococcus aureus* (MRSA) Departamento de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Tarbiat Modares, PO Caja. Teherán, Irán: 14115-158.
4. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. 2003. Comparison of Mortality Associated with Methicillin-Resistant and Methicillin- Susceptible *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Meta-analysis. Clinical Infectious Diseases; 36:53-59.
5. Melzer M, Eykyn SJ, Gransden WR, Chinn S. 2003. Is Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* more virulent than Methicillin-Susceptible S. aureus. A comparative cohort Study of British Patients with Nosocomial Infection and bacteremia CID 2003; 37:1453-60.
6. Pesavento G., Ducci B., Comodo N., Nostro A.L. 2007. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Food Control, 18 (3), pp. 196-200.
7. De Neeling, A.J., van den Broek, M.J.M., Spalburg, E.C., van Santen-Verheuevel, M.G., Dam-Deisz, W.D.C., Boshuizen, H.C., van de Giessen, A.W., van Duijkeren, E., Huijsdens, X.W., 2007. High prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. Veterinary Microbiology 122, 366–372.
8. Huijsdens, X.W., van Dijke, B.J., Spalburg, E., van Santen-Verheuevel, M.G., Heck, M.E.O.C., Pluister, G.N., Voss, A., Wannet, W.J.B., de Neeling, A.J., 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 5, 26.
9. Lee, J.H., 2006. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mec* genes. Veterinary Microbiology 113, 137–141.
10. Van Duijkeren, E., Jansen, M.D., Flemming, S.C., De Neeling, H., Wagenaar, J.A., Schoormans, A.H.W., Van Nes, A., Fluit, A.C., 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs with exudative epidermitis. Emerg. Infect. Dis. 13, 1408–1410.
11. Wulf, M., Voss, A., 2008. MRSA in livestock animals — an epidemic waiting to happen Clinical Microbiology and Infection 14, 519–521.
12. Boer de E, J.T.M. Zwartkruis- Nahuis, B. Wit , X.W. Huijsdens, A.J. de Neeling, T. Bosch, R.A.A. van Oosterom, A. Vila, A.E. Heuvelink. 2009. Prevalence of Methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* in meat. International Journal of Food Microbiology 134; 52–56.
13. Bhalla, A., Aron, D.C., Donskey, C.J., 2007. *Staphylococcus aureus* intestinal colonization is associated with increased frequency of S. aureus on skin of hospitalized patients. BMC Infectious Diseases 7, 105.

14. Smith TC, Pearson N. 2010. The emergence of *Staphylococcus aureus* ST398. Vector Borne Zoonotic Dis. [Epub ahead of print]. doi:10.1089/vbz.2010.007.
15. Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. Vet Microbiol; 128:298–303.
16. Andrew E. Waters, Tania Contente-Cuomo, Jordan Buchhagen, Cindy M. Liu, Lindsey Watson, Kimberly Pearce, Jeffrey T. Foster, Jolene Bowers, Elizabeth M. Driebe, David M. Engelthaler, Paul S. Keim, and Lance B. Price. 2011. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US Meat and Poultry. Clinical Infectious Diseases Advance Access published April 15, 2011.
17. Álvarez CA, Barrientos OJ, Leal AL, Contreras GA, Barrero L, Rincón S, et al. 2006. Community- associated Methicillin -resistant *Staphylococcus aureus*, Colombia. Emerg Infect Dis; 12:2000-1.
18. Cortes Jorge Alberto, Carlos Andrés Gómez, Sonia Isabel Cuervo, Aura Lucía Leal y GREBO. 2007. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Bogotá, Colombia: Public Health implications. Rev. Salud pública. 9 (3):448-454.