




Genotipificación de beta-Lactamasas de espectro extendido en *Salmonella* spp. aisladas de carne molida de res en supermercados de Managua, Nicaragua 2020


Extended-spectrum beta-lactamase genotyping in *Salmonella* spp. isolated from ground beef in supermarkets in Managua, Nicaragua 2020

Romero Oviedo, Francisco; Arbizú Medina, Oscar; Jimenes, Benita Magaly; Narváez Gonzalez, Yosimar

 **Francisco Romero Oviedo**
fran_romero232003@yahoo.es.
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
(UNAN-MANAGUA), Nicaragua

 **Oscar Arbizú Medina**
arbizu2006@yahoo.com.mx.
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
(UNAN-MANAGUA), Nicaragua

 **Benita Magaly Jimenes**
magy21abr@yahoo.es.
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
(CNDR), Ministerio de Salud de Nicaragua, Nicaragua

 **Yosimar Narváez Gonzalez**
yosi0395@gmail.com.
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
(UNAN-MANAGUA), Nicaragua

Revista Torreón Universitario
Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-Managua,
Nicaragua
ISSN: 2410-5708
ISSN-e: 2313-7215
Periodicidad: Cuatrimestral
vol. 12, núm. 35, 2023
revis.torreon.faremc@unan.edu.ni

Recepción: 30 Agosto 2022
Aprobación: 21 Septiembre 2023

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/387/3874496001/>

Financiamiento
Fuente: Autores
Beneficiario: Este estudio fue realizado con el apoyo del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua. Fondos propios Laboratorio de Biología Molecular "Elmer Cisneros" in memoriam POLISAL UNAN Managua.

Resumen: La Resistencia antimicrobiana de patógenos de transmisión alimentaria se ha convertido en una gran preocupación mundial para la salud humana y animal, bacterias como la *Salmonella* son el principal microorganismo relacionado con intoxicaciones alimentarias y tiene la capacidad de sobrevivir a los constantes cambios en los factores ambientales, por lo tanto, se decidió buscar mediante un estudio descriptivo este patógeno en carne molida de res. Se obtuvieron un total de 100 muestras de carne molida de res seleccionadas aleatoriamente de 10 supermercados de Managua, de estas solamente en 4 muestras se aisló *Salmonella* spp, las cuales presentaban fenotípica y genotípicamente beta-Lactamasas, confiriendo resistencias a las cefalosporinas y limitando el uso de las fluoroquinolonas por una resistencia intermedia a ciprofloxacina.

Palabras clave: Salmonella, Beta-Lactamasas, Carne, Alimentos, Salud.

Abstract: Antimicrobial resistance of foodborne pathogens has become a major global concern for human and animal health, bacteria such as *Salmonella* are the main microorganism related to food poisoning and have the ability to survive constant changes in environmental factors. Therefore, it was decided to search for this pathogen in foods such as ground beef, from which a total of 100 samples of ground beef were obtained, selected from different supermarkets in Managua, of these only *Salmonella* was isolated in 4 samples spp, which phenotypically and genotypically presented beta-lactamases, conferring resistance to cephalosporins and limiting the use of fluoroquinolones due to intermediate resistance to ciprofloxacin.

Keywords: Salmonella, Beta-lactamase, Meat, Food, Health.

El autor o los autores de los artículos, ensayos o investigaciones conceden a la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua (UNAN-Managua) los derechos de edición (copyright) del trabajo enviado, por consiguiente, la Universidad cuenta con el derecho exclusivo para publicar el artículo durante el periodo completo de los derechos de autor.



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivar 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

OBJETIVO

Identificar genes codificantes de β -lactamasas (blaOXA, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M) en *Salmonella* spp aisladas en carne molida de res expandidas en supermercados de Managua, Nicaragua 2020.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias de transmisión alimentaria que presentan resistencias a los antibióticos se han convertido en un problema para la salud pública a nivel mundial, existe una preocupación desde el punto de vista de salud humana como de salud animal debido a la inocuidad y seguridad alimentaria de igual forma existe implicancia económica de los sectores más vulnerables, ya que al presentar infecciones con bacterias resistentes se necesitan antibióticos más costosos para controlar la infección. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), ha mostrado su preocupación tras evidenciarse que los alimentos de origen animal pueden servir de vía de exposición a bacterias con resistencia a los antibióticos, es importante desde el punto de vista epidemiológico evidenciar la presencia de *Salmonella* spp patógenas para el humano con perfiles de resistencia de importancia clínica. (FAO, 2020)

La Organización Mundial de la Salud ha mostrado su preocupación reforzando el conocimiento científico mediante los procesos investigativos y la vigilancia epidemiológica de los países miembros, lo que ha llevado a una estrategia a nivel global denominada "Una sola salud" (One Health) para contener este incremento de bacterias resistentes a los antibióticos. (OMS, 2016)

Salmonella es un bacilo gramnegativo, facultativo anaerobio, que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*. El género *Salmonella* se compone de dos especies taxonómicas, *Salmonella bongori* y *Salmonella entérica*, y todas las *Salmonellas* de importancia médica forman parte de esta última. *Salmonella entérica* es una especie diversa de bacterias que consta de más de 2500 serovares diferentes. El patógeno puede adaptarse al huésped, restringirse al huésped o ser generalista, según la amplia gama de huéspedes que puede infectar. El patógeno está presente de forma omnipresente en la cadena alimentaria humana y, con frecuencia, se asocia con brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. La *Salmonella* coloniza casi todos los animales de sangre fría y caliente, además de sus baluartes ambientales extra-animales. Las últimas décadas han sido testigos de la aparición de *Salmonella* altamente virulenta y resistente a los antibióticos, lo que ha provocado una mayor morbilidad y mortalidad en los seres humanos. La aparición de varios serotipos de *Salmonella* resistentes a múltiples antibióticos en los animales destinados al consumo subraya un peligro significativo para la seguridad alimentaria. (Divek V. T. Nair, 2018.)

La resistencia a los antibióticos en patógenos transmitidos por los alimentos como *Salmonella* es una preocupación importante para la seguridad de la salud pública. Se requiere más atención para enfocarlos en el suministro de alimentos para animales. La *Salmonella* es difícil de eliminar de sus huéspedes reservorios, y los animales destinados a la alimentación a menudo sirven como reservorios del patógeno. La *Salmonella* no tifoidea causa el mayor número de enfermedades, hospitalizaciones y muertes asociadas con enfermedades transmitidas por alimentos. (Divek V. T. Nair, 2018.)

MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal con el objetivo de detectar genes codificantes de β -lactamasas (OXA, TEM, SHV, CTX-M) en *Salmonella spp.* aisladas en carne molida de res expendidas en supermercados de Managua, Nicaragua 2020. El universo fue conformado por los 46 supermercados ubicados en toda Managua, distribuidos en 5 cadenas. La muestra estuvo conformada por 10 supermercados, en cada uno de ellos se tomaron dos lotes de carne (un lote de carne económico y un lote de carne súper), de cada uno de los lotes se obtuvo 5 subunidades, es decir se estudiaron 50 subunidades de carne económica y 50 subunidades de carne súper, lo que equivale a 100 subunidades de carne molida estudiadas. Cabe señalar que por cada una de las subunidades se analizaron 100 gramos de carne molida de res en las condiciones normales de venta al público, luego las muestras se trasladaron al laboratorio del Centro de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud el tipo de muestreo utilizado fue probabilístico aleatorio estratificado (de los 46 supermercados se obtuvieron de manera aleatoria 10 lo que represento el 20%). Para la obtención de la muestra se visitaron los supermercados seleccionados aleatoriamente en compañía de la dirección de Regulación de Alimentos del Ministerio de Salud, haciendo uso de fichas para la recolección de datos concernientes a la investigación, basada en la información observada en el establecimiento y del producto. Se obtuvo los 100 gramos de carne molida de res por cada sub-muestra en las condiciones normales de venta al público, luego se trasladó al laboratorio de Centro de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud, donde se facilitó las áreas analíticas, los reactivos y materiales para llevar a cabo el procesamiento de las muestras y el aislamiento de *Salmonella spp.*

Aislamiento de *Salmonella spp* en carne de res molida

El procedimiento de aislamiento de *Salmonella* en la carne de res molida se realizó siguiendo las recomendaciones del capítulo 5 del Bacteriological Analytical Manual U.S. Food and Drug Administration, Descripción breve, se pesó 25 gr de la muestra en una bolsa Stomacher se adicionó 225 ml de APB (Agua peptonada bufferada), se incubó a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 18 ± 2 horas. Se agitó la bolsa con el medio de pre enriquecimiento (APB) y se transfirió 0.1 ml a un tubo de 10 ml de Rappaport- Vassiliadis e incubó a $41.5 \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 24 ± 3 h. Se Mezcló y agitó el tubo de Rappaport Vassiliadis y transfirió con un asa de 3 mm un inóculo a los medios selectivos de enriquecimiento XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato), HE (Hektoen Entérico) y SB (Sulfito Bismuto) luego se incubaron a $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ por 24 ± 3 h. Luego del tiempo establecido se examinó dichas placas en busca de colonias características de *Salmonella spp*, conforme al medio utilizado. Se seleccionaron 3 colonias típicas de *Salmonella spp*, de las placas de Agar, se inocularon en las pruebas bioquímicas TSI (Agar triple azúcar hierro), LIA (Agar lisina hierro), Hidrólisis de la Urea, MIO (Movilidad, Indol y Ornitina), Mucato, Citrato, Malonato, Rojo metilo. Una vez obtenidos las reacciones de las pruebas bioquímica con resultados positivos para *Salmonella spp*, se realizó pase del microorganismo crecido en el TSI a un plato de TSA, se incubó a 37°C por 24 hrs y se realizó la prueba de oxidasa. Para realizar la confirmación serología se utilizó antisuero somático polivalente O poly A-1 y Vi. (Wallace H. Andrews, 2019) Los materiales genéticos de las cepas aisladas fueron enviados al Laboratorio de Biología Molecular “MA. Elmer Cisneros in memoriam”, Instituto Politécnico de la Salud, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-Managua para la realización de los análisis moleculares.

Prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos

Se utilizó el método de Kirby Bauer o Difusión de Disco (Rodríguez, 2000), breve descripción: se preparó la suspensión con solución salina (0.85%) estéril con una densidad óptica de 0.5 McFarland del inóculo en

tubos de ensayo, utilizando un densitómetro (Densichek). Se sumergió el hisopo estéril en la suspensión preparada y se quitó parte del excedente en las paredes internas del tubo. Se sembró por el método del rayado tri-direccional en agar Mueller-Hinton (MH). Se colocaron los sensidiscos de manera estratégica para la detección de los mecanismos de resistencia. Fueron incubados a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Los sensidiscos usados fueron AMP (ampicilina), SXT (sulfametoxazol/trimethoprim), TET (tetraciclina), CRO (ceftriaxona), CTX (cefotaxima), AMC (amoxicilina/ácido clavulánico), CAZ (ceftazidima), CIP (ciprofloxacina), MER (meropenem), IPM (imipenem). Se realizó la lectura de los halos con un caliper, según las normas CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) 2020. (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020) Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron empleadas como control de calidad.

Extracción del ADN

El ADN bacteriano se extrajo mediante lisis a partir del cultivo en agar MacConkey incubado por 24 horas a 37°C, se tomó un pool de UFC, se inocularon en un tubo Eppendorf que contenía 100 µl de agua libre de nucleasas, se colocó en baño maría en ebullición por 10 minutos, luego se centrifugo a 12000 rpm por 5 minutos y se extrajo 80µl del sobrenadante, se determinó la concentración de ADN extraído en Nanodrop lite 2763 (Samuel Vilchez, 2009).

Detección de genes

*bla*OXA, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M. La PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para la detección de los genes que codifican para β-lactamasas se realizó utilizando cebadores universales, siguiendo el procedimiento descrito por (Hong Fang, 2018. DOI 10.1128/JCM.01943-07). La reacción de amplificación de PCR fue realizada en un volumen final de 20 ul conteniendo GoTaq® qPCR Promega 2X, 0.2 uM de cada primers, 2 ul de ADN de la cepa en estudio.

Condiciones de amplificación del PCR

Las condiciones de termociclado fueron los siguientes, desnaturalización inicial de 15 minutos, seguido por 30 ciclos de 30 segundos a 94°C, 90 segundos a 62°C y 60 segundos a 72°C, terminando con una extensión final de 10 minutos 72°C.

Electroforesis

Los productos amplificados fueron revelados por electroforesis en un gel de agarosa a 2% teñido con GelRed en buffer TBE 1X. La electroforesis se corrió a 120 voltios por 60 minutos, las bandas de ADN de los diferentes genotipos fueron visualizadas en una cámara con luz ultravioleta y fotografiada. Se evaluaron los pesos de las bandas con los controles positivos utilizados cepas de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 para el gen *bla*SHV, *Escherichia coli* para los genes *bla*OXA, *bla*TEM, *bla*CTX-M y *Escherichia coli* ATCC 25922 control negativo, no porta los genes de resistencia.

RESULTADOS

De las 100 muestras de carne molida analizadas se logró aislar *Salmonella spp.* En 4 muestras, las 4 cepas de *Salmonella* tenían un perfil de resistencia al grupo de β -lactámicos, ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, también presentaban resistencia a ampicilina, nitrofurantoina, tetraciclina. Las cepas eran sensibles a trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina/ácido clavulánico, meropenem, imipenem. ciprofloxacina (fluoroquinolonas) presentó resistencia intermedia. De los 4 genes beta-Lactamasa de espectro extendido (BLEE) buscados por PCR (*bla*OXA, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M) solamente se detectó el gen *bla*CTX-M.

DISCUSIÓN

Ante el aumento de resistencia a antimicrobianos (RAM), visto como una amenaza que significa para la salud de seres humanos, animales y plantas, y la necesidad del enfoque de OMS “Una Sola Salud” nace la necesidad de conocer la prevalencia de bacterias patógenas resistentes a antibióticos presentes en alimentos destinados al consumo humano. Existe poca evidencia científica que los alimentos puedan servir como vehículos de adquisición de bacterias resistentes a los antibióticos por lo que pueden convertirse en la causa de muchas enfermedades infecciosas. *Salmonella spp.* es una bacteria patógena para el humano transmitida por los alimentos contaminados causantes de brotes e intoxicaciones alimentarios en todo el mundo.

Un estudio realizado en Lituania demostró una prevalencia del 1.5 % de *Salmonella spp.* En carnes molidas sin embargo no se aislaron *Salmonella* con resistencia al grupo beta-lactámicos (Margarita Terentjeva, 2017). *Salmonella* no forma parte de la microbiota intestinal de humanos y cuando se identifica en el humano, podríamos afirmar que es de origen animal, pero desconocemos si los genes de resistencia se originan en los microorganismos de origen animal, por lo que es necesarios seguir investigando este comportamiento para buscar correlación clonal.

Las cepas de *Salmonella* aisladas en las carnes molidas expandidas en supermercados representan una alerta debido a que poseen el gen *bla*CTX-M que codifican enzimas capaces de hidrolizar los antibióticos del grupo beta-lactámicos principalmente las cefalosporinas, convirtiéndose en cepas multiresistentes, aunque son sensibles a trimetoprima/sulfametoxazol opción para tratar diarrea en Nicaragua, estas cepas están cercanas a ser clasificadas como prioridad 2 de la lista de patógenos de la OMS debido a su resistencia intermedia a una fluoroquinolona.

Es de suma importancia conocer la dimensión de esta problemática, debido a que este comportamiento limita las opciones terapéuticas, los alimentos contaminados estaría contribuyendo a la dispersión de la resistencia.

ASPECTOS ÉTICOS

Debido a que se trataba de un estudio sin riesgos en pacientes no se requirió el consentimiento informado y se mantuvo la confidencialidad de la identidad de los supermercados.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto alguno.

Contribución de cada autor

Francisco Romero Oviedo A, B, C, D, F, G.

Oscar Arbizú Medina A, B, C, D, F, G.

Benita Magaly Jimenes A, B, C, D, F, G.

Yosimar Narváez González C, D, F, G

A-planeación, B-recolección de información, C-análisis de información, D-redacción, F-revisión crítica, G-aprobación de la versión final.

ANEXOS

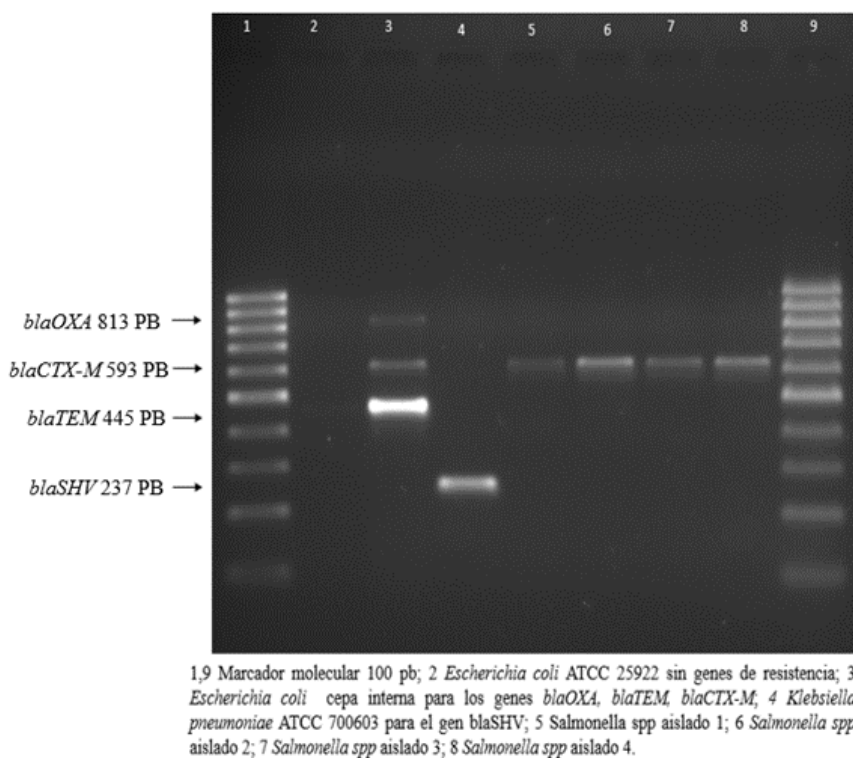


FIGURA 1
Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %.

TABLA 1
Perfil de resistencia y genes beta-Lactamasa de espectro extendido (BLEE)

Aislado	Tipo de muestra	Perfil de resistencia antimicrobiana										PCR (genes BLEE)			
		AMP	CRO	CAZ	CTX	AMC	STX	MER	IPM	CIP	BLEE	OXA	TEM	SHV	CTX-M
Salmonella spp	Carne res molida súper	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+
Salmonella spp	Carne res molida súper	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+
Salmonella spp	Carne res molida súper	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+
Salmonella spp	Carne res molida súper	R	R	R	R	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+

TABLA 2
Secuencias de iniciadores para diferentes genes de resistencia de β -lactamasas

Nombres del primer	Secuencia de primers	Tamaño (Pb)	Referencia
blaSHV	Forward 5' - CTTATCGGCCCTCACTCAA -3'	237 Pb	(Hong Fang, 2018. DOI 10.1128/JCM.01943-07)
blaSHV	Reverse 5' - AGGTGCTCATCATGGAAAG -3'		
blaTEM	Forward 5' - CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA -3'	445 Pb	
blaTEM	Forward 5' - ACGCTCACGGCTCCAGATTTAT -3'		
blaCTX-M	Forward 5' - ATGTGCAGYACCAAGTAARGTKATGGC -3'	593 Pb	
blaCTX-M	Reverse 5' - TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG -3'		
blaOXA	Forward 5' - ACACAATACATATCAACTTCGC -3'	813 Pb	
blaOXA	Reverse 5' - AGTGTGTTTAGAATGGTGATC -3'		

AGRADECIMIENTOS

Por su importante colaboración con el estudio en la recolección y procesamiento de muestras a Lic. Lizeth Palacios López, Lic. Flor de Liz Vega Mayorga, Lic. Danna Pulido Largaespada.

BIBLIOGRAFÍA

- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). CLSI M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. *CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE*.
- Divek V. T. Nair, K. V. (2018. doi:10.3390/foods7100167). Antibiotic-Resistant Salmonella in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control. *Food*.

- FAO. (2020). *Resistencias a los antimicrobianos en alimentos*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura: Consultado 2022 <http://www.fao.org/3/ca8275es/CA8275ES.pdf>.
- Hong Fang, F. A. (2018). DOI 10.1128/JCM.01943-07). Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum B-Lactamases among Escherichia coli Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*.
- Margarita Terentjeva, J. A. (2017). Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella in meat and meat products in Latvia. *Ann Agric Environ Med*. 2017;24:317–321 DOI: 10.5604/12321966.1235180.
- OMS. (2016). *PLAN DE ACCIÓN MUNDIAL SOBRE LA RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS*. Organización mundial de la salud: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf>
- Rodríguez, J. A. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- Samuel Vilchez, D. R. (2009). Prevalence of diarrhoeagenic Escherichia coli in children from León, Nicaragua. *Journal of Medical Microbiology*, 58,630–637. DOI 10.1099/jmm.0.007369-0.
- Wallace H. Andrews, H. W. (2019). BAM Chapter 5: Salmonella. En *Bacteriological Analytical Manual (BAM) Food and Drug Administration (FDA)*. Último acceso 2019. Disponible en: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>.

ABREVIATURAS

Abreviaturas: ADN: Ácido desoxirribonucleico, AMC: Amoxicilina/ácido Clavulánico, AMP: Ampicilina, APB: Agua peptonada bufferada, BLEE: Beta-Lactamasa de espectro extendido, CAZ: Ceftazidima, CIP: Ciprofloxacina, CNDR: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, Ministerio de Salud, Nicaragua, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima, FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, HE: Agar Hektoen Entérico, IPM: Imipenem, LIA: Agar lisina hierro, MER: Meropenem, MH: Agar Mueller-Hinton, MIO: Medio de Movilidad, Indol y Ornitina, OMS: Organización Mundial de Salud, PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, POLISAL: Instituto Politécnico de la Salud, SB: Agar Sulfito Bismuto, SXT: Sulfametoxazol/Trimethoprim, TET: Tetraciclina, TSA: Agar Tripticasa Soya, TSI: Agar triple azúcar hierro, UFC: Unidades formadoras de colonias, UNAN: Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, XLD: Agar Xilosa, Lisina, Desoxicolato.