



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agrònoma i del Medi Natural

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA**

**DETECCIÓN DE CEPAS
MULTIRRESISTENTES DE
Enterococcus spp. MEDIANTE ANÁLISIS
DE RESISTENCIA FENOTÍPICA Y
GENOTÍPICA EN
PRODUCTOS AVÍCOLAS DESTINADOS A
CONSUMO HUMANO.**

TRABAJO FIN DE GRADO UNIVERSITARIO EN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.

ALUMNA: MARINA FERRANDO MITJAVILA

TUTORA ACADEMICA: ROSA M^a MONTES ESTELLÉS

VALENCIA, septiembre 2019.

VALENCIA, septiembre 2019.

DETECCIÓN DE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *Enterococcus* spp. MEDIANTE ANÁLISIS DE RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA EN PRODUCTOS AVÍCOLAS DESTINADOS A CONSUMO HUMANO.

RESUMEN

En los últimos años se han incrementado los estudios de resistencias bacterianas a los antibióticos debido a la desmesurada utilización que ha tenido lugar en la producción avícola. Por ello, en este estudio se realizará la investigación de las resistencias a antibióticos de cepas de *Enterococcus* spp., aislados de productos avícolas que se comercializan para consumo humano.

El perfil fenotípico de resistencia se llevará a cabo mediante antibiograma en medio de cultivo sólido, en el cual se analizará la sensibilidad o resistencia que presentan las cepas de *Enterococcus* spp. analizadas a 8 antibióticos diferentes, para obtener el porcentaje o la tasa de cepas multirresistentes.

Por otro lado, el perfil genotípico se realizará mediante dos tipos diferentes de PCR, una simple y una múltiple, de los principales genes involucrados en la resistencia para comprobar si las cepas de *Enterococcus* spp. analizadas poseen el gen en cuestión y ver si son capaces de expresarlo o no, puesto que, en algunos casos, sí que poseen el gen que se busca, pero no son capaces de expresarlo.

Palabras clave: pollo, *Enterococcus* spp., antibióticos, antibiograma, genes de resistencia, multirresistencia, PCR.

AUTORA: Marina Ferrando Mitjavila.

TUTORA: Rosa M^a Montes Estellés.

VALENCIA; september, 2019.

DETECTION OF MULTIRESTANT STRAINS OF *Enterococcus spp.* BY ANALYSIS OF RESISTANCE PHENOTYPIC AND GENOTYPIC, IN POULTRY PRODUCTS DESTINED FOR HUMAN CONSUMPTION.

ABSTRAT

In recent years, studies of bacterial resistance to antibiotics have increased due to the excessive use that has taken place in poultry production. Therefore, in this study will be carried out the investigation of the resistances to antibiotics of strains of *Enterococcus spp.*, isolated of poultry products destined for human consumption.

The phenotypic profile of resistance is carried out by antibiogram in solid culture medium, in which the sensitivity or resistance of *Enterococcus spp.* strains to 8 different antibiotics will be analyzed, to obtain the percentage or rate of multiresistant strains.

On the other hand, the Genotypic profile will be done using two different types of PCR, one single and one multiple, of the main genes involved in resistance to check if strains of *Enterococcus spp.* analysed possess the gene in question and see if they are able to express it or not, since, in some cases, they do possess the gene they are looking for, but they are not able to express it.

Key words: chicken, *Enterococcus spp.*, antibiotics, antibiogram, resistance genes, multiresistance, PCR.

AUTHOR: Marina Ferrando Mitjavila.

TUTOR: Rosa M^a Montes Estellés.

TABLA DE CONTENIDOS:

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	II
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III

I. INDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	5
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	6
3.1. MUESTREO, AISLAMIENTO Y RECuento DE LOS MICROORGANISMOS.	6
3.2 TEST DE SUSCEPTIBILIDAD FENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS.	8
3.3 ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD GENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS.	10
3.3.1. Extracción del ADN.	10
3.3.2. Detección de genes de resistencia.	11
3.3.3. Visualización del ADN.	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14
4.1. RECuento DE MICROORGANISMOS.	14
4.2. ANÁLISIS DE RESISTENCIA FENOTÍPICA.	15
4.2.1. Resistencia fenotípica en Enterococcus spp.	16
4.3. ANÁLISIS DE RESISTENCIA GENOTÍPICA.	18
5. CONCLUSIONES.....	21
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	22
7. ANEJOS.	25

II. ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1. Mecanismos de resistencias de las principales familias de antimicrobianos utilizados en la industria avícola.....	3
Tabla 2. Genes de resistencias asociadas a familias de antimicrobianos, secuencia de los cebadores, tamaño del amplicón, cepas o medios analizados y referencias.....	13
Tabla 3. Recuento y detección de microorganismos en muestras cárnicas de pollos (hígados, mollejas y carcasas).....	14

1. INTRODUCCIÓN

El uso desmesurado e inadecuado de antibióticos en las granjas como promotores del crecimiento, profilaxis y tratamiento de infecciones ha propiciado la aparición de cepas multirresistentes. Este problema cobra gran importancia debido a que, por hacer un uso inadecuado de los antibióticos para otros fines distintos al tratamiento de enfermedades del ganado, como sería, por ejemplo, para el engorde del animal, las cepas son introducidas en la cadena alimentaria que, a su vez, pueden diseminarse directamente a los humanos por consumo de estos productos avícolas o indirectamente de la contaminación ambiental.

La resistencia a antibióticos en todo el mundo cuesta miles de vidas cada mes y según la OMS, se encuentra entre las amenazas más grandes para la salud mundial, seguridad y desarrollo, ya que amenaza nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes (Holmstrup P, Klausen B, 2018). Cabe destacar que *E.coli* y *Enterococcus spp.* resistentes a la vancomicina, han sido enumerados entre las doce amenazas serias más resistentes a los medicamentos de los Centros para el Control de Enfermedades y Prevención, y se han incluido recientemente en la lista de prioridades de la OMS de bacterias resistentes a los antibióticos para guiar la investigación, el descubrimiento y el desarrollo de nuevos antibióticos (Tacconelli E et al., 2017).

E. coli y *Enterococcus spp.* son dos clásicos Indicadores de contaminación fecal utilizados habitualmente en la evaluación de la calidad microbiológica del agua, así como la de los alimentos. Ambas especies también se han utilizado como indicadores para monitorear la resistencia a los antibióticos en los productos alimenticios, y son claves en la propagación de antibióticos (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2017).

Con el objetivo de reducir la aparición y diseminación de bacterias resistentes a causa del uso generalizado de antimicrobianos en granjas, se han desarrollado varias estrategias, entre ellas la prohibición de un suministro de antibióticos como promotores del crecimiento del animal o la limitación de su uso en las granjas. En cambio, en América del Norte, ciertos medicamentos antimicrobianos pueden ser aprobados para ambos propósitos, es decir, para tratamiento y promotores de crecimiento y, de hecho, algunos promotores del crecimiento pueden ayudar a prevenir enfermedades, incluso a dosis terapéuticas (National Academy Press, 1999).

Por otro lado, también es importante destacar que ha tenido lugar un aumento de las prácticas higiénicas a largo de toda la cadena alimentaria para evitar dicha diseminación, así como el desarrollo de diversos programas educativos sobre el uso adecuado de los antibióticos, los cuales deben ser accesibles a todos los miembros relacionados con la seguridad alimentaria (manipuladores, veterinarios y agricultores) para que estén informados de los posibles problemas que comporta esta situación.

Otra estrategia muy importante a tener en cuenta junto con las anteriores, sería adoptar importantes sistemas de vigilancia sobre resistencia a antibióticos. Para asegurar la eficacia de los sistemas de vigilancia a la hora de ponerlos en práctica, es necesario la realización de una serie de controles tanto en los animales vivos de las granjas como en los productos derivados que posteriormente van a ser distribuidos a los comercios con el fin de ser destinados a consumo humano.

En la UE, el monitoreo y la vigilancia de la resistencia a antimicrobianos y su consumo está actualmente coordinado por las tres agencias de la UE que operan en las áreas de salud humana, seguridad alimentaria y productos farmacéuticos: el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (ECDC), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (EFSA Journal, 2017).

A nivel europeo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) está llevando a cabo programas para la detección de riesgos emergentes asociados a bacterias multirresistentes en la industria alimentaria. Estos programas buscan monitorizar los agentes antimicrobianos, reforzar la vigilancia de las resistencias a antibióticos, llevar controles aleatorios en animales vivos y productos derivados y armonizar los valores epidemiológicos y la transmisión a través de la cadena alimentaria (Roca *et al.*, 2015).

España destaca frente al resto de países europeos puesto que se trata del tercer país, por habitante, en consumo y uso de antibióticos. Además, este valor ha aumentado aproximadamente un 15% desde el año 2000 hasta el 2015 (Klein *et al.*, 2018).

Los antibióticos más utilizados en la industria avícola junto a su mecanismo de acción se encuentran disponibles en la tabla 1 del presente documento. Además de estos antibióticos, el estudio de la resistencia del género *Enterococcus* spp. a la vancomicina y al quinupristin/dalfopristin cobra especial interés debido a que se tratan de antimicrobianos utilizados en humanos, especialmente para el primero de ellos. La vancomicina se trataba del antibiótico de elección para el tratamiento de infecciones por enterococos, sin embargo, el aumento de cepas resistentes a la vancomicina ha propiciado el uso de otros antimicrobianos más recientes como la daptomicina o el linezolid (Tyson *et al.*, 2018).

La resistencia adquirida a los antimicrobianos se debe principalmente por la presencia de genes de resistencia. La resistencia a un mismo antibiótico puede estar asociada a uno o varios genes que pueden ser transferidos entre bacterias por un mecanismo llamado transferencia horizontal de genes (conjugación, transformación y transducción).

Los plásmidos representan la mayor fuente de diseminación de genes de resistencia debido a la presencia de elementos genéticos móviles (transposones). Sin embargo, la resistencia a antimicrobianos puede estar determinada por otros factores no genéticos tales como un aumento de la permeabilidad a un determinado antimicrobiano, un aumento de la hidrólisis de este o por la alteración del sitio diana del antimicrobiano por mecanismos postraduccionales (Becerra *et al.*, 2009).

Cabe destacar que un control de la cadena del frío durante el almacenamiento y transporte, y un proceso de congelación no es suficiente para conseguir eliminar estos microorganismos y, por tanto, no garantiza la inocuidad de los productos.

En la siguiente tabla se resumen los principales mecanismos de acción de los distintos antibióticos empleados en la industria avícola (Mund *et al.*, 2017)

Tabla 1. Mecanismos de resistencias de las principales familias de antimicrobianos utilizados en la industria avícola.

FAMILIA DE ANTIMICROBIANOS	ANTIBIÓTICOS	MECANISMOS DE ACCIÓN
β-Lactámicos	Amoxicilina, penicilina, cefalosporinas, ampicilina y carbapenem.	Inhibición de la división bacteriana, alteración de la pared celular e inhibición de la transpeptidasa.
Quinolonas/Fluoroquinolonas	Ácido nalidíxico, ácido oxolínico, norfloxacin y ciprofloxacino.	Inhibición de las ADN girasas implicadas en la replicación y reparación del ADN.
Tetraciclinas	Tetraciclina, clortetraciclina y tigeciclina.	Inhibición de la síntesis proteica.
Fenicoles	Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol.	Inhibición de la síntesis proteica.
Macrólidos	Eritromicina, tilosina y espiramicina.	Inhibición de la síntesis proteica por competencia con la subunidad ribosómica 50S.
Aminoglucósidos	Neomicina, kanamicina y gentamicina	Inhibición irreversible de la síntesis proteica.

Fuente: Mund *et al.* (2017).

El género de bacterias grampositivas, *Enterococcus*, está compuesto por dos especies comensales intestinales que están presentes en la microbiota del ser humano y en la de otras especies de vertebrados, *E. faecalis* y *E. faecium*. Debido a esto, los enterococos son utilizados como marcadores de contaminación fecal en alimentos.

Los enterococos son resistentes a antimicrobianos de uso común, como a las cefalosporinas. Por ello, un consumo habitual e inadecuado de este tipo de antibióticos permite una gran multiplicación de enterococos en el tracto intestinal, debido a la reducción de la competencia. El aumento poblacional de enterococos propicia el desarrollo de infecciones causadas por estos microorganismos.

La multiresistencia a antimicrobianos es el principal factor que aumenta la morbilidad y mortalidad por infecciones de las especies pertenecientes al género *Enterococcus*. Por esta razón y debido a que los enterococos transmitidos por alimentos pueden conferir genes de resistencias a patógenos tales como *Campylobacter*, *Listeria* y *E. coli*, la Organización Mundial de la Salud advierte de la necesidad de realizar programas de monitoreos de la resistencia a antimicrobianos (Tyson *et al.*, 2018).

La sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos se puede determinar por varios métodos, pero entre todos ellos, cabe destacar que la prueba de susceptibilidad agar-difusión en discos en medio de cultivo sólido, se trata de la técnica de microbiología más utilizada en laboratorios para determinar la resistencia fenotípica a antimicrobianos.

Las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos se deben realizar sobre cada uno de los microorganismos aislados de una muestra clínica, es decir a partir de una cepa aislada. Se debe evitar realizar el antibiograma de forma directa a partir del material clínico, excepto en caso de emergencia donde la tinción de GRAM indique que sólo hay presencia de una sola bacteria.

Es importante tener en cuenta que las pruebas de sensibilidad por difusión donde sólo se observa la presencia o ausencia de zonas de inhibición sin tener en cuenta el tamaño de los halos no son aceptables. La medida de los halos y la determinación de la sensibilidad o resistencia de las cepas siguiendo las directrices que ya están establecidas en las tablas, es decir, respetando la metodología estandarizada, es la única manera de obtener resultados fiables en las pruebas de difusión. Esta es la única forma en la que los diámetros de inhibición se correlacionan con las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) para cepas con sensibilidad o resistencia conocida a los distintos antibióticos.

Cuando se dice que una cepa es sensible, significa que la infección dada por la cepa en estudio se puede tratar apropiadamente con la dosis de antibiótico recomendada para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que haya contraindicaciones.

Por el contrario, cuando se dice que una cepa es resistente, hace referencia a que estas cepas no son inhibidas por las concentraciones alcanzadas a dosis habituales y/o caen en el rango donde son comunes mecanismos específicos de resistencia microbiana (por ejemplo, β -lactamasas) y la eficacia clínica no ha sido comprobada.

Finalmente, si la medida del halo con respecto a las tablas de referencia determina que la cepa es intermedia, significa que las cepas pueden ser inhibidas a concentraciones de antibiótico más elevadas, siempre que sea posible aumentar la dosis.

Por otro lado, la detección de los genes que confieren resistencia a los antibióticos se realiza mediante una técnica muy utilizada, la PCR, que se trata de una técnica con alta fiabilidad, en la que se utilizan cebadores específicos para su visualización en geles de electroforesis (Yassin et al. 2017).

Con esta técnica, es posible determinar la existencia o no de genes de resistencia en las cepas analizadas, gracias a la visualización de una serie de bandas en el gel de electroforesis que corresponden al tamaño del amplicón característico de cada gen, de manera que es posible conocer cuál es el gen de resistencia que posee cada una de las cepas analizadas.

Es importante destacar que en algunos casos las bacterias pueden poseer el gen de resistencia a un cierto antibiótico, pero no lo expresan. Es decir, es posible que, en algunos casos, una cepa de *Enterococcus* spp. que sea sensible a un determinado antibiótico, realmente sí que posee el gen de resistencia a ese mismo antibiótico cuando se realiza la prueba de la PCR y se visualiza la banda correspondiente al tamaño de amplicón de ese gen en el gel de electroforesis.

Por último, una alternativa al uso de antimicrobianos sería establecer medidas veterinarias para prevenir o controlar las enfermedades infecciosas, adoptar mejores prácticas de manejo, cuarentenas, vacunaciones y otras medidas de bioseguridad. Además, también son de gran relevancia los tratamientos que incluyen la selección genética para mejorar la resistencia a las enfermedades, el uso de antisépticos, el control de vectores y el uso de probióticos y otros medicamentos competitivos (Wills RW, Gray JT, Fedorka-Cray PJ, et al., 2000).

2. OBJETIVOS

Las autoridades europeas de seguridad alimentaria (EFSA) y de prevención y control de enfermedades (ECDC), advierten del peligro de la transmisión transversal de resistencias a antimicrobianos entre las distintas bacterias comensales que encontramos en los alimentos. Entre otros, se designa el estudio de cepas de *Enterococcus* spp como indicador del nivel de resistencias que se puede encontraren los productos cárnicos.

La aparición en la cadena alimentaria de cepas bacterianas multirresistentes de especies pertenecientes al género *Enterococcus* pone en peligro la seguridad e inocuidad de los productos avícolas destinados a consumo humano, por ello, nuestros objetivos fueron:

- I. Recuento y aislamiento de *Enterococcus* spp. a partir de 30 muestras cárnicas de productos avícolas (hígados, carcasas y mollejas de pollo) destinados a consumo humano procedentes de diferentes comercios de Valencia.
- II. Estudiar y analizar las resistencias fenotípicas de estos microorganismos aislados frente a 8 antibióticos distintos de interés clínico, mediante la técnica de antibiograma en medio de cultivo sólido para determinar si son sensibles o resistentes a distintas familias de antimicrobianos.
- III. Detectar y analizar la presencia de genes de resistencia mediante técnicas específicas de análisis, como la PCR, mediante la cual es posible averiguar si las cepas analizadas poseen o no el gen que les dota de resistencia para un determinado tipo de antibiótico.
- IV. Comprobar si coinciden los resultados obtenidos del análisis del perfil fenotípico y genotípico de las cepas de *Enterococcus* spp.
- V. Calcular la tasa de multiresistencia de las cepas de *Enterococcus* spp. frente a distintos antimicrobianos analizados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO, AISLAMIENTO Y RECuento DE LOS MICROORGANISMOS.

En este estudio, se han analizado un total de 30 muestras procedentes de pollos (hígados, carcasas y mollejas) que fueron compradas entre abril y diciembre de 2018 en diferentes comercios situados en Valencia (España). Todas las muestras se compraron frescas, pero luego se mantuvieron refrigeradas durante 24h hasta su análisis o congeladas, si se compraron anteriormente y el análisis no se hizo hasta transcurrido un cierto tiempo.

Los detalles de las 30 muestras analizadas están disponibles en la tabla 6 del anejo 1 del presente documento, donde se indica el número de la muestra, el tipo, comercio y las fechas más importantes.

Para proceder a la realización del análisis, las muestras fueron cortadas asépticamente. Para ello fue necesaria una bolsa Stomacher estéril y con la ayuda de unas pinzas y un bisturí previamente flameados con alcohol del 96%, se pesaron en una balanza 10 gramos de cada una de las muestras de pollo y se depositaron en la bolsa Stomacher a la que se añadieron, posteriormente 90 mL de agua de peptona tamponada (Scharlau, España). A continuación, las bolsas se introdujeron en un homogeneizador de paletas durante 2 o 3 minutos.

Cabe destacar que la muestra debe tomarse de distintos sitios del hígado, molleja o carcasa para que sea homogénea y representativa a la hora de obtener los resultados del análisis.

Una vez bien homogeneizadas las muestras, se procedió a la realización de la siembra en placas de agar mediante cultivo en superficie. Para ello, las placas con el agar correspondiente deben haberse preparado anteriormente.

En primer lugar, se rotula y se prepara todo el material necesario para realizar el procedimiento de análisis de las muestras cárnicas.

En este caso se necesitaron tubos de agua destilada para realizar las diluciones, puntas paja con pipeta para tomar la muestra de la bolsa Stomacher y proceder a realizar sucesivas diluciones en tubos, gradilla para colocar los tubos, vortex para homogeneizar las diluciones, placas Petri con el agar correspondiente (Slanetz y Bartley (Scharlau, España) para *Enterococcus spp.*, asas de Digralsky para extender la muestra en la superficie de la placa, un bote para desechar material y el mechero Bunsen siempre encendido durante todo el procedimiento.

La bolsa Stomacher, con 10 g de muestra más 90 mL de agua de peptona, es la dilución 10^{-1} . A partir de ésta, se realizaron las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , cogiendo 1 mL de la bolsa Stomacher en 9 mL de agua destilada estéril en un tubo, para obtener la dilución 10^{-2} tras homogeneizar bien el tubo en el vortex. A continuación, se coge 1 mL del tubo 10^{-2} y se pasa a otro tubo con 9 mL de agua destilada estéril y se homogeneiza para obtener la dilución 10^{-3} .

Al mismo tiempo de realizar las diluciones, se sembró en superficie con 0,1 mL de cada una de las diluciones 10^{-1} (bolsa stomacher), 10^{-2} y 10^{-3} (tubos) en las placas con el medio de cultivo para *Enterococcus* spp. 48h a 37°C en medio Slanetz y Bartley (Scharlau, España).

Tras la incubación y observación del crecimiento de colonias en las placas, una colonia con morfología típica de *Enterococcus* spp. fue aislada a partir de cada una de las muestras analizadas para confirmar su identificación.

La confirmación bioquímica se realiza por la hidrólisis de la esculina para cada una de las colonias con morfología típica aisladas. Lo que se hizo fue sembrar en medio de cultivo Kanamicina – esculina cada una de las colonias típicas y observar la aparición de color negro tras incubar 2 h a 44 °C, que confirma que se trata de *Enterococcus* spp.

El recuento de microorganismos se realizó llevando a cabo, para cada muestra, una dilución seriada hasta la concentración 10^{-3} .

El número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) se calcula mediante el uso de la ecuación (a), utilizando las placas que contengan entre 15 y 150 colonias. En caso de que la dilución menor contenga menos de 15 colonias se asume que el total de UFC es inferior a $1,5 \times 10^3$ y, si la dilución mayor contiene más de 150 colonias, se asume que la cantidad de microorganismos es mayor a $1,5 \times 10^6$ UFC/gramo.

La fórmula usada para calcular el recuento de microorganismos es la que se muestra a continuación:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) d} \quad (a)$$

Donde: N es el número de UFC, $\sum C$ es la suma de las colonias de todas las placas, n_1 y n_2 son el número de placas que se cuentan en la primera y segunda dilución, d es el factor de dilución de n_1 y V el volumen del inóculo aplicado en placa.

De estas 15 muestras que dieron positivo en el crecimiento de enterococos, se escogieron 40 colonias características de enterococos de entre todas las placas crecidas para el estudio de los genes de resistencia, para tomar una muestra representativa.

Las cepas aisladas fueron conservadas en nevera en tubos de agar inclinado de Plate Count de un día o dos de incubación a 37°C, para posteriores estudios.

3.2 TEST DE SENSIBILIDAD FENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS.

La sensibilidad fenotípica a antimicrobianos fue analizada para las 40 cepas aisladas de *Enterococcus* spp. En este caso, se probaron 8 antimicrobianos diferentes: Eritromicina (15 µg), Vancomicina (30 µg), Quinupristin/ Dalfopristin (15 µg), Ampicilina (10 µg), Tetraciclina (30 µg), Cloranfenicol (30 µg), Ciprofloxacino (5 µg) y Amoxicilina con Ácido Clavulánico (3 µg), siguiendo las concentraciones recomendadas por el CLSI (2015).

Para dicho análisis se necesitó resembrar para obtener cultivos jóvenes, las cepas en medio Plate Count, de manera que se incubaron 4 cepas por cada placa de Plate Count (PC) durante 24h.

A continuación, se sembraron dos placas de Mueller-Hinton (MH) por cada cepa. El agar MH se considera el mejor de los medios disponibles para las pruebas de sensibilidad de rutina porque es adecuado para el desarrollo de la mayoría de bacterias patógenas, tiene bajo contenido de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina, y demuestra buena reproducibilidad.

Es importante controlar el pH y la humedad del medio MH, de manera que el medio contenga un pH entre 7,2 y 7,4 a temperatura ambiente y no presente exceso de humedad en la superficie. Si esto ocurriera, se deben colocar abiertas en la estufa a 35°C o en una cabina de flujo laminar de 10 a 30 min para que pierdan ese exceso de humedad superficial que da lugar a la presencia de gotas de agua de condensación.

Para sembrar las cepas en medio MH, se necesitó un tubo de NaCl al 85% en agua estéril, en el cual se inoculó colonias de la placa de PC hasta conseguir la turbidez deseada igual a la escala 0.5 de Mc Farland. Posteriormente, se humedece un hisopo con la suspensión del tubo y se siembra toda la placa de MH en tres direcciones (vertical, horizontal y perpendicular) rotando la placa 60° cada vez para asegurar una completa distribución del inóculo por toda la placa.

Finalmente, se colocan los discos de antibióticos con ayuda de un dispensador de discos automático (Oxoid, Reino Unido). En todos los casos, es conveniente colocar un disco con zona de inhibición predeciblemente pequeña (ej. vancomicina o gentamicina) próximo a otro con zona de inhibición predeciblemente grande (cefalosporinas) a fin de evitar superposiciones de las zonas de inhibición. Independientemente de la cantidad de discos colocados se debe evitar colocarlos muy próximos al borde de la placa ya que no se obtendrán las zonas de inhibición circularmente completas.

Los discos de antibióticos se deben adquirir a proveedores confiables y se debe solicitar un certificado de análisis que garantice la carga de los discos, el número de lote y que son aptos de acuerdo a los parámetros establecidos para los distintos microorganismos recomendados para el control de calidad.

Es importante que los discos de antibiogramas (ATB) deben conservarse refrigerados y los dispensadores de dichos discos también.

Se colocaron 4 antibióticos en cada una de las dos placas de MH sembradas y se incubaron a 37°C durante 24h o 48h hasta que se puedan observar claramente y medir los halos con un pie de rey o una regla, incluyendo el diámetro del disco en la medida (Ilustración 1). Los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento fueron medidos e interpretados de acuerdo con los límites recomendados por el CLSI. Las cepas analizadas fueron clasificadas como sensibles o resistentes, y los aislados con una sensibilidad intermedia fueron consideradas como sensibles.

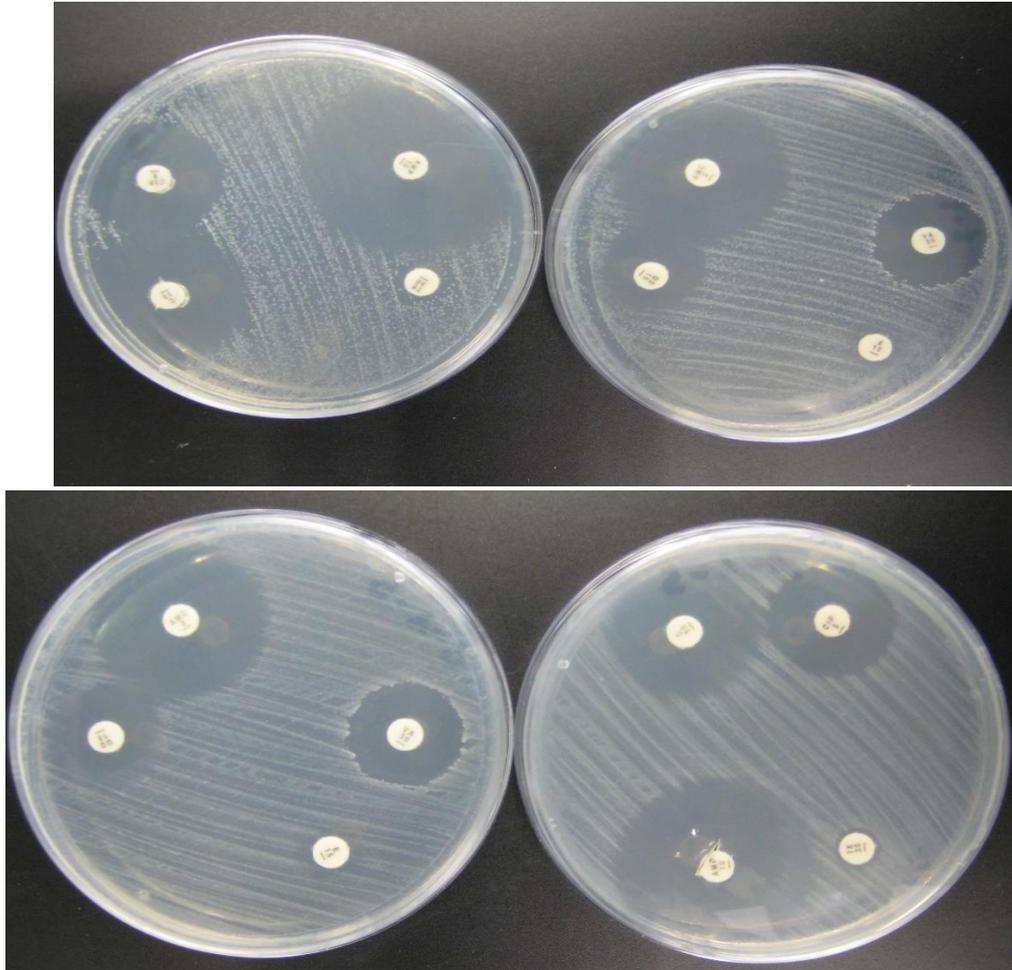


Ilustración 1. Ejemplos de los resultados de los análisis de resistencia fenotípica utilizando el método agar-difusión en placa.

En ambas imágenes se pueden observar los halos de resistencia-susceptibilidad de 2 cepas de *Enterococcus spp.* frente a 8 antimicrobianos diferentes (4 en cada placa).

En el apartado de Resultados y Discusión se utilizará la terminología acuñada por Knezevic y Petrovic (2008). Por lo tanto, dependiendo del porcentaje de colonias resistentes para cada antibiótico se separarán en 5 ratios: ratio de resistencia muy alta (<75% de colonias resistentes), ratio alta (50-75%), ratio moderada (30-50%), ratio baja (10-30%) y ratio muy baja (0-10%).

Las colonias aisladas que presentaron resistencia fenotípica a tres o más familias de antimicrobianos fueron designadas como cepas multirresistentes.

3.3 ANÁLISIS DE LA SUSCEPTIBILIDAD GENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS.

3.3.1. Extracción del ADN.

El ADN de las cepas de *Enterococcus* spp. fue extraído utilizando el kit comercial *Realpure Spin Food Stool Bacterias* (Real Biotech, Taiwan) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso de los enterococos, siguiendo las instrucciones de dicho kit, se introdujo en un pellet 300 µl de Tampón de Reacción Lisozima (REA08). A continuación, se inocularon con un asa las colonias de las cepas a estudiar. Luego, se añadió 20 µl de Lisozima, se resuspendió bien y se incubó a 37°C durante 30 min en un termobloque.

Transcurrido este tiempo, se añadieron 300 µl de Tampón de Lisis / Unión (REA01) y 20 µl de Proteínasa K, se mezcló bien y se incubó a 70°C durante 10 minutos en otro termobloque. Seguidamente, se añadieron 150 µl de Isopropanol y tras resuspender bien, se centrifugó a 14.000 r.p.m durante 60 segundos.

Tras acabar el periodo de centrifugación, se añadió el sobrenadante en el reservorio de una Spin microcolumna con su tubo de recogida y se centrifugó a 8.000 r.p.m durante 60 segundos. Cuando finalizó esta etapa, se eliminó el tubo de recogida y se colocó la MicroSpin columna en un nuevo tubo de recogida. A continuación, se añadió al reservorio 500 µl de Tampón de Desinhibición (REA03) y se centrifugó de nuevo a 8.000 r.p.m durante 60 segundos.

Tras la centrifugación, se vació el líquido que quedó en el tubo de recogida y así sucesivamente tras cada centrifugación para reutilizar el tubo en las siguientes etapas del proceso.

El siguiente paso fue añadir 500 µl de Tampón de Lavado (REA04) en el reservorio de la Spin microcolumna y centrifugar otra vez a 8.000 r.p.m durante 60 segundos. A continuación, se hizo un segundo lavado añadiendo otra vez 500 µl de Tampón de Lavado (REA04) a la Spin microcolumna, pero se centrifugó esta vez a 12.000 r.p.m durante 60 segundos. Seguidamente, se centrifugó a máxima velocidad durante 2 minutos para eliminar el etanol residual. Tras finalizar esta etapa, se eliminó el tubo de recogida y se insertó la Spin microcolumna en un microtubo eppendorf estéril. Se añadieron 100 µl de Tampón de elución (REA05) previamente precalentado a 70°C, en el reservorio de la Spin microcolumna y se incubó durante un minuto en un termobloque.

Finalmente, se centrifugó a máxima velocidad durante 60 segundos y al finalizar la etapa, el microtubo eppendorf ya contiene el DNA bacteriano que se quiere estudiar.

3.3.2. Detección de genes de resistencia.

Para la detección de genes de resistencia en las cepas de *Enterococcus spp.* se utilizó la técnica de PCR, una técnica donde se utilizan cebadores específicos.

Mediante PCR, se estudió la presencia 6 genes de resistencia en las cepas aisladas de *Enterococcus spp.* El volumen final para la detección de todos los genes de resistencia fue de 25 μ L. En cada PCR se incluyeron un control positivo (ADN que contiene el gen de resistencia a detectar) y un control negativo con agua MiliQ estéril.

El estudio de la presencia de genes de resistencia frente a macrólidos se realizó mediante la detección del gen *ermB*, ya que el macrólido más usado es la eritromicina. Para ello, se añadieron 2,5 μ L de ADN de cada cepa a estudiar junto a 22,5 μ L del mix, cuyo contenido fue de 1X solución tampón, 2,5 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada uno de los primers, 1,25 U de taq-polimerasa y 200 mM de cada dNTP.

Las condiciones de la PCR fueron de un ciclo de desnaturalización de 4 min a 94°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 58°C y 45 s a 72°C; finalmente el programa se completó con un ciclo a 72°C durante 7 min.

La presencia de genes de resistencia frente a antimicrobianos de la familia de las tetraciclinas, se realizó mediante PCR múltiple. En esta PCR se analizó la presencia de los genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* y *tetS*. Las concentraciones utilizadas de los reactivos para el mix fueron 1X NH₄ solución tampón (buffer); 2.5 mM de MgCl₂ y 200 mM de cada dNTP. Se utilizaron 1,25 U de taq-polimerasa y diversas concentraciones de los primers (1,25 μ M para *tetK* y *tetO*, 1 μ M para *tetL* y 0,5 μ M para *tetM* y *tetS*). En este caso se añadió 1 μ L de ADN y se completó con 24 μ L de mix hasta llegar a los 25 μ L de volumen final.

Las condiciones de la PCR empleadas para la detección de los genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* y *tetS* fueron un ciclo inicial de 5 min iniciales a 94°C; seguido de 35 ciclos consistentes en 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1:30 min a 72°C; se finalizó con un ciclo de 10 min a 72°C.

Las secuencias de todos los primers utilizados se obtuvieron de TIB MOLBIOL, Alemania, el ADN empleado en cada PCR y el tamaño del amplicón a detectar lo podemos observar en la tabla 2 junto a la referencia consultada.

Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un Termociclador modelo *Mastercycler Pro* (Eppendorf Ibérica, España) y en algunos casos también en otro llamado PTC-100 Peltier Thermal Cyler (MJ Research, España).

3.3.3. Visualización del ADN.

Para la visualización del ADN se llevaron a cabo diversas electroforesis con el objetivo de visualizar en el gel los productos de cada PCR en un transiluminador.

Para ello, se preparó un gel de agarosa 1,2% (Conda, España) con solución TAE 1X. Una vez cargados los geles con los productos de la PCR y tampón de carga 6X (Thermo-Fisher Scientific, EE.UU.), se ajustó el voltaje a 100 y se dejó correr durante 60 minutos aproximadamente.

Transcurrido este tiempo, se visualizó bajo luz UV gracias a un transiluminador (Viber Lourmat, Francia) para visualizar las bandas correspondientes a los genes de resistencia.

Cada una de las bandas posee un tamaño de amplicón diferente, gracias al cual se puede conocer el tipo de gen de resistencia que posee la cepa en estudio. De manera que observando la posición de cada una de las bandas en el gel de electroforesis podemos saber qué gen o genes de resistencia posee esa cepa de *Enterococcus* spp.

Es importante destacar que en muchos casos es posible que posea un determinado gen de resistencia, pero no sea capaz de expresarlo fenotípicamente.

Tabla 2. Genes de resistencias asociadas a familias de antimicrobianos, secuencia de los cebadores, tamaño del amplicón, cepas o medios analizados y referencias.

Familia de antimicrobianos	Gen	Cebadores	Tamaño del amplicon (pb)	Referencias
β-Lactámicos	<i>BLA_{TEM}</i>	5'-TTAACTGGCGAACTACTTAC -3' 5'-GTCTATTTGTTTCATCCATA -3'	247	Kozak <i>et al.</i> (2009) Kozak <i>et al.</i> (2009)
	<i>BLA_{SHV}</i>	5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG -3' 5'-ATTTGCTGATTTGCTCG -3'	393	
	<i>BLA_{CMY-2}</i>	5'-GACAGCCTCTTCTCCACA-3' 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'	1000	Kozak <i>et al.</i> (2009)
Tetraciclinas	<i>TetA</i>	5'-GGCGTCTTCTTCATCATGC-3' 5'-CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA-3'	502	Kozak <i>et al.</i> (2009) Kozak <i>et al.</i> (2009)
	<i>TetB</i>	5'-CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC-3'		
	<i>TetK</i>	5'-CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG-3' 5'-TCGATAGGAACAGCAGTA-3'	173	Ng <i>et al.</i> (2001)
		5'-CAGCAGATCCTACTCCTT-3' 5'-	169	Ng <i>et al.</i> (2001)
	<i>TetL</i>	GTATCCCACCAATGTAGCCG-3' 5'-TCGTTAGCGTGCTGTCATTC-3'	267	
	<i>TetM</i>	5'-GTGGACAAAGGTACAACGAG-3' 5'- CGGTAAGTTCGTCACACAC-3'	406	Ng <i>et al.</i> (2001)
	<i>TetO</i>	5'-AACTTAGGCATTCTGGCTCAC-3' 5'- TCCCCTGTTCCATATCGTCA-3'	515	Ng <i>et al.</i> (2001)
	<i>TetS</i>	5'-CATAGACAAGCCGTTGACC-3' 5'-ATGTTTTTGAACGCCAGAG-3'	667	Ng <i>et al.</i> (2001)
Macrólidos	<i>ErmB</i>	5'-GATACCGTTTACGAAATTGG-3' 5'-GAATCGAGACTTGAGTGTGC-3'	364	Chen <i>et al.</i> (2007)

Siguiendo las indicaciones de esta tabla, podemos determinar a qué gen pertenece cada banda que se visualiza en el gel de electroforesis por el tamaño de amplicón (pb) indicados en la tabla.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RECuento DE MICROORGANISMOS.

El recuento de *Enterococcus* spp. de cada una de las 30 muestras analizadas se muestra en la tabla 3, junto a la fecha en la que se compraron las muestras y el tipo de muestra analizada (hígado, molleja o carcasa de pollo).

Tabla 3. Recuento y detección de microorganismos en muestras cárnicas de pollos (hígados, mollejas y carcasas).

Número de muestra	Tipo	Fecha de compra	Enterococcus spp. (UFC/g)	Presencia de Enterococcus spp.
1	HÍGADO	24/09/2018	$2,4 \cdot 10^5$	SI
2	HÍGADO	01/10/2018	$1,6 \cdot 10^4$	SI
3	HÍGADO	26/09/2018	$4,8 \cdot 10^4$	SI
4	MOLLEJA	26/09/2018	< 15 colonias	NO
5	HÍGADO	03/10/2018	< 15 colonias	NO
6	HÍGADO	12/11/2018	$1,5 \cdot 10^5$	SI
7	CARCASA	12/11/2018	< 15 colonias	NO
8	CARCASA	19/11/2018	> 150 colonias	SI (EXCESO)
9	HÍGADO	19/11/2018	$2,7 \cdot 10^4$	SI
10	HÍGADO	14/11/2018	< 15 colonias	NO
11	CARCASA	14/11/2018	< 15 colonias	NO
12	HÍGADO	26/11/2018	< 15 colonias	NO
13	CARCASA	26/11/2018	$3,8 \cdot 10^4$	SI
14	HÍGADO	14/11/2018	< 15 colonias	NO
15	HÍGADO	28/11/2018	$2,8 \cdot 10^4$	SI
16	HÍGADO	23/04/2018	$4,2 \cdot 10^4$	SI
17	MOLLEJA	12/11/2018	$2,1 \cdot 10^5$	SI
18	CARCASA	26/09/2018	$1,15 \cdot 10^5$	SI
19	CARCASA	24/09/2018	$2,1 \cdot 10^4$	SI
20	CARCASA	03/11/2018	< 15 colonias	NO
21	CARCASA	28/11/2018	$7,6 \cdot 10^4$	SI
22	MOLLEJA	10/12/2018	$6,6 \cdot 10^4$	SI
23	CARCASA	03/10/2018	< 15 colonias	NO
24	CARCASA	01/10/2018	< 15 colonias	NO
25	HÍGADO	12/12/2018	< 15 colonias	NO
26	HÍGADO	10/12/2018	$2 \cdot 10^4$	SI
27	HÍGADO	21/11/2018	< 15 colonias	NO
28	MOLLEJA	10/12/2018	< 15 colonias	NO
29	MOLLEJA	03/10/2018	< 15 colonias	NO
30	CARCASA	10/12/2018	< 15 colonias	NO

Se detectaron cepas de *Enterococcus* spp. en 15 de las 30 muestras analizadas, lo que representa un 50%. Este porcentaje puede ser explicado debido a que estos microorganismos forman parte de la microbiota intestinal normal de las aves de corral (Yassin *et al.*, 2017).

Además, y a diferencia de *E. coli*, cuyos límites máximos se encuentran más controlados en alimentos cárnicos, la carga microbiana del género *Enterococcus* spp. no está controlada para este tipo de productos. Este puede ser el motivo por el cual se muestran recuentos heterogéneos en las muestras analizadas.

Las 15 muestras positivas dieron como resultado un recuento heterogéneo que varía desde menos de $1,6 \times 10^4$ hasta $2,4 \times 10^5$ UFC/g. De estas 15 muestras que dieron positivo en el crecimiento de enterococos, se escogieron 40 colonias características de enterococos para las pruebas de resistencia.

4.2. ANÁLISIS DE RESISTENCIA FENOTÍPICA.

Los resultados del análisis de resistencia fenotípica de *Enterococcus* spp. frente a los antimicrobianos probados se muestran en los anejos 2-4 del presente documento.

En la tabla 4 se dispone un resumen de ellos indicando tanto el número de cepas aisladas resistentes como el porcentaje. Además, se muestra el número y el porcentaje de cepas multirresistentes.

TABLA 4. Resistencia fenotípica de *Enterococcus* spp. a los antimicrobianos testados.

ANTIMICROBIANOS	<i>Enterococcus</i> spp. (N=40)	Ratio de resistencia	Terminología
Tetraciclina n(%)	34 (85%)	Muy alta	Knezevic y Petrovic (2008)
Ampicilina n(%)	2 (5%)	Muy baja	Knezevic y Petrovic (2008)
Amoxicilina + Ácido Clavulánico n(%)	0 (0%)	Muy baja	Knezevic y Petrovic (2008)
Eritromicina n(%)	33 (82,5%)	Muy alta	Knezevic y Petrovic (2008)
Ciprofloxacino n(%)	14 (35%)	Moderada	Knezevic y Petrovic (2008)
Cloranfenicol n(%)	4 (10%)	Muy baja	Knezevic y Petrovic (2008)
Vancomicina n(%)	0 (0%)	Muy baja	Knezevic y Petrovic (2008)
Quinupristin/Dalfopristin n(%)	6 (15%)	Baja	Knezevic y Petrovic (2008)
Multiresistencia n (%) cepas con resistencia a 3 o más antibióticos	19 (47,5%)		

Para interpretar los resultados de la resistencia fenotípica de *Enterococcus spp.* se utilizará la terminología acuñada por Knezevic y Petrovic (2008). Por lo tanto, dependiendo del porcentaje de colonias resistentes para cada antibiótico se separarán en 5 ratios: ratio de resistencia muy alta (>75% de colonias resistentes), ratio alta (50-75%), ratio moderada (30-50%), ratio baja (10-30%) y ratio muy baja (0-10%).

4.2.1. Resistencia fenotípica en *Enterococcus spp.*

En el caso de *Enterococcus spp.*, de las 40 cepas aisladas, dos de ellas son sensibles a todos los antimicrobianos, representando un 5%.

Tetraciclina fue el antimicrobiano con una ratio mayor de cepas resistentes con un 85%. Esta ratio supera los valores obtenidos en un estudio previo, 67 y 53%, en el cual se determinó la resistencia para *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente (Tyson *et al.*, 2018). Sin embargo, en otro estudio realizado en Turquía, los valores de resistencias obtenidos son menores representando el 9% de las cepas aisladas. Tanto la tetraciclina como la amoxicilina combinada con el ácido clavulánico no son el tratamiento habitual para combatir infecciones por enterococos en humanos, sin embargo, la alta transferencia de genes de resistencias relacionados con estos antimicrobianos a otras especies hace fundamental el análisis de susceptibilidad (Sanlibaba *et al.*, 2018).

El segundo antimicrobiano con mayor resistencia fue la eritromicina con un porcentaje del 82,5%.

Dos antimicrobianos obtuvieron una ratio muy baja de resistencia, ampicilina con un porcentaje de tan solo un 5% y cloranfenicol con un porcentaje de 10%.

La ampicilina destaca al haber una diferencia notable entre nuestros resultados y los encontrados en la bibliografía, en esos estudios sitúan el porcentaje entre un 30 y 61% (Sanlibaba *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2007). La gran diferencia encontrada con este antimicrobiano y otros puede ser explicada a que en nuestro estudio se analizó un número bajo de cepas de *Enterococcus spp.*

Por otro lado, en el caso del cloranfenicol, se detectaron cepas resistentes a cloranfenicol en una ratio muy baja, comprendiendo valores situados entre un 1% en EE.UU. (Tyson *et al.*, 2018) hasta un 5% en España (Miranda *et al.*, 2007). Este fármaco se usa en medicina animal en baja frecuencia y su uso como tratamiento de enterococos se limita a circunstancias donde el uso de otros antimicrobianos es imposible (Tyson *et al.*, 2018).

Además, vancomicina y amoxicilina combinada con ácido clavulánico no presentaron ninguna cepa resistente al antibiótico. La vancomicina muestra un porcentaje de sensibilidad total al igual que en todos los estudios consultados. La no detección de cepas resistentes a vancomicina en muestras de pollos es debido a que nunca se han usado en animales, sin embargo, en cepas

aisladas a partir de muestras clínicas superan en países como EE.UU. el 80%. Esto parece indicar que la resistencia a este antimicrobiano es causada por el consumo de este antimicrobiano en humanos y, por tanto, está limitada a hospitales y otras instalaciones similares (Tyson *et al.*, 2018; Sanlibaba *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2007).

Por otro lado, quinupristin/dalfopristin presentó una resistencia baja con un 15%. En otros estudios, *E. faecalis* es considerado como resistente intrínsecamente a quinupristin/dalfopristin y los resultados obtenidos en estudios previos realizados en EE.UU. muestran una resistencia en *E. faecium* superior al 40% (Tyson *et al.*, 2018). El motivo de esta alta resistencia se debe por una resistencia cruzada con la virginiamicina, antimicrobiano de la misma familia utilizado durante muchos años como promotor del crecimiento. Sin embargo, estos valores están muy por encima a los obtenidos en el presente estudio, lo cual es un aspecto positivo puesto que recientemente se ha aprobado su uso para tratar infecciones por *Enterococcus* spp. multirresistentes. A consecuencia de esto, el uso de la virginiamicina como promotor del crecimiento se ha prohibido en Europa (Soltani *et al.*, 2000).

Finalmente, en el caso del ciprofloxacino se obtuvo un porcentaje del 35%, que corresponde a una ratio de resistencia moderado. Con respecto al ciprofloxacino, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos en otros estudios previos realizados en el norte de España y EE.UU., los cuales detectaron una resistencia ligeramente superior dentro de la ratio baja (<30%).

Los resultados obtenidos muestran unos valores de resistencia relativamente bajos que contrastan con los resultados obtenidos por Guerrero-Ramos *et al.* (2018). En este estudio se comprobó las resistencias de cepas de enterococos aisladas a partir de productos preparados de pollo. Todas las cepas aisladas fueron multirresistentes y las ratios fueron altas (100% a eritromicina, 90% al quinupristin/dalfopristin, 82% a ciprofloxacino y cloranfenicol, 37% a tetraciclina y 34% a ampicilina). Estos resultados muestran que la manipulación puede transferir y contaminar los alimentos a base de pollo, incorporando cepas resistentes a antimicrobianos.

En uno de los estudios que se realizaron se concluyó que existen diferencias significativas entre las cepas resistentes a ambos antimicrobianos entre pollos ecológicos y convenciones. Los porcentajes de resistencias son mayores en muestras de pollos convencionales debido al uso de estos antimicrobianos en la industria avícola (Tyson *et al.*, 2018; Miranda *et al.*, 2007).

La tasa de cepas multirresistentes fue de 47,5%, porcentaje superior al obtenido por Miranda *et al.* en 2007 en una investigación realizada en España. El equipo de investigadores obtuvo un porcentaje de cepas multirresistentes del 33,3%. Otras investigaciones realizadas en otros países muestran un porcentaje de resistencia mayor de hasta el 98% en Turquía o EE.UU. (Sanlibaba *et al.*, 2018; Tyson *et al.*, 2018), estos porcentajes se obtuvieron analizando un número superior a 12 antimicrobianos. Sin embargo y al igual que ocurría con *E. coli*, el porcentaje de cepas multirresistentes en países del norte de Europa no supera el 5% incluso cuando se analizaba un número de antimicrobianos superior al del presente estudio (Bortolaia *et al.*, 2016).

4.3. ANÁLISIS DE RESISTENCIA GENOTÍPICA.

Los resultados del estudio de 6 genes diferentes que confieren resistencia a 2 familias de antimicrobianos se muestran en el anejo 2 del presente documento. Además, estos resultados se resumen en la tabla 5. En ella, aparecen tanto el análisis genético de las cepas fenotípicamente resistentes a los antimicrobianos como el de las cepas sensibles.

TABLA 5. Resultados del análisis de la presencia de 6 genes de resistencia en cepas de *Enterococcus* spp.

Antimicrobianos (n=cepas analizadas)	Gen probado	Cepas fenotípicamente resistentes de <i>Enterococcus</i> spp. NGR (%)	Gen probado	Cepas fenotípicamente sensibles de <i>Enterococcus</i> spp. NGR (%)
Eritromicina (n=40)	ErmB +	33 (100%)	ErmB +	7 (100 %)
	ErmB -	0 (0%)	ErmB -	0 (0%)
	Cepas analizadas	33	Cepas analizadas	7
Tetraciclina (n=40)	Tet (K)+	0 (0%)	Tet (K)+	1 (16,7%)
	Tet (L)+	0 (0%)	Tet (L)+	0 (0%)
	Tet (M)+	19 (55,9%)	Tet (M)+	0 (0%)
	Tet (O)+	0 (0%)	Tet (O)+	0 (0%)
	Tet (S)+	0 (0%)	Tet (S)+	0 (0%)
	Tet (L)+ Tet (M)	0 (0%)	Tet (L)+ Tet (S)	0 (0%)
	Tet (K)+ Tet (L)+ Tet (M)	0 (0%)	Tet (M)+ Tet (S)	0 (0%)
	Tet (K) + Tet (M)	10 (29,4%)	Tet (K) + Tet (M)	1 (16,7%)
	Todos negativos	5 (14,7%)	Todos negativos	4 (66,7%)
Cepas analizadas	34	Cepas analizadas	6	

Las resistencias a macrólidos (eritromicina) y a estreptograminas B (quinupristin/dalfopristin) está relacionada con la adquisición de genes de resistencias, entre los que destaca el gen ermB, por ser el más estudiado.

Con respecto a la eritromicina, hemos podido observar que el 100% de las cepas resistentes fenotípicamente presentaban el gen. Este gen codifica una fosfotransferasa que degrada estos antimicrobianos, por lo que no queda claro por qué no todos los aislados resistentes a eritromicina fueron resistentes a quinupristin/dalfopristin.

Estudios previos indican la posibilidad de que el gen actúe mediante diferentes mecanismos de resistencia (Tyson et al., 2018). Los estudios de Soltani et al. (2000) muestran que un 18% de las cepas resistentes a quinupristin/dalfopristin no presentaban el gen ermB, lo que parece indicar que existen otros genes, como vat(D) y vat(E), pueden ser también responsables de la resistencia a este antimicrobiano. Estos estudios sugieren que la resistencia a quinupristin/dalfopristin dependa de la presencia de varios genes.

La resistencia a tetraciclina en microorganismos Grampositivos, como *Enterococcus* spp., está relacionada con la presencia de los genes tet(K), tet(L), tet(M), tet(O) y tet(S).

El gen tet(M) sintetiza una proteína encargada de unirse a los ribosomas, impidiendo la acción del antimicrobiano. Los genes tet(K) y tet(L) sintetizan proteínas transmembranas cuya actividad es el transporte activo del antimicrobiano.

Las cepas resistentes presentaron en un 0% los genes tet(L) y tet(K). Sin embargo, las cepas sensibles presentaron el gen tet(L) en un 0% también, pero el gen tet(K) obtuvo un porcentaje de 16,7%.

Estudios previos revelan que el proceso de resistencia está regulado por la presencia de dos genes: uno que codifica una bomba de expulsión activa y otra que codifica una proteína represora (Marti *et al.*, 2006). Por esta razón, la mayoría de las cepas resistentes presentaban los genes tet(M) simultáneamente con los genes tet(K) o tet(L).

Otros estudios muestran la eficacia de la combinación de ambos genes (Guerrero-Ramos *et al.*, 2016). La combinación de la proteína protectora sintetizada por tet(S) junto a la proteína transportadora sintetizada por tet(L) o con la proteína protectora sintetizada por tet(M) no parecen conferir resistencia a la tetraciclina, puesto que fue encontrada en el 25% de las cepas sensibles. Esta combinación no fue encontrada en ninguna cepa resistente a tetraciclina en el estudio elaborado por Novais *et al.* (2012).

Para todos los geles que se prepararon se utilizó un marcador de 100pb para leer las bandas

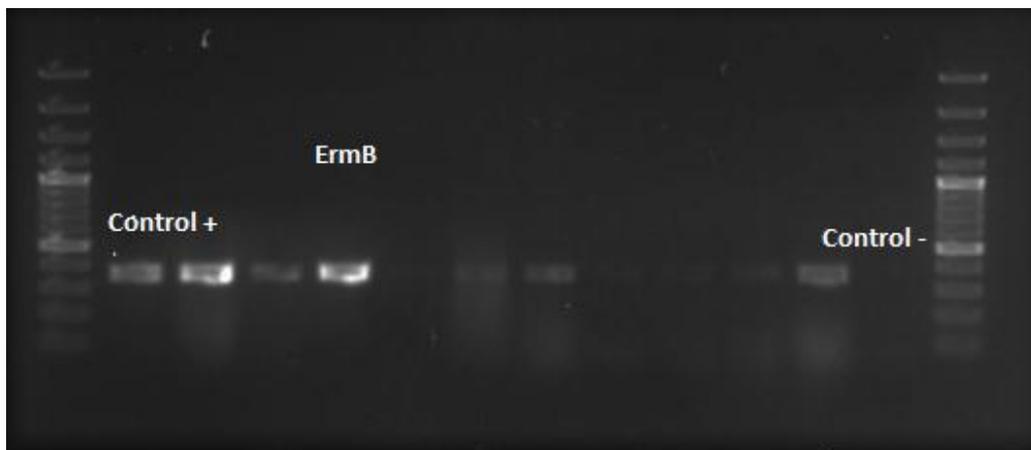
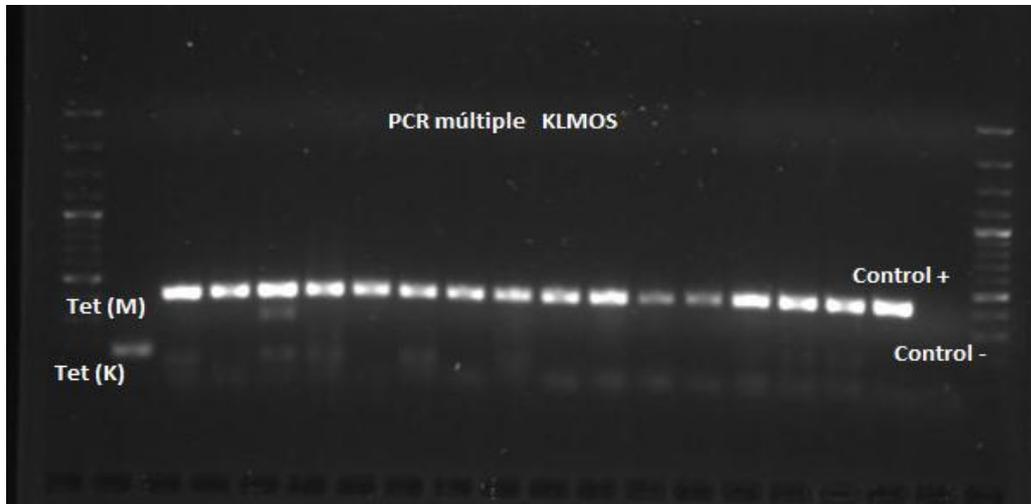


Ilustración 2. Ejemplos de los resultados de la detección de genes de resistencia mediante la visualización por electroforesis del ADN amplificado en la PCR simple.

En esta imagen se observa una amplificación del gen ErmB, en el cual se observan bandas de 364 pb. Las muestras 1,2,3,4,7 y 11 son positivas claramente, es decir, que poseen el gen. El resto son dudosas porque la banda se observa muy difuminada, pero finalmente se han considerado positivas también al compararlas con el control negativo, ya que en ese no se observa absolutamente nada en comparación con el resto.

Ilustración 3. Ejemplos de los resultados de la detección de genes de resistencia mediante la visualización por electroforesis del ADN amplificado en la PCR múltiple.



En esta otra imagen se observa una amplificación de los genes Tet M y Tet K, en el cual se observan las bandas de 406 y 169 pb. Como se puede observar en la imagen, todas las muestras presentan el gen Tet M (406 pb) excepto la primera, en la que sólo se observa claramente que presenta una amplificación del Tet K (169 pb). En otros casos como por ejemplo en la muestra 4 y 5 también se observa una amplificación del Tet K, aunque las bandas se observan muy difuminadas en la imagen.

Por otro lado, cabe destacar que en la muestra 4 se observa una ligera banda en 300 y pico que resulta un poco dudosa porque no sabríamos a qué puede deberse exactamente este resultado, pero el tamaño de amplicón corresponde con el gen ErmB.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de múltiples estudios realizados alrededor del mundo muestran que las aves de corral son una de las principales fuentes de diseminación de cepas multirresistentes de *Enterococcus* spp.. Estas cepas pueden aparecer en la cadena alimentaria y provocar graves infecciones en humanos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio realizado en muestras de pollos destinadas al consumo humano son:

- La detección de *Enterococcus* spp. está presente en la mayoría de las muestras independientemente del tipo o el comercio.
- Destaca que las cepas de *Enterococcus* spp. eran resistentes a tetraciclina con un 85% y presentaron una sensibilidad total frente a la vancomicina y amoxicilina combinada con ácido clavulánico.
- La resistencia a tetraciclina de las cepas de *Enterococcus* spp.. se debe a la expresión de dos genes simultáneos. El gen tet(M) y la combinación del gen tet(M) con el tet(K).
- ErmB confiere resistencia frente eritromicina, pero no frente quinupristin/dalfopristin.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- BECERRA, G., PLASCENCIA, A., LUÉVANOS, A., DOMÍNGUEZ, M., & HERNÁNDEZ, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 29(2), 7076.
- BORTOLAIA, V., ESPINOSA-GONGORA, C., & GUARDABASSI, L. (2016). Human health risks associated with antimicrobial-resistant enterococci and *Staphylococcus aureus* on poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 130-140.
- CHEN, J., YU, Z., MICHEL, F. C., WITTUM, T., & MORRISON, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4407-4416.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, CLSI (2015). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. *CLSI document M02-A12. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute (12th edition)*.
- DIAL GD, WISEMAN BS, DAVIS PR, ET AL. Strategies employed in the USA for improving the health of swine. *Pig News and Information* 1992; 13:111–23.
- FRANCIA MV. Enterococcus resistentes a glucopéptidos en Europa: un problema hospitalario creciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:457-9.
- GUERRERO-RAMOS, E., CORDERO, J., MOLINA-GONZÁLEZ, D., POETA, P., IGREJAS, G., ALONSO-CALLEJA, C., & CAPITA, R. (2016). Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food microbiology*, 53, 156-164.
- GUERRERO-RAMOS, E., MOLINA-GONZÁLEZ, D., BLANCO-MORAN, S., IGREJAS, G., POETA, P., ALONSO-CALLEJA, C., & CAPITA, R. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. *Journal of food protection*, 79(5), 748756.
- HOLMSTRUP P, KLAUSEN B. The growing problem of antimicrobial resistance. *Oral Dis*. 2018; 24(3):291–5. <https://doi.org/10.1111/odi.12610> PMID: 27860048 2. who.int [Internet]. World Health Organization (WHO): Antibiotic resistance—fact sheet; c2017 [cited 2017 Nov]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>.
- KLEIN, E. Y., Van BOECKEL, T. P., MARTÍNEZ, E. M., PANT, S., GANDRA, S., LEVIN, S. A., ... & LAXMINARAYAN, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201717295.

LEI, T., TIAN, W., HE, L., HUANG, X. H., SUN, Y. X., DENG, Y. T., SHEN, J. Z. (2010). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary microbiology*, 146(1-2), 85-89.

MARTI, S., FERNÁNDEZ-CUENCA, F., PASCUAL, A., RIBERA, A., RODRIGUEZ-BANO, J., BOU, G., VILA, J. (2006). Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 24(2), 77.

MIRANDA, J. M., GUARDDON, M., MONDRAGON, A., VÁZQUEZ, B. I., FENTE, C. A., CEPEDA, A., & FRANCO, C. M. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *Journal of food protection*, 70(4), 1021-1024.

MUND, M. D., KHAN, U. H., TAHIR, U., MUSTAFA, B. E., FAYYAZ, A. (2017). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1433-1446.

MURRAY BE. The life and times of the Enterococcus. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3:46- 65

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES COMMITTEE ON DRUG USE IN FOOD ANIMALS. The use of drugs in food animals: benefits and risks. Washington, DC: National Academy Press, 1999.

NG, L. K., MARTIN, I., ALFA, M., & MULVEY, M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, 15(4), 209-215.

NOVAIS, C., FREITAS, A. R., SILVEIRA, E., BAQUERO, F., PEIXE, L., ROBERTS, A. P., & COQUE, T. M. (2012). Different genetic supports for the tet (S) gene in enterococci. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, AAC-00758.

OTEO J, CUEVAS O, NAVARRO C, ARACIL B, CAMPOS J. Trends in antimicrobial resistance in 3469 enterococci isolated from blood (EARSS experience 2001-06, Spain): increasing ampicillin-resistance in *Enterococcus faecium*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1044-5.

RADOSTITS OM, ARUNDEL JH. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. London: WB Saunders, 2000.

SANLIBABA, P., TEZEL, B. U., & SENTURK, E. (2018). Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Chicken in Turkey. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(2), 391.

SOLTANI, M., BEIGHTON, D., PHILPOTT-HOWARD, J., & WOODFORD, N. (2000). Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(2), 433-436.

TACCONELLI E, MAGRINI N, K G, SINGH N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *World Health Organization*. 2017:1–7.

TYSON, G. H., NYIRABAHIZI, E., CRAREY, E., KABERA, C., LAM, C., RICE-TRUJILLO, C., TATE, H. (2018). Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail meats in the United States, 2002 to 2014. *Applied and environmental microbiology*, 84(1), e01902-17.

VITAS, A. I., NAIK, D., PÉREZ-ETAYO, L., GONZÁLEZ, D. (2018). Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae through the consumption of chicken and sushi products. *International journal of food microbiology*, 269, 80-86.

WILLS RW, GRAY JT, FEDORKA-CRAY PJ, ET AL. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis*. *Vet Microbiol* 2000; 71:177

YASSIN, A. K., GONG, J., KELLY, P., LU, G., GUARDABASSI, L., WEI, L., WANG, C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PloS one*, 12(9), e0185326.

7. ANEJOS.

Tabla 6. Anejo 1. Detalles de las muestras analizadas donde se indica el número de la muestra, el tipo, comercio y las fechas más importantes.

Número de muestra	Tipo de muestra	Numeración	Comercio	Fecha de compra	Fecha del análisis
1	HÍGADO	HÍGADO 35	1	24/09/2018	16/10/2018
2	HÍGADO	HÍGADO 41	2	01/10/2018	23/10/2018
3	HÍGADO	HÍGADO 39	3	26/09/2018	23/10/2018
4	MOLLEJA	MOLLEJA 37	3	26/09/2018	06/11/2018
5	HÍGADO	HÍGADO 43	4	03/10/2018	06/11/2018
6	HÍGADO	HÍGADO 46	5	12/11/2018	13/11/2018
7	CARCASA	CARCASA 48	6	12/11/2018	13/11/2018
8	CARCASA	CARCASA 52	7	19/11/2018	20/11/2018
9	HÍGADO	HÍGADO 51	7	19/11/2018	20/11/2018
10	HÍGADO	HÍGADO 49	6	14/11/2018	27/11/2018
11	CARCASA	CARCASA 50	8	14/11/2018	27/11/2018
12	HÍGADO	HÍGADO 55	9	26/11/2018	27/11/2018
13	CARCASA	CARCASA 56	9	26/11/2018	27/11/2018
14	HÍGADO	HÍGADO 49B	6	14/11/2018	27/11/2018
15	HÍGADO	HÍGADO 57	10	28/11/2018	15/01/2019
16	HÍGADO	HÍGADO 15	10	23/04/2018	15/01/2019
17	MOLLEJA	MOLLEJA 47	6	12/11/2018	15/01/2019
18	CARCASA	CARCASA 38	3	26/09/2018	15/01/2019
19	CARCASA	CARCASA 36	1	24/09/2018	15/01/2019
20	CARCASA	CARCASA 60	4	03/11/2018	15/01/2019
21	CARCASA	CARCASA 58	10	28/11/2018	15/01/2019
22	MOLLEJA	MOLLEJA 59	11	10/12/2018	15/01/2019

23	CARCASA	CARCASA 44	4	03/10/2018	15/01/2019
24	CARCASA	CARCASA 42	2	01/10/2018	15/01/2019
25	HÍGADO	HÍGADO 63	12	12/12/2018	15/01/2019
26	HÍGADO	HÍGADO 61	11	10/12/2018	15/01/2019
27	HÍGADO	HÍGADO 53	13	21/11/2018	15/01/2019
28	MOLLEJA	MOLLEJA 59	11	10/12/2018	15/01/2019
29	MOLLEJA	MOLLEJA 45	4	03/10/2018	15/01/2019
30	CARCASA	CARCASA 62	11	10/12/2018	15/01/2019

Tabla 7. Anejo 2. Resultados de los análisis de resistencia fenotípica y genotípica de todas las cepas de *Enterococcus spp.*

COLONIA	Eritromicina 15	Gen Erm B	Vancomicina 30	Quinopristin/ Dalfopristin 15	Ampicilina 10	Tetraciclina 30	Tet					Cloranfenicol 30	Ciprofloxacino 5	Amox + Ac. Clav. 3*	Multirresistencia
							K	L	M	O	S				
1.1.2	R	+	S	S	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	2
3.1.2	S	+	S	S	S	S	-	-	-	-	-	S	S	S	0
8.2.1	R	+	S	S	S	S	+	-	-	-	-	S	S	S	1
1.1.4	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
1.1.5	R	+	S	S	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	2
1.2.1	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
3.1.5	R	+	S	R	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	3
3.2.3	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
9.1.1	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
9.1.2	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
15.1.1	R	+	S	R	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	3
15.1.2	R	+	S	R	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	3
15.1.3	R	+	S	S	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	2
16.1.1	R	+	S	R	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	3

19.1.1	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
20.1.2	R	+	S	R	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	3
26.1.2	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
26.1.3	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
27.1.1	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
3.1.6	R	+	S	S	S	S	-	-	-	-	-	S	R	S	2
3.2.1	R	+	S	S	S	S	-	-	-	-	-	S	R	S	2
3.1.1	R	+	S	S	S	S	-	-	-	-	-	R	R	S	3
26.1.1	R	+	S	R	S	R	+	-	+	-	-	R	S	S	4
1.1.1	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	R	S	3
3.1.3	R	+	S	S	S	R	-	-	-	-	-	S	R	S	3
3.2.2	R	+	S	S	S	R	-	-	-	-	-	S	R	S	3
10.1.1	R	+	S	S	S	R	-	-	-	-	-	S	R	S	3
12.3.2	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	R	S	3
13.1.1	R	+	S	S	S	R	-	-	-	-	-	S	R	S	3
13.1.2	R	+	S	S	S	R	-	-	-	-	-	S	R	S	3
13.1.6	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	2
13.1.3	R	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	R	S	3
6.1.1	R	+	S	S	R	R	+	-	+	-	-	S	S	S	3
13.1.5	R	+	S	S	R	R	-	-	+	-	-	S	R	S	4
13.1.4	S	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	R	R	S	3
22.1.2	S	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	R	R	S	3
1.1.3	S	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	1
3.1.7	S	+	S	S	S	R	-	-	+	-	-	S	S	S	1
9.1.6-S	S	+	S	S	S	S	+	-	+	-	-	S	S	S	0
16.1.2	S	+	S	S	S	R	+	-	+	-	-	S	S	S	1
TOTAL DE	33	40	0	6	2	34	12	0	30	0	0	4	14	0	19
RESISTENTES															