



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
y del Medio Natural

Estudio de la prevalencia de Escherichia coli, Salmonella
spp. y enterobacterias resistentes a antibióticos en huevos
de gallina convencionales y ecológicos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

AUTOR/A: Gamón Marco, Pablo

Tutor/a: Hernández Pérez, Manuel

Cotutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

**Estudio de la incidencia y resistencia a antibióticos de
Enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella spp.* aisladas
de huevos ecológicos y convencionales**

Trabajo final de grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Universitat Politècnica de València

ETSEAMN

Autor: Pablo Gamón Marco

Tutor: Manuel Hernández Pérez

Cotutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Valencia, julio 2024

Título: Estudio de la incidencia y resistencia a antibióticos de Enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella* spp. aisladas de huevos ecológicos y convencionales

Resumen.

La resistencia a los antibióticos en estas bacterias es preocupante, ya que puede dificultar el tratamiento de las infecciones. La incidencia de enterobacterias resistentes a antibióticos en huevos puede variar según diversos factores, como la salud de las aves, las condiciones de higiene en las instalaciones de producción y el uso de antibióticos en la cría de aves. Actualmente muchos microorganismos tienen resistencias frente a antibióticos ya sean intrínsecas, extrínsecas o adquiridas con el tiempo. Las enterobacterias son un grupo diverso de esas bacterias que incluyen organismos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., algunas de las cuales pueden causar enfermedades gastrointestinales transmitidas por alimentos.

En este Trabajo Final de Grado (TFG), se analizaron huevos de distinta procedencia de modo que se identificaron diversas enterobacterias, además de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Además, se realizaron pruebas bioquímicas para su identificación. También, se emplearon antibiogramas para ver que microorganismos eran resistentes a los distintos antibióticos y en qué grado lo eran. Finalmente, mediante técnicas moleculares Multiplex PCR se estudiaron los genes implicados en la resistencia a antibióticos de las enterobacterias aisladas.

Se detectaron enterobacterias y diferentes cepas de *Escherichia coli*. No hubo presencia de *Salmonella* spp. en ninguna de las muestras analizadas. Respecto a los antibiogramas y PCR Multiplex, muchas de las cepas identificadas tales como: *Acinetobacter baumannii* o *Escherichia coli* presentaron resistencias a diferentes antibióticos destacando a beta-lactámicos como AMP y AMC. Asimismo, se detectaron genes de resistencia a los genes beta-lactámicos *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY}, *bla*_{SHV} y a los genes de quinolonas *qnrB* y *qnrS*.

El consumo de huevos se puede considerar seguro siempre que se empleen buenas prácticas de manipulación, aun así, pueden suponer un riesgo para el consumidor al poseer bacterias con resistencia a antibióticos y portar genes de resistencia que pueden dispersarse con el consiguiente peligro de toxiinfección

Palabras clave: Resistencias, antibióticas antibióticos, PCR Multiplex y enterobacterias, gen resistencia, beta-lactámicos, carbapenemes.

Autor: Pablo Gamón Marco

Tutor: Manuel Hernández Pérez

Cotutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Valencia, julio 2024

Title: Study of the incidence and antibiotic resistance of Enterobacteriaceae such as *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated from organic and conventional eggs.

Abstract.

Antibiotic resistance in these bacteria is of concern, as it can make it difficult to treat infections. The incidence of antibiotic-resistant Enterobacteriaceae in eggs can vary according to several factors, such as bird health, hygienic conditions in production facilities, and the use of antibiotics in poultry farming. Currently many microorganisms have resistance to antibiotics whether intrinsic, extrinsic or acquired over time. Enterobacteriaceae are a diverse group of such bacteria that include organisms such as *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. some of which can cause food-borne gastrointestinal illness.

In this Final Degree Project (TFG), eggs from different origins were analysed so that various Enterobacteriaceae were identified, in addition to *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. In addition, biochemical tests were carried out for its identification. Antimicrobial susceptibility testing was also used to see which microorganisms were resistant to the different antibiotics and to what degree they were. Finally, using high-resolution molecular techniques (Multiplex PCR) the genes involved in antibiotic resistance in the isolated Enterobacteriaceae were studied.

Enterobacteriaceae and different strains of *Escherichia coli* were detected. *Salmonella* spp. were not present in any of the samples analysed. Regarding the antibiograms and Multiplex PCR, many of the strains identified, such as *Acinetobacter baumannii* or *Escherichia coli*, showed resistance to different antibiotics, especially to beta-lactams such as AMP and AMC. Resistance genes to the beta-lactam genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY}, *bla*_{SHV} and the quinolone genes *qnrB* and *qnrS* were also detected.

Eggs can be considered safe to consume if good handling practices are used, but they may still pose a risk to the consumer as they contain antibiotic resistant bacteria and carry resistance genes that can be spread with the consequent danger of toxiiinfection.

Keywords: Resistance, antibiotics, antibiotic resistance, multiplex PCR and enterobacteria, resistance gene, beta-lactams, carbapenems.

Author: Pablo Gamón Marco

Tutor: Manuel Hernández Pérez

Co-tutora: Ana Isabel Jiménez Belenguer

Valencia, July 2024

Agradecimientos.

Agradezco a mis padres, hermanos, a mi familia que me han apoyado siempre. También agradecer a mis amigos por estar preguntándome por cómo me iba el TFG. Por último, agradecer especialmente a mi tutor Manuel Hernández Pérez por haberme apoyado en este trabajo, a mi cotutora Ana Isabel Jiménez Belenguer y a Miguel García Ferrús.

Índice.

1 introducción	1
1.1 Sector avícola en la Comunidad Valenciana	1
1.1.1 Huevos ecológicos	1
1.1.2 Huevos convencionales	3
1.2 Calidad y seguridad alimentaria en la comercialización de huevos	5
1.2.1 Indicadores de calidad	5
1.2.2 <i>Escherichia coli</i>	6
1.2.3 <i>Salmonella spp.</i>	6
1.3 Brotes de toxiinfección debidos al consumo de huevos	7
1.3.1 Importancia del consumo de huevos	7
1.4 Resistencias antibióticas	8
1.5 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)	9
2 Objetivos	11
3 Material y métodos	12
3.1 Muestras de huevos ecológicos y convencionales	12
3.2 Calidad e higiene sanitaria	12
3.2.1 Recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.2 Detección de <i>Escherichia coli</i>	14
3.2.3 Detección de <i>Salmonella</i>	15
3.2.4 Detección de Enterobacterias resistentes a antibióticos	17
3.2.5 Extracción de ADN de las muestras y cepas	20
3.2.6 Detección de genes resistentes a antibióticos mediante PCR	20
4 Resultados y discusión de los resultados	24
4.1 Calidad higiénico-sanitaria de los huevos	24
4.1.1 Recuento directo de coliformes y <i>Escherichia coli</i>	24
4.1.2 Detección de <i>Escherichia coli</i>	24
4.1.3 Detección de <i>Salmonella</i>	25
4.1.4 Estudio de la resistencia antibióticas mediante antibiogramas	25
4.1.5 Estudio de la presencia de genes de resistencia antibiótica	27
5 Conclusiones	30
6 Bibliografía	31

Índice de figuras.

Figura 1: Relación costes totales y precios de los huevos en el mercado español (2013-2023).....	5
Figura 2: Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).....	9
Figura 3: Preparación de la muestra.....	13
Figura 4: Medio TBX.....	14
Figura 5: Ejemplo de prueba del Indol positiva.....	15
Figura 6: Medio Cromógeno de <i>Salmonella</i>	16
Figura 7: Siembra en superficie TSI.....	16
Figura 8: Ejemplo de confirmación de <i>Salmonella spp.</i> mediante la Tira API 20E®.....	17
Figura 9: Medio SC.....	17
Figura 10: Tinción Gram.....	18
Figura 11: Dispensador de antibióticos (izquierda) y antibióticos (derecha).....	19
Figura 12: Resultado de los antibiogramas.....	19
Figura 13: Material empleado para la extracción de ADN.....	20
Figura 14: Material empleado para la PCR Multiplex.....	21
Figura 15: Colonias azules de <i>E. coli</i> en el medio TBX.....	25
Figura 16: Colonias rosas sospechosas de <i>Salmonella spp.</i>	25

Índice de tablas.

Tabla 1: Datos de las muestras analizadas.....	12
Tabla 2: Secuencia de los indicadores para penicilinas.....	21
Tabla 3: Secuencia de los indicadores para carbapenemes.....	22
Tabla 4: Secuencia de los indicadores para quinolonas.....	22
Tabla 5: Resultados de los antibiogramas.....	26
Tabla 6: Resultados del Test ESBL.....	27
Tabla 7: Resultados de las PCR Multiplex de las cepas.....	27
Tabla 8: Resultados de las PCR Multiplex de la cáscara.....	28
Tabla 9: Resultados de las PCR Multiplex del interior.....	28

1. Introducción.

1.1 Sector avícola en la Comunidad Valenciana.

En los últimos años, la Comunidad Valenciana se ha convertido en una de las principales y más importantes zonas productoras de huevos del mercado español. La avicultura es uno de los sectores mundiales agropecuario cuya aportación económica es de las más grandes tanto en el territorio valenciano como a nivel nacional e internacional.

Existen cuatro sistemas de producción de huevos en la avicultura de puesta, en donde cada uno de esos sistemas ofrecen unas altas garantías sanitarias. Cada sistema tiene un número de identificación integrado. El código 3 corresponde con el sistema de jaula y representa el 80% de las producciones españolas. El código 2 corresponde con el sistema en donde la gallina tiene acceso al suelo en aviarios. El código 1 corresponde con gallinas criadas con acceso al campo. Por último, el código 0 corresponde a gallinas criadas en el campo y que tienen una alimentación con certificación ecológica (Asociación Avícola Valenciana, s.f.).

Si queremos saber en qué país ha sido producido el huevo, habrá que fijarse en las dos primeras siglas. Por ejemplo: en el caso de España aparecerán las siglas "ES". Para saber la provincia de procedencia, esta vendrá dada por los siguientes dos dígitos. Los tres próximos dígitos nos dará información sobre el municipio. Por último, los dígitos restantes nos darán información sobre la granja.

También encontramos información en el envase, como la categoría, siendo la A la que indica que los huevos son frescos, que no han recibido ningún tipo de tratamiento. Aparte de la categoría, otro tipo de información que podemos obtener de la caja es el tamaño, que puede ser: S (pequeños), M (medianos, con un peso ≥ 53 gramos y < 63 gramos), L (grandes, con un peso ≥ 63 gramos y < 73 gramos) y XL (supergrandes con un peso ≥ 73 gramos) (Hoy Huevo, n.d.).

1.1.1 Huevos ecológicos.

Los huevos ecológicos se caracterizan porque proceden de gallinas que viven en corrales al aire libre. Para obtener el sello ecológico, las gallinas tuvieron que alimentarse con pienso ecológico procedente de la agricultura ecológica. Esta se caracteriza por la no utilización de pesticidas o abonos que sean de síntesis química para la protección de plagas y enfermedades, lo que le otorga al huevo el nombre ecológico. Aparte de todo esto, las gallinas tienen al menos ocho horas de sueño con total oscuridad y un acceso de terreno mínimo de 4 m² por cada gallina.

Por todo ello, esto hace que los huevos tengan denominación ecológica. No obstante, el encarecimiento de la producción de este tipo de huevos, debido a que es distinta a la de otros tipos de producción, hace que el precio de los huevos ecológicos sea superior a los otros tipos de huevos (Dehesa El Milagro, s.f.).

1.1.1.1 Normativa de huevos ecológicos.

El 1 de enero de 2021, entró en vigor el Reglamento (UE) 2018/848 del Parlamento Europeo que trata sobre productos ecológicos y su correspondiente etiquetado. Este texto conserva los requerimientos del Reglamento (CE) nº589/2018 sobre la producción ecológica de aves de corral.

Los requisitos de la reglamentación sobre los huevos ecológicos respecto a las instalaciones que deben cumplir son:

- Las gallinas ponedoras deben disponer de comederos longitudinales que tengan un mínimo de 10 cm por cada ave o comederos con forma circular que tengan un mínimo de 4 cm por ave.
- Los bebederos deben de tener 2 cm y medio de espacio por cada gallina. Con forma circular sería suficiente 1 cm² de espacio. Y si fueses de boquilla o en taza, debe de tener un espacio de 1 cm por cada 10 gallinas.
- Todas y cada una de las gallinas han de tener el mismo acceso a los comederos y bebederos.
- Debe haber al menos como mínimo un nido para 7 gallinas. Si los nidos fueran colectivos, el espacio mínimo debe ser de 1 m² para un máximo de 120 gallinas.
- Los niveles superpuestos no deben ser más de 4 cm y cuya altura entre ellos debe ser de al menos 45 cm. Estos niveles tienen que evitar que los excrementos se caigan hacia los niveles más bajos.
- El acceso al aire libre debe ser sin interrupciones y durante todo el día.
- Los lugares que se utilicen al aire libre deben estar cubiertos de vegetación en gran parte y no deben ser utilizados para otros fines.
- Al aire libre, por cada hectárea, no debe superarse las 2500 gallinas.
- Los espacios al aire libre no pueden exceder de 150 metros desde la trampilla de salida del edificio más cercana.

Otros datos que proporciona la normativa y que son de interés:

No hay que dejar los huevos fríos a temperatura ambiente. Según la normativa, si se dejan los huevos fríos a temperatura ambiente puede ocasionar un fenómeno de condensación que dé lugar al desarrollo de bacterias en la cáscara y que puedan penetrar al interior del huevo. Para que esto no ocurra, los huevos deben ser almacenados y transportado a una temperatura óptima y constante. Aparte, tampoco deben de ser refrigerados antes de venderlos al consumidor.

No hay que limpiar los huevos. Los huevos no deben de ser lavados debido a que esto podría generar daños en la cáscara que protege al huevo de bacterias. No obstante, si hay un tratamiento por medio de rayos ultravioleta, este no se considera un proceso de limpieza (Cobardes y Gallinas, 2023).

1.1.1.2 Impacto socioeconómico del sector del huevo ecológico.

A medida que pasan los años, los huevos ecológicos han ganado popularidad debido a que su producción es sostenible y respeta al medioambiente.

Como se ha mencionado anteriormente, la producción de huevos ecológicos está basada en las prácticas que cuidan el medioambiente, en donde, se emplea alimentos orgánicos, las gallinas están al aire libre y los pesticidas y antibióticos están prohibidos. Como resultado positivo de esto, se preserva la biodiversidad y el bienestar animal.

Los beneficios económicos del sector del huevo ecológico son la generación de empleos en las zonas rurales, donde están normalmente las granjas, y además se fomenta la agricultura sostenible, donde se promueve un modelo económico más equilibrado y justo.

El impacto ambiental de este sector es importante porque reduce la contaminación del suelo y del agua, ya que no se empleen sustancias químicas que puedan contaminar. Además, al no utilizar antibióticos, lo que se consigue es el no generar resistencias bacterianas frente a antibióticos.

El consumo de huevos ecológicos es una opción saludable y responsable, pues la trazabilidad del producto está garantizada y como no se utilizan sustancias químicas ni antibióticos, estos son evitados en el consumo. Por cada consumo de huevo ecológico, se produce una ayuda a los productores locales, contribuyendo así a la economía regional.

La calidad nutricional que tiene los huevos ecológicos es superior a la de los huevos convencionales, pues la concentración en omega 3, antioxidantes y vitaminas es mayor, convirtiéndolo en una opción más saludable para el consumidor.

Debido a que estos huevos son producidos por gallinas cuyas condiciones de vida son dignas, el sector de huevos ecológicos promueve el bienestar animal y una producción más ética y sostenible. El impacto social que tiene la producción de huevos ecológicos ayuda al desarrollo de comunidades rurales por las ofertas de empleo que produce y promover la agricultura sostenible.

Teniendo en cuenta la importancia que es llevar una alimentación saludable y sostenible, se genera un cambio positivo en la sociedad.

El desarrollo local de este producto fortalece a las economías de las regiones rurales, permitiendo así la diversificación de la oferta alimentaria. Con esto se consigue reducir la dependencia de las importaciones y promover la autosuficiencia. Al fortalecer la economía, las regiones rurales son capaces de ser independientes en su producción y así poder llevar a cabo todo el proceso de la producción de huevos ecológicos ellos solos.

A medida que aumenta el consumo de huevos ecológicos, también aumenta la concienciación sobre la importancia que tiene proteger el medio ambiente y además promover las buenas prácticas agrícolas sostenibles. Con esto se consigue un aumento de la preservación de los recursos naturales y el bienestar de las generaciones futuras (Huevos Vereco, n.d.).

1.1.2 Huevos convencionales.

Los huevos convencionales se caracterizan por sistemas en los que las gallinas se mantienen en jaulas y cuya alimentación es estándar, basándose en concentrado.

Las características que tiene estos huevos son: una yema más naranjada que amarilla, esto es debido a la alimentación de las gallinas, pues está estará compuesta por una cantidad importante de carotenoides que resultan en ese tipo de coloración. La dureza de la cáscara es elevada, dentro de lo que cabe. Por último, el sabor es diferente a por ejemplo huevos producidos por gallinas de pastoreo, esto tiene que ver con la alimentación. La alimentación de gallinas que producen huevos convencionales es de concentrado mientras que la de gallinas de pastoreo es de un 20% de concentrado y un 80% de insectos.

Una ventaja que tiene los sistemas convencionales de producción de huevos es que, al estar las gallinas en jaulas con disposición en batería, estas están separadas de sus heces de manera muy eficiente. Debido a esto, al no haber nido ni ningún tipo de material dentro de la jaula, concretamente en el suelo, no hay acumulación de heces ni contaminación fecal y como consecuencia hay una reducción drástica a la presencia de microorganismos (Guier *et al.*, 2023).

1.1.2.1 Normativa de huevos convencionales.

Según el reglamento delegado (UE) 2023/2465 de la Comisión, de 17 de agosto de 2023, por el que se completa el Reglamento (UE) nº1308/2013 del Parlamento Europeo y del consejo, los puntos para tener en cuenta son:

Para la buena comercialización de los huevos y el buen funcionamiento de mercado, es necesario que estos tengan los criterios de clasificación, la conservación y la manipulación, los requisitos de marcado y embalaje y las condiciones de importación y exportación.

Para los *huevos de categoría A*, que en este caso son los huevos convencionales, es necesario determinar las características cualitativas para garantizar que los huevos que se entreguen al consumidor final sean de calidad. Además de fijar unos criterios que faciliten la inspección técnica pertinente.

De manera general, los huevos no deben lavarse ni limpiarse, pues este tipo de prácticas podría generar daños y deterioro en la cáscara de estos. Es una barrera eficaz frente a la entrada de microorganismos, además de tener muchas propiedades antimicrobianas.

Las prácticas con el tratamiento de rayos ultravioleta, no se consideran tratamientos de limpieza, no obstante, en algunos países se utilizan ofreciendo unos excelentes resultados.

Para garantizar la frescura de los huevos es necesario la fijación de unos plazos máximos en representación a: la clasificación, el marcado y el embalaje de los huevos, y también el envase de los huevos. Debe establecerse información acerca de la trazabilidad de los huevos, los piensos, los animales que son destinados a la producción de alimentos, en este caso las gallinas y las sustancias añadidas a alimentos o piensos.

Debido a que los *huevos de categoría A* precisan de una clasificación por peso, es necesaria la creación de categorías que estén limitadas por pesos.

Los *huevos de categoría B*, en el caso de no bastar con el código de productor, se deberá añadir más información. Debe haber un establecimiento del marcado del método de cría y también unos requisitos mínimos para estos métodos. También se tiene que fijar un número máximo de días para el consumo de huevos especialmente frescos (Comisión Europea, 2023).

1.1.2.2 Situación del sector del huevo convencional en España.

En el año 2023, las gallinas tuvieron más de un 5% de reducción de reposiciones y además el consumo de huevos en los hogares españoles aumentó un 7,7% hasta el mes de noviembre. Esto totalizado son unos 37,2 millones de reposiciones de gallinas, obteniéndose una media mensual de 3,1 millones lo que conlleva un descenso de un 5,6% respecto al año 2022

En el informe trimestral del MAPA se destaca la evolución respecto al precio del pienso de ponedoras, siendo este 362€/t, resultando ser un 14,5% inferior al año 2022 y un 20% más alto respecto a la media en los últimos 5 años.

Respecto a los precios de los huevos, según los datos recogidos por MAPA, en el año 2023 son un 46% superiores en comparación al año 2022 y actualmente en el año 2024, estos están bajando un 13% respecto al año 2023.

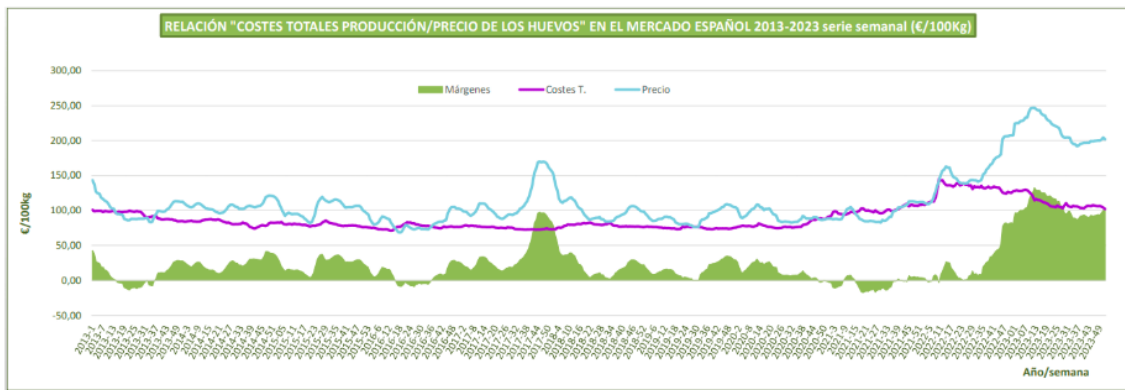


Figura 1: Relación costes totales y precios de los huevos en el mercado español (2013-2023).

En los últimos años la evolución del huevo respecto al consumo ha sido muy positivo, pues desde el mes de diciembre del año 2022 hasta el mes de noviembre del año 2023, ha habido una reducción de un 1,5% en alimentos y bebidas en los hogares españoles, según el informe más reciente del panel de consumo alimentario del MAPA. Con esto, los hogares están reduciendo la compra de los alimentos básicos como la leche líquida, los derivados lácteos, el pan, el azúcar y las legumbres, haciendo que el volumen de huevos comprados crezca un 7,7%, dando un valor total de 19,5% (Jadé, 2023).

1.2 Calidad y seguridad alimentaria en la comercialización de huevos.

Las buenas prácticas de manipulación de los huevos y el posterior procesamiento de estos, determinará tanto su calidad como su seguridad en el ámbito alimentario, pues esto influye en las condiciones sanitarias del producto que luego consumimos.

Para garantizar que los huevos sean seguros y de calidad hay que evaluar la calidad microbiológica y, además, esto nos permite poder asegurar que los alimentos que consumimos, en este caso los huevos deben de tener ausencia de microorganismos patógenos y por tanto no afectan a la salud de los seres humanos (El Sitio Avícola, s.f.).

1.2.1 Indicadores de calidad.

En el presente trabajo, se han utilizado la investigación de *Escherichia coli* y la presencia de microorganismos patógenos como *Salmonella* spp. como indicadores de calidad del huevo ecológico como convencional. Aparte de estos dos microorganismos, se han tenido en cuenta también las enterobacterias y los coliformes totales, tanto en la cáscara del huevo que suele haber mayor presencia de microorganismo, como el interior de este.

También, otros indicadores de calidad que pueden estar presentes en los huevos son los mohos y levaduras. Estos pueden afectar a las propiedades sensoriales y, además, reducir el valor nutricional del huevo. Por otra parte, sintetizan micotoxinas que además de tener un impacto negativo en los animales, pueden contaminar el huevo y afectar al ser humano.

El grupo de coliformes totales son bacterias gram negativas que pertenecen a la familia de las enterobacterias. La mayor o menor presencia de estas enterobacterias dependerá de las buenas prácticas de higiene y limpieza.

Otros indicadores de calidad que no pertenecen al ámbito microbiológico sino al fisicoquímico son parámetros como: el peso, porcentaje de yema, porcentaje de clara, unidades Haugh (factor relacionado con la viscosidad del huevo), grosor de la cáscara, dureza de la cáscara y pH.

Las unidades Haugh, es el parámetro más importante de la calidad fisicoquímica del huevo. Miden la calidad interna del huevo, en referencia a la proteína y su frescura. Unos valores elevados están relacionados con un huevo de alta calidad y frescura.

El pH de la clara del huevo está entre 7,6 y 8,5, aunque estos valores, debido a la porosidad de la cáscara, el CO₂ durante el almacenamiento del huevo, sale por los poros de la cáscara haciendo que el pH aumente hasta 9,7. En lo referente a la yema del huevo, el pH es de 6, pero durante el almacenamiento, este valor puede variar entre 6,4 y 6,9. A medida que disminuye la frescura y la calidad del huevo, el pH de la clara y de la yema aumentan (Muñoz *et al.*, 2020).

1.2.2 *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria anaerobia facultativa comensal que por lo general se encuentra en los intestinos de las personas y los animales que están sanos. La mayoría de las cepas de esta bacteria son inofensivas o causan una diarrea breve. No obstante, algunas cepas, como *Escherichia coli* O157:H7 puede tener síntomas más graves.

Esta bacteria está presente en las aguas o alimentos contaminados como es en el caso de este trabajo, el huevo. Los signos y síntomas que produce la bacteria, en concreto *Escherichia coli* O157:H7 aparecen por lo general pasados unos 3 o 4 días después de la exposición a esta. Los signos y síntomas más comunes son: diarrea que puede ser leve o líquida y en el caso de ser grave aparece sangre, calambres estomacales, dolor o sensibilidad en el estómago y, por último, náuseas y vómitos.

La forma de contraer *Escherichia coli* es a través de la ingesta de alimentos contaminados como son los siguientes: la carne picada que, al ser procesada, debido a que se encuentra cerca de los intestinos, favorece que la bacteria puede llegar a la carne. La leche que no ha sido pasteurizada debido a que la bacteria está presente en la ubre de las vacas o en el equipo ordeñador y que puede contaminar en la leche. Los productos frescos como los vegetales porque pueden estar en contacto con vertidos de las granjas ganaderas. El agua contaminada, pues las heces de los humanos y animales pueden contaminarla. Por último, estaría el huevo, sobre todo la cáscara del huevo, debido a que este puede estar en contacto con las heces de las gallinas ponedoras y de ese modo contaminarse (Mayo Clinic Staff, n.d.).

1.2.3 *Salmonella spp.*

Salmonella spp. es un género bacteriano que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, cuyas especies *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* tiene más de 2700 serotipos, dentro de los más importantes está Typhimurium que es de los que con mayor frecuencia se asocian a casos humanos de salmonelosis.

La infección por este tipo de bacterias una zoonosis denominada salmonelosis, es una enfermedad común en animales que afecta al tubo intestinal. Esta bacteria vive en los intestinos de animales y humanos y se expulsa mediante las heces. No todos los afectados por *Salmonella* presentan síntomas. En el caso de si presentarlos, estos se producen en un rango 8 a 72h y la recuperación de estos se consigue a los pocos días o una semana de la producción de síntomas para las personas sanas. Los síntomas más comunes que produce esta bacteria son: diarrea,

cólicos estomacales, fiebre, náuseas, vómitos, escalofríos, dolor de cabeza y, por último, sangre en las heces.

La mayoría de las personas contrae *Salmonella* por consumir alimentos o agua contaminados. Los alimentos que presentan esta bacteria y que suelen estar contaminados son: la carne cruda de diversos tipos, sobre todo de vaca y ave. En los huevos crudos o poco cocidos, puede que la cáscara actúe de barrera frente a esta bacteria, no obstante, algunas gallinas previamente contagiadas de *Salmonella* pueden poner huevos contaminados antes de que la cáscara se haya formado. Los productos lácteos que no se han pasteurizado, como la leche cruda puede estar contaminada por *Salmonella*. Si se pasteurizan estos productos se produciría una destrucción de bacterias perjudiciales entre ellas *Salmonella*. Por último, están las frutas y las verduras, pudiendo estar contaminadas debido a que en el proceso de limpieza se haya empleado agua contaminada.

Según la legislación alimentaria, Reglamento (CE) Nº273/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios, la bacteria *Salmonella spp.* debe ser ausente en el huevo (Mayo Clinic, s.f.).

1.3 Brotes de toxiinfección debidos al consumo de huevos.

Durante el paso de los años, se han encontrado importantes brotes de *Salmonella spp.* en huevos para consumo humano en diversos lugares del mundo. Algunos ejemplos de estos casos son:

La Alerta sanitaria en España por huevos contaminados de *Salmonella* ocurrido el 16 de febrero de 2022. Se trata de un brote alertado por la Unión Europea en referencia al consumo de huevos de procedencia española, donde fueron afectados seis países y un centenar de personas fueron damnificadas de las cuales existen dos muertes. El Centro Europeo para el Control y Prevención de Enfermedades (ECDC) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) notificaron unos 272 casos (Val, 2022). Unas 25 personas fueron hospitalizadas de 216 casos en Francia, 22 en España, 12 en Países Bajos y 12 más en Reino Unido. En cuanto a las dos víctimas mortales, estas fueron producidas en España y Francia. Tras una secuenciación de genes, se identificó la cepa, *Salmonella enterica* que fue la causante de este brote. Su origen se localizó en tres granjas españolas diferentes (Val, (2022).

En 1992 se detectaron 5 brotes (uno en un colegio, otro en una residencia, otro familiar y 2 en restaurantes), por alimentos que habían sido elaborados con huevo. Unas 545 personas fueron expuestas, pero 364 fueron las estudiadas, dando así 100 afectadas con unas 16 hospitalizaciones. De los 5 brotes detectados, se identificaron 3 brotes de *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella typhimurium* en los demás (Elsevier España, s.f.).

1.3.1 Importancia del consumo de huevos.

Los beneficios que proporciona el consumo de huevos en el hombre son: una fuente de proteínas de alta calidad que son necesarias en las dietas equilibradas, una fuente nutricional que aporta energía y vitalidad tiene vitaminas (A, E, B2, B12...) y minerales (hierro, zinc, selenio...) para tener un buen estado de salud, contiene ácidos grasos como el Omega-3 que posee propiedades antioxidantes. Los huevos que están completos tienen la colina que se trata de un nutriente que ayuda al sistema circulatorio a eliminar compuestos que tienden a causar inflamación o hinchazón muscular. Por último, son una fuente natural de vitamina D que interviene en el proceso de elaboración del tejido óseo.

A pesar de tener múltiples beneficios, a la hora de consumir huevos, se debe tener precaución, pues pueden estar contaminados con *Salmonella* o algún otro tipo de microorganismo que, en el caso de contagiarnos de esto, se producirían signos y síntomas adversos.

Luego, para poder consumir huevos frescos con total seguridad es importante la implantación de un sistema de control de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) y de este modo reducir las enfermedades o los contagios producidos por el consumo de huevos o más general, productos frescos (Newscience, n.d.).

1.4 Resistencias antibióticas.

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas. La resistencia a antibióticos se produce cuando las bacterias mutan debido al uso de estos fármacos. La resistencia a los antibióticos hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las hospitalizaciones y que aumente la mortalidad.

La resistencia a los antibióticos está aumentando cada vez más, numerosas infecciones como: neumonía, tuberculosis, gonorrea... son cada vez más difíciles de tratar y a veces imposibles debido a la pérdida de eficacia de los antibióticos.

La resistencia a los antibióticos se acelera con el uso abusivo e indebido de estos fármacos y con las deficiencias de la prevención y control de las infecciones.

En el sector agrícola, se puede administrar antibióticos a los animales bajo la supervisión veterinaria. No utilizar antibióticos para estimular el crecimiento animal ni para prevenir enfermedades en animales sanos. Vacunar a los animales para reducir la necesidad de antibióticos (Organización Mundial de la Salud, n.d.).

1.4.1 Beta-lactámicos.

Los antibióticos beta-lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y es la más utilizada en la práctica clínica. Su mecanismo de acción es la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Son antibióticos de acción bactericida lenta, cuya toxicidad es escasa (Gudiol *et al.*, 2009).

Los beta-lactámicos se clasifican en: funcional, basada en el espectro hidrolítico de la enzima y la susceptibilidad a inhibidores y la última es (la más utilizada) que es la molecular, basada en la comparación por homología de la secuencia de aminoácidos. Esta clasificación reconoce cuatro clases designada que van de la letra A a la D.

- La clase A, la primera beta-lactamasa codificada por plásmidos en Gram negativos descrita en los años 60 en Grecia, en una cepa de *Escherichia coli*.
- La clase B se caracteriza porque sus enzimas difieren de los otros grupos debido a que requieren moléculas de zinc en su centro activo.
- La clase C, sus enzimas se denominan cefalosporinas o AmpC. Son intrínsecas en muchas especies de *Enterobacterales* y otras especies.
- Por último, la clase D se ha constituido en un importante mecanismo de resistencia, especialmente en *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacterales* (Universidad Santiago de Cali, s.f.).

1.4.2 Carbapenémicos.

Las carbapenemasas son la familia más variable de beta-lactamasas y tienen la mayor capacidad hidrolítica dentro de estas enzimas. Hasta principios de los 90, las carbapenemasas descritas eran cromosomales y específicas por especies. En los últimos años las enterobacterias han emergido como importantes productores de carbapenemasas en todos los continentes donde han causado numerosos brotes hospitalarios e infecciones asociadas a altas tasas de mortalidad.

Las carbapenemasas han sido identificadas principalmente en enterobacterias tanto en aislamientos ocasionales como en brotes. Su mecanismo hidrolítico requiere de la presencia de un residuo de serina en la posición 70. Tienden a hidrolizar un amplio número de beta-lactámicos y son inhibidas parcialmente por ácido clavulánico o estar presentes en elementos genéticos móviles (Universidad Santiago de Cali, s.f.).

Las bacterias resistentes a múltiples antibióticos beta-lactámicos suponen una gran amenaza de salud pública.

1.5 Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

El día 25 de septiembre del año 2015 más de 150 jefes de Estado y de Gobierno mundial aprobaron la Agenda para 2030. En esa agenda se recogen los Objetivos de Desarrollo Sostenible, un conjunto de logros globales dirigidos a erradicar la pobreza, proteger el planeta y asegurar la prosperidad mundial.

Los Objetivos de Desarrollo Sostenible consta de 17 objetivos y cada uno tiene sus metas concretas las cuales se deberán alcanzar para el año 2030. Para ayudar a conseguirlos, una importante labor la tienen los gobiernos, las empresas y los ciudadanos y es necesario que estos tengan conocimiento de estos objetivos.



Figura 2: Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).

Algunos de las ODS con las que este trabajo está relacionado son:

La ODS 2 (Hambre cero): El objetivo de esta ODS es acabar con el hambre, mejorar la nutrición y fomentar la agricultura sostenible.

En el año 2022 unos 735 millones de personas estaban en hambre crónica que en comparación al año 2019 resulta ser un aumento importante. También cerca de 2400 millones de personas tuvieron que hacer frente a la inseguridad alimentaria que aumentó a grave en el año 2022, luego no poseen una alimentación correcta. La cifra anterior, deja unos 391 millones de personas más en comparación al año 2019.

En el año 2030, se prevé que más de 600 millones de personas tendrán que combatir contra el hambre. Esto deja un panorama de difícil remedio y por el que se tardará muchos años en resolverlo.

Las personas con inseguridad alimentaria no pueden llevar una dieta sana y equilibrada habitualmente, por culpa de los ingresos u otros recursos.

Para lograr el hambre cero es necesario tener una visión múltiple, por un lado, garantizar la seguridad alimentaria para obtener alimentos inocuos y nutritivos y, por otro lado, realizar inversiones en estructuras rurales y urbanas para el acceso a los alimentos y la mejora de los medios de subsistencia.

Por ello, es importante los sistemas de trazabilidad y la realización de unas buenas prácticas de manipulación, para ofrecer la seguridad alimentaria necesaria a la población mundial y de esta manera obtener alimentos de calidad (United Nations, s.f.).

2. Objetivos.

El objetivo principal de este trabajo es el estudio de la incidencia y resistencia a antibióticos y presencia de genes de resistencia a betalactamasas, carbapenemes y quinolonas de Enterobacterias indicadoras *E. coli* y *Salmonella* spp. aisladas de huevos ecológicos y convencionales de comercios de Valencia.

Como objetivos específicos se plantea

- el estudio de la calidad microbiológica de huevos convencionales y ecológicos comercializados en Valencia y la incidencia de enterobacterias en huevos mediante su aislamiento por cultivo mediante UNE-EN ISO 93081:2014 adaptada para coliformes y *E. coli* y UNE-EN ISO 6579 para *Salmonella* spp. e identificación bioquímica.
- evaluar la resistencia a distintos antibióticos de los microorganismos aislados mediante antibiograma y estudiar los genes implicados en la resistencia a antibióticos a betalactamasas. (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY-2}), carbapenemes (*bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA}, *bla*_{VIM}) y quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) de las enterobacterias aisladas mediante técnicas moleculares.

3. Materiales y métodos.

3.1 Muestras de huevos ecológicos y convencionales.

El muestreo de este trabajo ha consistido en analizar cada semana 2 huevos, empezando desde finales del mes de febrero hasta principios del mes de mayo de este año, haciendo un total de 12 muestras. Los huevos se han obtenido de diferentes comercios/supermercados de Valencia, repitiendo algunos de estos, siendo de producción ecológica y convencional, aunque, la mayoría fueron de producción convencional, en concreto, 10 huevos.

Todos los huevos que se muestrearon eran huevos frescos aptos para el consumo, es decir, eran de categoría A y la mayoría de estos eran del tamaño XL, como se observa a continuación en la tabla 1.

Tabla 1: Datos de las muestras analizadas.

Muestra	Comercio	Fecha Muestreo	Tipo	Categoría	Tamaño
O-01	A	26/02/2024	Convencional	A	XL
O-02	A	04/03/2024	Ecológico	A	M
O-03	A	04/03/2024	Convencional	A	L
O-04	B	11/03/2024	Convencional	A	M/L
O-05	B	11/03/2024	Ecológico	A	M/L
O-06	C	09/04/2024	Convencional	A	XL
O-07	D	15/04/2024	Convencional	A	XL
O-08	E	15/04/2024	Convencional	A	L
O-09	C	22/04/2024	Convencional	A	XL
O-10	C	22/04/2024	Convencional	A	XL
O-11	C	06/05/2024	Convencional	A	XL
O-12	C	06/05/2024	Convencional	A	XL

La preparación de las muestras se realizó en el laboratorio de Microbiología del Departamento de Biotecnología de la ETSIAMN. Para ello, el muestreo se realizó en las cabinas de flujo laminar, para que las muestras no se contaminaran con las partículas del exterior, antes de desinfectar todo el material que se emplearía y la cabina con luz ultravioleta (10 min).

Una vez ya estaba todo desinfectado, se procedió a realizar el muestreo de los huevos en condiciones de asepsia, para ello se utilizaban bolsas de Stomacher para depositar por un lado la cáscara del huevo y por otro el interior (yema y clara) de este.

De cada muestra, la cáscara era analizada íntegramente y del interior del huevo se pesaban 25 gramos que se transferían a otra bolsa de Stomacher para realizar los recuentos de coliformes, *E. coli* y *Salmonella* spp.



Figura 3: Preparación de la muestra.

3.2 Calidad e higiene sanitaria.

3.2.1 Recuento de coliformes y *E. coli*.

Para poder realizar los recuentos microbianos de coliformes y *Escherichia coli* se realizó mediante el seguimiento de la norma UNE-EN ISO 93081:2014. Las normas UNE-EN ISO son las pautas oficiales creadas por el gobierno, para definir y aplicar técnicas de calidad y protección en los procesos de fabricación de un producto o servicio.

De esta manera, se tomaron 25 gramos de la muestra que contenía el interior del huevo (yema y clara) de la bolsa de Stomacher y se pasó a otra, posteriormente se añadieron 225ml de APT (Agua de Peptona Tamponada, Scharlau, Barcelona, España). Del mismo modo, para la cáscara del huevo, esta se introdujo íntegramente en una bolsa de Stomacher y se le añadieron 90ml de APT. Posteriormente, ambas bolsas se metieron en el Stomacher (BAGPAGE, Interscience, BagSystem) durante 3 minutos para homogeneizar las muestras.

Seguidamente, se procedió a realizar las diluciones decimales seriadas desde la 10^{-1} hasta la 10^{-3} a partir de tubos de 9 ml de agua destilada, una vez realizadas, se sembró en superficie y por duplicado 0,1 ml en el medio agar CC (Microinstant, Chromogenic Coliforms Agar Base, Scharlau, Barcelona, España) cuyo suplemento correspondiente según indica el fabricante (Microbiology Coliforms CV Selective Supplement Scharlau, Barcelona, España), por duplicado.

Una vez se realizaron las siembras en las placas CC, estas se llevaron a incubar en la estufa a 37°C durante 24h.

La lectura de los resultados se realizó en placas incubadas y se seleccionaron aquellas placas que tuvieran entre unas 30 y 300 colonias. Para diferenciar los tipos de colonias, aquellas que tuvieran un color rosa eran los coliformes y las que tuvieran color azul eran de *E. coli*.

Una vez se había realizado el recuento de colonias en placa, para la obtención del resultado se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{r1 + r2}{2} \times 10 \times 10 = U.F.C/g$$

Los parámetros de la fórmula son:

- R1: Resultado del recuento de una placa.
- R2: Resultado del recuento de la placa duplicada.
- X: Valor de la dilución empleada para el recuento.
- U.F.C: Unidades formadoras de colonias.
- g: Gramos.

3.2.2 Detección de *Escherichia coli*.

Para la detección de *Escherichia coli* se tomaron de los caldos preenriquecidos de *Salmonella spp.*, descritos en el siguiente punto, 3 asas de ambas muestras (interior del huevo y cáscara) y se llevaron a 2 placas de agar TBX (Trypton Bile X-Glucuronide) una por cada muestra.

Ambas siembras se realizaron mediante triple estría para que, de este modo, quedaran colonias aisladas. Una vez se realizaron las siembras, las placas se llevaron a incubar a 44°C durante 24h.

Las colonias típicas de *Escherichia coli* en el medio TBX son de color azul.

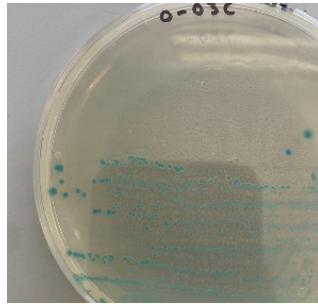


Figura 4: Medio TBX.

Para la confirmación bioquímica de *Escherichia coli*, se realizó la prueba bioquímica del Indol (reactivo Kovacs para el Indol).

Esta prueba se realiza a diferentes especies bacterianas para poder determinar la habilidad que tienen para poder romper el indol del aminoácido triptófano. Para realizarla, se picaron con el asa de siembra colonias aisladas donde había presencia sospechosa de *Escherichia coli* y se introdujeron en un tubo que contenía peptona estéril, una vez introducidas, se agitó el tubo y se llevó a incubar a 42°C durante 24 horas.

Pasado ese tiempo, para la lectura de la prueba, se agitaba de nuevo el tubo y se le añadió el reactivo de Indol. En el caso de que en la superficie del tubo se formara un anillo rojo, habría una confirmación positiva de *Escherichia coli* y si no se da el caso, sería una confirmación negativa (Enciclopedia Química, s.f.).

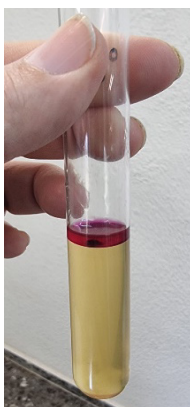


Figura 5: Ejemplo de prueba del Indol positiva.

3.2.3 Detección de *Salmonella spp.*

Para la detección de *Salmonella spp.* se siguió el procedimiento de la UNE-EN ISO 6579.

Para ello, se preparó el preenriquecimiento, en 2 bolsas de Stomacher, una para el interior del huevo y otra para la cáscara, que contenía: para el interior del huevo, 25 gramos de muestra y 225ml de APT y para la cáscara, esta íntegramente y 90ml de APT. Una vez preparado, se llevó a la estufa y se incubaron a 37°C durante 18h.

Para un preenriquecimiento selectivo, se tomó 0,1ml de los preenriquecimientos anteriores, una vez pasadas las 18h, y se añadieron a 2 tubos de 10ml de caldo RVSv (Rappaport-Vassiliadis R 10, BD DIFCO, EE. UU) uno por cada muestra. Una vez añadido, estos se incubaron en la estufa a 41,5°C durante 24h.

Para un segundo preenriquecimiento selectivo se tomó 1ml de los preenriquecimientos anteriores y se añadieron a 2 tubos de 10ml de caldo MKTTn (Muller Kauffman Tetrathionate broth base, Scharlau, Barcelona (España)) uno por cada muestra. Una vez añadido, se incubaron en la estufa a 37°C durante 24h. Pasadas las 24h, de los caldos de Rappaport y Tetratoniato, se cogieron 2 asas por cada tubo y se llevaron al agar XLD (Xylose, Lysine Deoxycholate agar, Scharlau, Barcelona (España)) para el aislamiento de *Salmonella*, mediante la siembra en triple estría.

Del mismo modo, también se llevaron al medio *Salmonella* Chromogenic Agar (Oxoid, United Kingdom) con el suplemento que recomienda el fabricante (Salmonella Selective Supplement) para el aislamiento de *Salmonella*, mediante la siembra en triple estría.

Acabadas las siembras, las placas se llevaron a incubar a la estufa a una temperatura de 37°C durante 24h. Las colonias de *Salmonella spp.* en el medio agar XLD son de color rosa y en el medio Cromógeno de Salmonella son de color violeta.

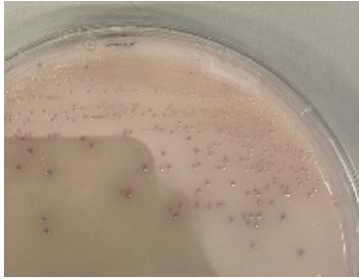


Figura 6: Medio Cromógeno de *Salmonella*.

Para la confirmación bioquímica de *Salmonella spp.* se realizó la prueba del TSI (Agar Triple Sugar Iron) mediante una siembra en superficie en agar inclinado y también una Tira API® 20E.

El TSI contiene 3 tipos diferentes de hidratos de carbono (azúcares), estos son: glucosa (0,1%), sacarosa (1%) y lactosa 1%). También, consta de 2 fases: la fase anaerobia (el fondo del tubo) y la fase aerobia (superficie del tubo).

La prueba del TSI determina si la cepa en cuestión es *Salmonella spp.* Esto es posible porque las colonias de *Salmonella* metabolizan la glucosa del TSI, así, el medio se acidifica y el fondo del tubo se vuelve amarillo.



Figura 7: Siembra en superficie en TSI.

Por otro lado, una confirmación más completa de *Salmonella* se realizó mediante la Tira API® 20E (Biomérieux France). Consiste en 20 pruebas bioquímicas distintas basadas en la fermentación de azúcares y presencia de enzimas que indicaran según el resultado final, la identificación de la cepa en cuestión.

Para realizarla, se resuspende la colonia en 6 ml de agua destilada y mediante una pipeta Pasteur se van llenando los pocillos de la Tira API. Acabado el llenado, esta se lleva a incubar a 37°C durante 24 h para que se lleven a cabo las reacciones bioquímicas.

Una vez ha pasado el tiempo, aparecerán unos cambios de color en los pocillos de las 20 pruebas y mediante la aplicación APIWEB®, se determinará si la colonia es del género *Salmonella spp.* o no con un porcentaje específico.



Figura 8: Ejemplo de confirmación de *Salmonella* spp. mediante la Tira API 20®.

3.2.4 Detección de Enterobacterias resistentes a antibióticos.

Para la detección de Enterobacterias, se cogieron de los preenriquecimientos de *Salmonella* spp. 3 asas de siembra por cada muestra (interior del huevo y cáscara) y se sembró con triple estría en el medio agar SC (Super Carba), para obtener colonias aisladas (Chromagar, s.f.). Una vez realizada la siembra, las placas se llevaron a incubar a 37°C durante 24h.

Pasado el tiempo, aquellos microorganismos que crecieron en la placa eran resistentes a Carbapenemasas.

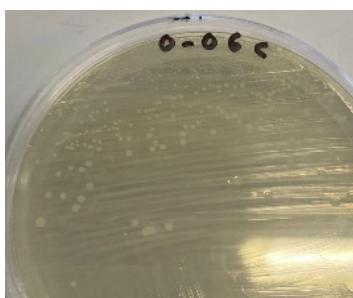


Figura 9: Medio agar SC.

Del mismo modo, se cogieron 3 asas de siembra por cada muestra del preenriquecimiento de *Salmonella* spp. y se sembraron mediante triple estría en el medio agar ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamases), para así obtener colonias aisladas (bioMérieux, s.f.). Una vez se realizaron las siembras, las placas se llevaron a incubar a 37°C durante 24h. Una vez pasado ese tiempo, las colonias que habían crecido, indicaban que tenían resistencia a β -lactamasas.

Las colonias características que crecen en los medios agar SC y ESBL eran de colores: rosa (*Escherichia coli*), azul (*Enterobacter*), blanca y amarilla, este último color en SC no estaba.

En el caso de que hubieran crecido en esos medios, se picaban 5 colonias distintas y se aislaban mediante triple estría en el medio agar PC (Plate Count, Scharlau, Barcelona (España)), para posteriormente realizar las pruebas bioquímicas: oxidasa, catalasa y tinción Gram.

La oxidasa consistía en unas tiras reactivas con un reactivo oxidable incoloro en donde se coloca una colonia aislada y en unos segundos o aparece el color azul (oxidasa positiva) o no (oxidasa negativa) según el microorganismo contiene la enzima en cuestión.

La catalasa consistía en depositar una gotita de agua destilada en una placa y coger una colonia aislada y meterla dentro de la gota, si se forman burbujas la prueba es positiva pues indica la presencia del enzima y si no se forman es negativa. La catalasa transforma el agua oxigenada en agua y oxígeno.

Por último, la tinción Gram consiste en depositar en un portaobjetos, agua destilada y una colonia aislada extendiéndola sobre el portaobjetos. Luego, una vez extendida la colonia, se seca bien para después fijarla mediante cortes del portaobjetos a la llama. Más tarde, se añade colorantes y alcohol como violeta de genciana, lugol, etanol y fucshina básica y entre compuesto y compuesto se lava con agua el portaobjetos. Para terminar, se mira al microscopio de 100X de aumentos, en el caso de que aparezcan colonias púrpuras, estas son Gram positivas y en el caso de que se vean colonias rosas, estas son Gram negativas.

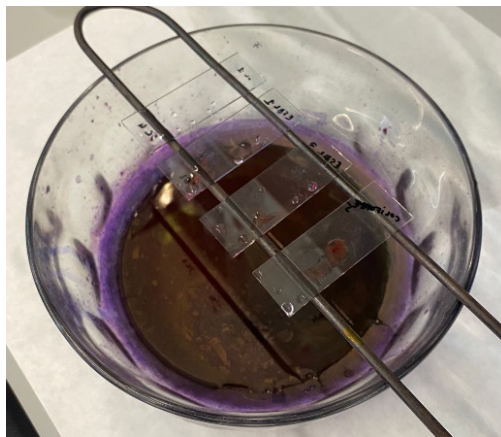


Figura 10: Tinción Gram.

Las colonias que los resultados de las 3 pruebas fueran oxidasa negativa, catalasa positiva y Gram negativa indican que son enterobacterias resistentes a antibióticos. Para su caracterización posterior, esas colonias eran sembradas mediante triple estría en agar PC y se incubaban a 37°C durante 24h. Posteriormente, se identifican mediante Tira API 20E®, se hacen los antibiogramas y se conservan en crio viales a -20 grados.

Los antibiogramas consistían en inocular un tubo de agua bidestilada con una colonia aislada en agar PC y mediante un hisopo, absorber el agua inoculada y extenderla en toda la placa en tres giros en el medio caldo MH (Mueller Hilton), todo en una cabina de flujo laminar (MDM Científica, s.f.). Una vez las placas están inoculadas, se depositan los discos de antibióticos en las placas, hasta 6 discos por placa, haciendo 3 placas. Estos discos, se fijan con un dispensador de discos de antibióticos (Oxoid ST-6090), el cual tiene una capacidad para depositar 6 discos de antibiótico a la vez. Depositados los discos, las placas se incuban a 37°C durante 24h (PIDISCAT, s.f.).

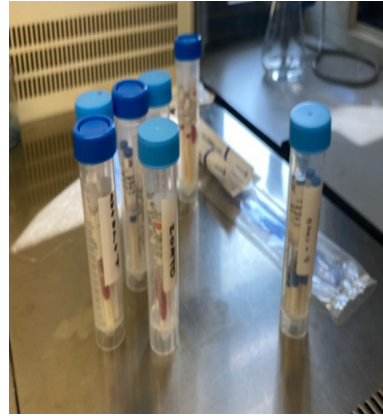
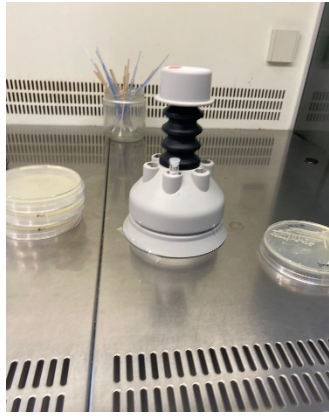


Figura 11: Dispensador de antibióticos (izquierda) y antibióticos (derecha).

Pasado el tiempo, aquellos antibióticos a los que la cepa es muy poco resistente presentan un halo grande alrededor de su disco. Las cepas muy resistentes presentan halos muy pequeños o inexistentes. Las mediciones se hacen mediante una regla, de manera que se toman 2 medidas (mm) una vertical y otra en horizontal formando una cruz midiendo el diámetro total del halo.

Las resistencias que poseen las cepas frente a cada uno de los antibióticos se deben a resistencias: intrínsecas (propias del microorganismo) extrínsecas o adquiridas con el tiempo (adaptación).

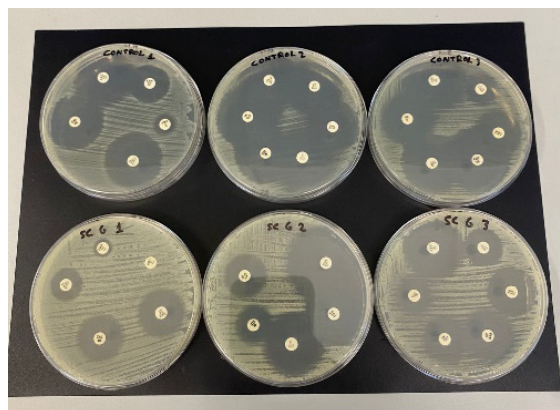


Figura 12: Resultado de los antibiogramas.

Estudio de la presencia de beta-lactamasas de espectro extendido

Realizadas las mediciones de los antibiogramas, se realizó Test ESBL.

Este consiste en comparar los diámetros de los antibióticos (CAZ, CTX y FEP) con los antibióticos que llevaban además el Ácido Clavulánico (CAL, CTL y FEL). Aquellos antibióticos + Ácido Clavulánico cuyo halo era $\geq 5\text{mm}$ respecto a los que no lo llevan, eran positivos en el Test ESBL. Estos producen β -lactamasas que son enzimas que hidrolizan al grupo de antibióticos β -lactámicos y de esa forma, las bacterias se vuelven más sensibles a estos, de ahí ese incremento.

3.2.5 Extracción de ADN de las cepas y muestras.

Tras realizar todas las pruebas bioquímicas y antibiogramas, se extrajo ADN de todas las muestras y las cepas para realizar las PCR Multiplex.

Para ello, se tomó 1 ml de cada preenriquecimiento de *Salmonella* (cáscara e interior del huevo) y se añadió en diferentes Eppendorf de 1,5ml, uno por cada muestra. También, se añadió 1ml de TE (Tris-EDTA) en diferentes Eppendorf de 1,5ml además de una colonia aislada, uno por cada cepa. En total, se obtuvieron 32 tubos Eppendorf.

La extracción de ADN consiste en centrifugar cada Eppendorf en una centrifugadora a 3000xg durante 5mins, seguido de 200µl de PBS, 200ul del tampón de unión y 40ul de la proteinasa K. Una vez añadido todo, se mezcla todo bien y se incuba a 70°C durante 10 minutos. Pasado ese tiempo, se añade 100ul de isopropanol, quedando aproximadamente un volumen de 550 ul en cada uno de los Eppendorf, el cual se pasa a un tubo con filtro de alta pureza insertado en un tubo de plástico para que al centrifugar a 8000xg durante 1 min, el líquido quede retenido en el filtro del tubo de plástico.

Luego se pasó al protocolo de lavado y elución, que consiste en centrifugar a 8000xg durante 1min después de añadir 500 ul del tampón de inhibición, 500ul del tampón de lavado y 500 ul del tampón de inhibición. Cabe destacar que se vuelve a centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos para extraer el líquido restante retenido en el filtro. Pasado ese tiempo, se desecha el tubo y se toman Eppendorf de 1,5ml en donde se insertan los filtros usados durante toda la extracción. En ellos, se añaden 200 ul de tampón de elución previamente precalentado a 70°C. Una vez añadido, todos los Eppendorf con los filtros insertados se centrifugan a 8000xg durante 1 min. Por último, centrifugados estos, los filtros se desechan y los tubos Eppendorf con el ADN ya extraído se guardan en el congelador a -20°C para la realización posterior de las PCR Multiplex.

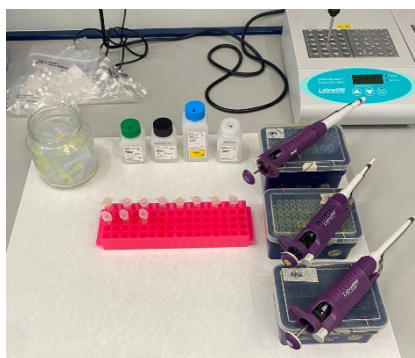


Figura 13: Material empleado para la extracción de ADN.

3.2.6 Detección de genes resistentes a antibióticos mediante PCR.

La PCR Multiplex son reacciones que consiguen detectar simultáneamente y en un solo tubo diferentes secuencias diana, para poder detectar e identificar al mismo tiempo diferentes genes de interés (Elsevier España. (s.f.)).

Para realizarla, se utilizaron cabinas moleculares para evitar contaminaciones, en ellas se depositaba todo el material necesario para realizar la PCR Multiplex.

Se realizaron 4 PCR Multiplex para los 3 tipos de muestra (cepas, cáscara e interior del huevo) como se muestra a continuación.



Figura 14: Material empleado para la PCR Multiplex.

Detección de genes de resistencia a β -lactámicos.

Para la detección de los genes de resistencia se llevó a cabo una PCR multiplex de los genes bla_{TEM} , bla_{SHV} y bla_{CMY} . En la tabla 2 se muestra las secuencias de los iniciadores.

Tabla 2: Secuencia de los indicadores para Penicilinas.

Gen	Amplicón (pb)	Secuencias	Referencia
bla_{TEM}	247	F 5'-TTAACTGGCGAACTACTTAC-3' R 5'-GTCTATTTGTTTCATCCATA-3'	Kozak et al. (2009)
bla_{CMY}	1000	F 5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG-3' R 5'-ATTTGCTGATTTGCTCG-3'	
bla_{SHV}	393	F 5'-GACAGCCTCTTTCTCCACA-3' R 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'	

En cuanto a las condiciones de la PCR, se utilizaron las siguientes, además de emplear controles positivos propios empleados en trabajos anteriores y agua MiliQ como control negativo (Kozak et al., 2009): Tampón de reacción (1x) 2,5 μ l, $MgCl_2$ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primers bla_{TEM} 0,2 μ M, primers bla_{CMY} 0,2 μ M, cebadores bla_{SHV} 0,4 μ M, Taq polimerasa 5 U y 2,5 μ l de ADN de cada muestra para un volumen final de 25 μ l. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C 15 min segundos de 30 ciclos (1 min a 94°C; 1 min a 55°C de temperatura de unión a cebadores, 1 min a 72°C) y por último una extensión de 10 min a 72°C.

Detección de genes de resistencia a carbapenémicos.

Para la detección de los genes de resistencia se llevaron a cabo 2 PCR multiplex de los genes bla_{KPC} , bla_{VIM} y bla_{OXA} , bla_{IMP} , Esto es debido a la coincidencia de bandas del mismo tamaño entre los genes bla_{KPC} y bla_{IMP} , por lo que se separaron en dos mPCRs. En la tabla 3 se muestra las secuencias de los iniciadores.

Tabla 3: Secuencias de los indicadores para carbapenemes.

Gen	Amplicón (pb)	Secuencias	Referencia
<i>bla_{KPC}</i>	798 232	F 5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' R 5'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'	Poirel et al. (2011)
<i>bla_{VIM}</i>	390	F 5'-GATGGTGTGGTGGTCGCATA-3' R 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	
<i>bla_{OXA}</i>	438	F 5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' R 5'-CATCAAGTTCAACCAACCG-3' R 5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'	
<i>bla_{IMP}</i>	232	F 5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC-3' R 5'-GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3'	

Las condiciones de PCR, se emplearon controles positivos propios empleados en trabajos anteriores y agua MiliQ como control negativo. Además, se utilizaron las condiciones detalladas en el trabajo de Poirel et al. (2011): Tampón de reacción (1x), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,125 mM, iniciadores *bla_{KPC}* / *bla_{OXA}* 0,4 μM, *bla_{VIM}*/*bla_{IMP}*, 0,4 μM para cada uno, Taq polimerasa 2 U y 2 μl de cada ADN. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 94 °C 10 min seguidos de 36 ciclos con (30 s a 94°C; 40 s a 55°C de temperatura de unión a cebadores, 50 s a 72°C) y por último una extensión de 5 min a 72°C.

Detección de genes de resistencia a quinolonas

Para la detección de los genes de resistencia se llevó a cabo una PCR multiplex de los genes *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*. En la tabla 4 se muestra las secuencias de los iniciadores.

Tabla 4: Secuencia de los indicadores para quinolonas.

Gen	Amplicón (pb)	Secuencias	Referencia
<i>qnrA</i>	580	F 5'-AGAGGATTTCTCAGCCAGG-3' R 5'-TGCCAGGCACAGATCTTGAC-3	Cattoir et al. (2007)
<i>qnrB</i>	264	F 5'-GGMATHGAAATTCGCCACTG-3' R 5'-TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA-3'	
<i>qnrS</i>	428	F 5'-GCAAGTTCATTGAACAGGGT-3' R 5'-TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG-3'	

Las condiciones de PCR, se emplearon controles positivos propios empleados en trabajos anteriores y agua MiliQ como control negativo. Además, se utilizaron las condiciones detalladas en el trabajo de Cattoir et al. (2007): Tampón de reacción (1x), MgCl₂ 1,25 mM, dNTPs 0,2 mM, iniciadores *qnrA*, *qnrB* y *qnrS* 0,25 μM de cada para cada uno Taq polimerasa 2,5 U y 2 μl de cada

ADN. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 1 ciclo de desnaturalización a 95 °C 10 min seguidos de 34 ciclos con (1 min a 95°C; 1 min a 55°C de temperatura de unión a cebadores, 1 min a 72°C) y por último una extensión de 10 min a 72°C.

Electroforesis en gel de agarosa

Para la visualización de los productos de PCR, se realizaron geles de agarosa y detectar la presencia de genes de resistencia en las cepas. Para ello, se empleó gel de agarosa E (Condalab) al 1,5% en tampón TAE (Tris-HCl 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM) 1x. y se le añadieron 5 µL de RedSafe™ (iNtRON Biotechnology, Washington, USA) por 100 mL de gel.

Se cargaron 10µL del producto mezclados con tampón de carga TriTrack (6X) (Thermo Scientific), se utilizó un marcador de pesos moleculares (GeneRuler 100 bp, Thermo Scientific) para comprobar el tamaño de la banda. Las condiciones de electroforesis fueron: 90V durante 1 hora para los geles de ARGs β-lactámicos y carbapenémicos y 85V 1 hora para los geles de ARGs de quinolonas. Se observaron los resultados con un transiluminador (TransilluminatorVilber, Lourmat, France).

4. Resultados y discusión.

4.1 Calidad higiénico-sanitaria de los huevos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para determinar la calidad higiénico-sanitaria de los huevos analizados mediante el recuento de coliformes y *E. coli* y la detección de *Salmonella* spp.

4.1.1 Recuento directo de coliformes.

El resultado obtenido de los recuentos directos de coliformes y de *Escherichia coli* en 23 de las 24 muestras examinadas de huevo (12 cáscaras y 12 interiores) fue de ausencia/g. No obstante, cabe destacar que en la cáscara de la muestra O-06 (O-06C) hubo presencia directa de coliformes, dando una cifra de $8,40E+04$ UFC/g. Esto puede deberse a una posible contaminación de la cáscara del huevo en la manipulación antes del envasado o por la presencia de material fecal en el mismo.

Según el Reglamento (CE) nº 2073/2005, la carga máxima microbiana para coliformes es de 10^3 UFC/g, valores superiores a esta cifra son inaceptables. En este caso, la muestra O-06C, ya que su carga microbiana es de $8,40E+04$ UFC/g muy superior a la indicada en el Reglamento, de modo que el producto no podría ser consumido (Unión Europea, 2005). En este caso su comercialización no cumple con la norma y podría suponer un riesgo para el consumidor.

En el interior del huevo hay ausencia de coliformes en todas las muestras analizadas, esto puede ser debido a que la cáscara tiene una función como barrera antimicrobiana del interior del huevo. No obstante, está compuesta de microporos por donde intercambia el aire con el entorno y también puede ser una entrada para los microorganismos, por lo que el riesgo cero no existe y es necesario contemplar las medidas adecuadas de almacenamiento para no alterar su permeabilidad.

En un trabajo realizado por la Universidad de Costa Rica, se realizaron los recuentos de coliformes en huevos dando un resultado de $3,20E+01$ UFC/g. (Flores-Macías y Kurtz, 2017).

En este trabajo, los resultados de los recuentos de coliformes fueron de $8,40E+04$ UFC/g, muy superior al trabajo anterior, lo que hace que supere la carga microbiana máxima permitida por la legislación.

4.1.2 Detección de *Escherichia coli*.

En cuanto a los resultados de *Escherichia coli*, todas las muestras poseen valores de no detectables tanto en la cáscara como en el interior del huevo. Según el Reglamento (CE) nº 2073/2005, la carga máxima microbiana para *E. coli* es de 10^3 , valores por encima de este son inaceptables. Luego, todas las muestras son aceptables debido a que tienen un valor de ausencia/g que está por debajo de límite legal, por lo que este producto es apto para su comercialización y consumo a lo que respecta *E. coli*.

Como se ha comentado anteriormente, y para todas las muestras analizadas, en el agar CC ha habido ausencia total de *E. coli*. No obstante, en el medio agar TBX después de enriquecer la muestra, ha habido presencia de *E. coli*, en concreto en las muestras de cáscara O-03C y O-12C. Esto se explica en la falta de sensibilidad del agar CC a la hora de detectar bajas concentraciones de *E. coli*. Esta presencia de *E. coli* en la cáscara puede ser debida a contaminaciones del huevo como: el suelo, superficies, excrementos...

Un estudio realizado en la Universidad Nacional de Córdoba obtuvo *Escherichia coli* en una de las 10 muestras analizadas con un valor obtenido mediante el recuento del Número Más Probable (NMP) de 3,6 bacterias/g (Tissera y Vera, 2021).

En el presente trabajo se obtuvieron 3 cepas de *Escherichia coli* en 12 muestras analizadas, lo que resulta ser una baja incidencia en la presencia de este microorganismo.

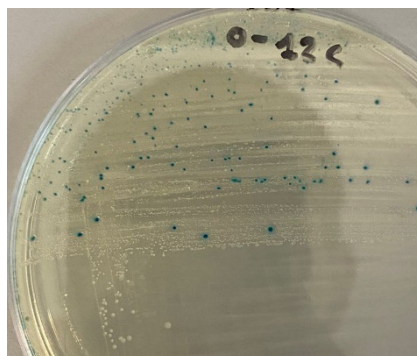


Figura 15: Colonias azules de *E. coli* en el medio TBX.

4.1.3 Detección de *Salmonella* spp.

Según el Reglamento (CE) nº 2073/2005 y la norma EN/ISO 6579, para *Salmonella* spp en huevos, los valores aceptables para su comercialización y consumo es de ausencia en 25g de producto (Unión Europea, 2005).

Para todas las muestras analizadas, tanto en la cáscara del huevo como en el contenido interior ha habido ausencia de *Salmonella* spp., no obstante, ha habido colonias rosas en Cromógeno de *Salmonella* que han sido sospechosas para este patógeno, pero una vez realizada la prueba del TSI se ha confirmado su negatividad para cada una de ellas.

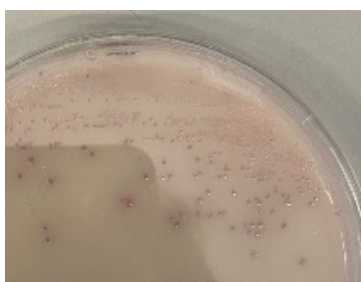


Figura 16: Colonias rosas sospechosas de *Salmonella* Spp.

El consumo de estos huevos resulta seguro respecto a *Salmonella* spp., debido a que hay ausencia de esta, tanto en la cáscara como en el interior del huevo. En el caso de que hubiera presencia del patógeno, no se podrían consumir y se deberían de retirar inmediatamente.

En el trabajo de Tissera y Vera los resultados respecto a *Salmonella* spp. fueron de ausencia en las 10 muestras analizadas (Tissera y Vera, 2021).

Al igual, en este trabajo, los resultados de *Salmonella spp.*, también fueron de ausencia, lo que indica que la presencia de *Salmonella spp.* es muy baja en los huevos, siendo difícil adquirir una infección si se observan buenas prácticas de cocinado y manipulación.

4.1.4 Estudio de la resistencia antibiótica mediante antibiogramas.

Los resultados obtenidos de la realización de los antibiogramas a Enterobacterias y *Escherichia coli* se encuentran en la tabla 5:

Tabla 5: Resultados de los antibiogramas.

Muestra	AMP	AMC	CTX	CRO	CAZ	FEP	IMP	MEM	NA	LEV	CIP	CN	TE	C
O-03C	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
O-06C	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
O-06C	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
O-06C	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
O-06C	I	I	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
O-06C	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
O-06C	I	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
O-06C	R	R	I	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R
O-12C	X*	X*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
O-12C	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
O-12C	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

AMP: Ampicilina; AMC: Amoxicilina/Clavulánico; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima; FEP: Cefepim; IMP: Imipenem; MEM: Meropenem; NA: Ácido Nalidixico; LEV: Levofloxacin; CIP: Ciprofloxacino; CN: Gentamicina; TE: Tetraciclina; C: Cloranfenicol. Las letras que aparecen en las casillas significan: R (Resistencia), I (Intermedia) y S (Sensible). *las dos X indican que no se ha realizado el antibiograma a esos antibióticos debido a que la bacteria es resistente a ambos.

En la tabla se observa, la resistencia que tiene cada cepa a las distintas familias de antibióticos, predominando la resistencia a β -lactámicos (penicilinas, carbapenemes y cefalosporinas). Sobre todo, predomina la alta resistencia a penicilinas AMP y AMC.

En segundo lugar, se ha obtenido resistencias a cefalosporinas de tercera generación como CAZ, CRO y CTX. Este resultado es preocupante ya que el uso de las cefalosporinas de tercera generación está prohibido en ganadería y el hecho de aparecer resistencias puede indicar un mal uso de estos antibióticos o malas prácticas.

Hay que destacar la sensibilidad a los dos antibióticos Carbapenémicos estudiados IMP y MEM. Este es un buen resultado ya que son antibióticos que se usan como terapia de última línea en clínica humana por lo que la baja dispersión de sus resistencias indica su uso seguro para infecciones.

Respecto a las Quinolonas, también predomina la nula resistencia a LEV, NA y CIP. Este resultado es interesante ya que en avicultura se usa Enrofloxacin, una quinolona y la ausencia de resistencia a quinolonas aparte de ser un buen resultado puede indicar un bajo uso de quinolonas.

En un estudio realizado en la Universidad Politécnica de Valencia, los antibióticos que predominaban en cuanto a la resistencia que poseían los microorganismos en los huevos fueron el AMC y TE cuyos porcentajes eran del 70,6% y del 41,2%. Para CRO también presentaban resistencias, pero en menor medida (al igual que para el AMP obteniéndose un 11,8% de las cepas. En cuanto a NA, CIP, CN y C, no se encontraron resistencia alguna (Fenollar, 2020).

En el presente trabajo, también predomina el AMC obteniéndose un porcentaje del 80%. Además, tampoco presentan resistencias para los antibióticos NA, CIP y CN. No obstante, respecto a C, si que presentan resistencias con un 36,36% a diferencia del estudio anterior.

En el caso de los aminoglucósidos (CN), todas las cepas han sido sensibles, aunque en un caso (O-06C) ha sido resistencia intermedia. Este resultado indica que no presenta resistencia para Aminoglucósidos, aunque la presencia de una cepa con resistencia intermedia indica un potencial riesgo. Mientras que para Tetraciclinas no se detectaron ni resistencias ni intermedias en ninguna de las cepas estudiadas. Por último, en el caso del Cloranfenicol (Anfenicoles) presentaron resistencia en el 36,4% (4/11 cepas).

Las especies de *Acinetobacter* son muy diversas siendo el agua y el suelo su principal nicho ecológico. Estas se clasifican en: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. haemolyticus*... La especie más implicada en la colonización e infecciones hospitalarias es *Acinetobacter baumannii*. Esto es debido a que presentan resistencias a diferentes antibióticos como se observa en los resultados del presente trabajo tales como: AMP, AMC CAZ y C (Amengual, 2005).

De todos modos, el número de las muestras empleadas y la baja tasa de aislamiento encontrada hacen que estos resultados sean poco representativos y que para poder tener una amplia visión sea necesario ampliar el muestreo. Sin embargo, la seguridad alimentaria y el consumo sería seguro siempre que se observaran las prácticas adecuadas y no se utilizara para su consumo en crudo.

También se realizó el estudio de la presencia de resistencias a betalactamasas de espectro extendido (ESBL), los resultados obtenidos, los cuales se basan en los antibióticos CAZ-CAL, CTX-CTL y FEP-FEL. Donde los que acaban en L son el antibiótico + ácido clavulánico.

Si la medida de los halos es superior o igual a 5mm, esto significa que hay producción de enzimas betalactamasas que hidrolizan a los betalactámicos, haciéndolos menos resistentes.

Tabla 6: Estudio de betalactamasas de amplio espectro.

Muestra	Identificación	Test ESBL
O-03C	<i>Escherichia coli</i>	-
O-06C	<i>Serratia ficaria</i> 96%	+
O-06C	<i>Acinetobacter baumannii</i> 94,8%	+
O-06C	<i>Acinetobacter baumannii</i> 94,8%	+
O-06C	<i>Acinetobacter baumannii</i> 94,8%	+
O-06C	<i>Acinetobacter baumannii</i> 94,8%	+
O-06C	<i>Acinetobacter baumannii</i> 94,8%	+
O-12C	<i>Enterobacter cloacae</i> 96,5%	+
O-12C	<i>Escherichia coli</i>	+
O-12C	<i>Escherichia coli</i>	+

Los resultados de la prueba ESBL muestran que todos han salido positivos, excepto la muestra O-03C cuyo microorganismo es *Escherichia coli*. Ello indica que un 90% de las muestras presentan betalactamasas de espectro extendido (ESBL), lo que va a suponer que presentan mayores tasas de resistencia frente a antibióticos beta-lactámicos y por lo tanto en caso de infección la terapia puede no resultar efectiva y permitir una mayor diseminación de las cepas resistentes.

4.1.5 Estudio de la presencia de genes de resistencia antibiótica.

Los resultados obtenidos de los geles realizados para las cepas, la cáscara y el interior del huevo para los antibióticos: Carbapenemes, Penicilinas y Quinolonas son los siguientes:

Tabla 7: Resultados de las PCR Multiplex de las cepas.

CEPAS										
Muestra	Carbapenemes				Penicilinas			Quinolonas		
	<i>bla_{KPC}</i>	<i>bla_{VIM}</i>	<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{CMY}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
AB	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli 1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli 2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

AB: *Acinetobacter baumannii*. SF: *Serratia ficaria*.

Las muestras que mayor número de genes de resistencia presentaron fueron las provenientes del agar SC, cuyas cepas son *Acinetobacter baumannii* siendo un 10% las que presentaron genes de resistencia para *bla_{TEM}*, *bla_{CMY}* y *bla_{TEM}*.

Respecto a Quinolonas, apenas un 10% presentaban genes de resistencia para *qnrB* y *qnrS* y un 100% no presentaba el gen de resistencia frente a *qnrA*.

Por último, el 100% de las cepas no presentaban los genes de resistencia para carbapenemes.

Tabla 8: Resultados de las PCR Multiplex de la cáscara.

CÁSCARA										
Muestra	Carbapenemes				Penicilinas			Quinolonas		
	<i>bla_{KPC}</i>	<i>Bla_{VIM}</i>	<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{CMY}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
O-02C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
O-03C	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
O-04C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
O-05C	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
O-06C	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
O-07C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-08C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-09C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-10C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-11C	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
O-12C	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Las muestras de la cáscara tenían un predominio en la resistencia a Penicilinas, un 45,45% de estas presentaba el gen de resistencia para *bla_{TEM}* siendo este el más predominante. Seguido a este, un 36,36% presentaba el gen de resistencia para SHV. Y un 100% no presentaba genes el gen de resistencia frente a *bla_{CMY}*.

Respecto a las Quinolonas, un 9,09% presentaba un gen de resistencia frente a *qnrB*, habiendo un 100% de las muestras que no presentaban genes de resistencia para *qnrA* y *qnrS*.

Por último, el 100% de las muestras no presentaban genes de resistencia frente a Carbapenemes al igual que en las cepas aisladas del exterior.

Tabla 9: Resultados de las PCR Multiplex del interior.

INTERIOR										
Muestra	Carbapenemes				Penicilinas			Quinolonas		
	<i>bla_{KPC}</i>	<i>Bla_{VIM}</i>	<i>bla_{OXA}</i>	<i>bla_{IMP}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{CMY}</i>	<i>bla_{SHV}</i>	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrS</i>
O-01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-02	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
O-04	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
O-05	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
O-06	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
O-07	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
O-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O-11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
O-12	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Las muestras del interior del huevo predominaban en la resistencia a Penicilinas, un 45,45% de estas presentaban genes de resistencia frente a *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}*. Para el gen *bla_{CMY}*, el 100% de las muestras no presentaban resistencia frente a este gen.

Respecto a Quinolonas, un 9,1% presentaba el gen frente a *qnrA* y el 100% no presentaba genes frente a *qnrB* y *qnrS*.

Por último, en cuanto a Carbapenemes, el 100% no presentaban genes de resistencia. El resultado negativo a los genes de resistencia de Carbapenemes, puede deberse a la protección que le da la cáscara al huevo, haciendo que no se contamine demasiado. Este resultado es alentador debido a que existen limitadas alternativas terapéuticas y poseen una alta mortalidad, además que este tipo de antibióticos se utilizan de forma muy específica.

En cuanto a Penicilinas, la predominancia a sus genes puede deberse a que su aparición fue hace más de 50 años, haciendo que su uso frecuente e indebido conlleve un aumento de los genes de resistencia y a una adaptación rápida de los microorganismos a estos (González y Pérez, 2024).

Por último, la poca presencia de genes de resistencia frente a Quinolonas es gratificante, pues algunos de los efectos secundarios que posee son: alteraciones en el sistema nervioso central, mareos, reacciones alérgicas, aceleración del ritmo cardíaco... siendo las dos últimas las más graves (Clínica Universidad de Navarra, s.f.).

En un estudio realizado en el hospital de Chiclayo-Perú, sobre la detección de genes de resistencia de *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CMY}* se demostró que de 50 cepas de *Escherichia coli*, 8 cepas (22,8%) presentaron el gen *bla_{TEM}*, 22 cepas (62,8%) presentaron el gen *bla_{SHV}* y 10 cepas (28,5%) presentaron el gen *bla_{CMY}*. Como se observa en los resultados hay una predominancia en la presentación del gen *bla_{SHV}* al igual que en los resultados obtenidos en este trabajo (García y Pérez, 2014).

5. Conclusiones.

Los huevos, tanto ecológicos como convencionales, son una fuente de nutrientes importante para el ser humano. No obstante, hay que tener especial precaución porque estos, si no se siguen unos cuidados y buenas prácticas de manipulación, pueden contaminarse. Tanto la cáscara como el interior del huevo puede tener microorganismos patógenos como enterobacterias, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp., y algunos de estos pueden adquirir resistencias a antibióticos.

La mayoría de las muestras han presentado una ausencia de bacterias coliformes, exceptuando la muestra O-06C, la cual su carga microbiana es inaceptable según el Reglamento (CE) nº2073/2005, por tanto, ese lote de huevos no resultará seguro para su consumo.

Respecto a los resultados obtenidos para *Escherichia coli*, la mayoría de las muestras han presentado ausencia de este patógeno, tanto en el interior del huevo como en la cáscara, no obstante, en las muestras O-03C y O-12C ha habido presencia muy baja de *E. coli*.

En cuanto a la presencia de *Salmonella* spp, los resultados indican la ausencia del patógeno en todas las muestras analizadas. Por tanto, los huevos son seguros para su comercialización y consumo, respecto a *Salmonella* spp.

Los antibiogramas realizados a las distintas enterobacterias, así como también a *Escherichia coli*, han mostrado resultados muy diversos. Por un lado, predomina la resistencia a los β -lactámicos, sobre todo a penicilinas (Ampicilina y Amoxicilina con Ácido Clavulánico) y por otro predomina la nula resistencia a Carbapenemes (Imipenem y Meropenem), así como también a Quinolonas (Ácido Nalidíxico, Levofloxacino y Ciprofloxacino).

Por último, los resultados de las mPCRs muestran una ausencia total en los genes de resistencia a carbapenemes. También, apenas existen genes de resistencia frente a quinolonas. Respecto a penicilinas, varias muestras presentan genes de resistencia, predominando los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, debido al uso continuo e indebido de beta-lactámicos.

Para evitar contaminaciones y la presencia de microorganismos, es recomendable manipular higiénicamente los alimentos en toda la cadena de producción alimentaria. Así como también, cumplir con la normativa establecida para la cría de gallinas y recolecta de huevos. Realizar los análisis pertinentes para garantizar la seguridad y el consumo seguro de los huevos y evitar las contaminaciones cruzadas entre alimentos que contengan huevo que pueden suponer un peligro para la salud del consumidor.

6. Bibliografía.

Amengual, N. (2005). Modelos de planificación en la enseñanza de inglés como lengua extranjera. *InvestEduc en Enfermería*, 23(2), 141-154. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000200003

Asociación Avícola Valenciana. "A.S.A.V." (s.f.) <https://www.asav.es/>.

bioMérieux. (s.f.). ChromID® ESBL. Recuperado de https://www.biomerieux.es/sites/subsidiary_es/files/10-07_002es99114b_chromid_esbl.pdf

Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(2), 394-397. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm204>

Clínica Universidad de Navarra. (s.f.). Quinolona. En *Diccionario Médico*. <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/quinolona>

Cobardes y Gallinas. (2023, junio 21). *Normativa de huevos ecológicos explicada*. Cobardes y Gallinas. <https://www.cobardesygallinas.com/post/normativa-de-huevos-ecologicos-explicada>

Comisión Europea. (2023). *Reglamento Delegado (UE) 2023/2465 de la Comisión, de 17 de agosto de 2023, por el que se completa el Reglamento (UE) nº 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a las normas de comercialización de los huevos y por el que se deroga el Reglamento (CE) nº 589/2008 de la Comisión*. Diario Oficial de la Unión Europea, L 2465, 1-17. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2023-81561>

Chromagar. (s.f.). Chromagar™ mSuperCARBA. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://www.chromagar.com/es/product/chromagar-msupercarba/>

Dehesa El Milagro. (s.f.). ¿En qué se diferencian los huevos camperos de los ecológicos? Dehesa El Milagro. Recuperado el [fecha de acceso], de <https://dehesaelmilagro.com/blogs/blog-el-milagro/en-que-se-diferencian-los-huevos-camperos-de-los-ecologicos>

El Sitio Avícola. (s.f.). ¿Qué es la calidad del huevo y su conservación? El Sitio Avícola. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://www.elsitioavicola.com/articulos/1832/qué-es-la-calidad-del-huevo-y-su-conservación/#:~:text=Para%20los%20huevos%2C%20el%20consumidor,y%20que%20no%20tenga%20grietas>

Elsevier España. (s.f.). Brotes epidémicos de salmonelosis por consumo de alimentos contaminados. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-brotes-epidemicos-salmonelosis-por-consumo-6347>

Elsevier España. (s.f.). La PCR múltiple en microbiología clínica. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-la-pcr-multiple-microbiologia-clinica-13058027>

Enciclopedia Química. (s.f.). Prueba del indol. Recuperado el 2 de julio de 2024, de https://www.quimica.es/enciclopedia/Prueba_del_indol.html#Procedimiento

Fenollar, L. (Año). *Estudio de la transmisión de resistencias a antibióticos mediante métodos moleculares*. Recuperado de <https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/149399/Fenollar%20->

[%20Estudio%20de%20la%20transmisi%C3%B3n%20de%20resistencias%20a%20antibi%C3%B3ticos%20mediante%20m%C3%A9todos%20moleculares%20....pdf?sequence=1&isAllowed=y](#)

Flores-Macías, G. A., & Kurtz, M. J. (2017). La ciencia en la política: la producción de conocimiento científico y su uso en el gobierno. *Política y Gobierno*, 24(2), 445-477. <https://www.redalyc.org/journal/437/43768481021/html/>

García, J., & Pérez, M. (2014). Análisis de la salud pública en América Latina. *Revista de Ciencias Médicas*, 7(3), 27-30. https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/03/1052079/rcm-v7-n3-2014_pag27-30.pdf

Gudiol, F., Aguado, J. M., Almirante, B., Bouza, E., Cercenado, E., Domínguez, M. A., ... & Zaragoza, R. (2009). Consensus document on antimicrobial therapy of invasive infections by *Candida* spp. in adults. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(4), 247-259. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>

González, M. L., & Pérez, J. M. (2024). Resistencias bacterianas: un problema creciente. *Farmacia Profesional*, 43(1), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.farma.2023.12.005>

Guier Serrano, M., Davidovich Young, G., Wong González, E., & Cubero Castillo, E. (2023, marzo 15). Conozca las diferencias entre los huevos convencionales y de pastoreo. Universidad de Costa Rica. <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2023/3/15/conozca-las-diferencias-entre-los-huevos-convencionales-y-de-pastoreo.html>

Hoy Huevo. (n.d.). *Clasificación del tamaño de los huevos*. Hoy Huevo. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://hoyhuevo.es/tamano-huevos/>

Huevos Vereco. (n.d.). *Huevos ecológicos Vereco*. Huevos Vereco. <https://huevosvereco.com/>

Huevos Vereco. (n.d.). *El impacto socioeconómico de la industria de huevos ecológicos*. Recuperado de <https://huevosvereco.com/el-impacto-socioeconomico-de-la-industria-de-huevos-ecologicos/>

Jadé, B. (2023). *Situación del sector del huevo en España: Economía y consumo*. AviNews. Recuperado de <https://avinews.com/situacion-sector-del-huevo-en-espana-economia-y-consumo/>

Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and environmental microbiology*, 75(3), 559–566. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-08>

Mayo Clinic Staff. (n.d.). *E. coli (Escherichia coli)*. Mayo Clinic. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/e-coli/symptoms-causes/syc-20372058>

Mayo Clinic. (s.f.). *Salmonella: Síntomas y causas*. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/salmonella/symptoms-causes/syc-20355329>

MDM Científica. (s.f.). *Agar Mueller Hinton: Medio de cultivo para determinación de sensibilidad a los antimicrobianos*. Recuperado el 2 de julio de 2024, de <https://mdmcientifica.com/agar-mueller-hinton-medio-de-cultivo/#:~:text=El%20Agar%20Mueller%20Hinton%20es,de%20sensibilidad%20a%20los%20antimicrobianos>

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (s.f.). *Salmonella general*. Recuperado el 2 de julio de 2024, de https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/sanidad-animal/enfermedades/salmonella/salmonella_general.aspx

Muñoz Ulate, G. A., García Mayagoitia, S. P., & Ramírez Buentello, J. F. (2020). Evaluación de la implementación del presupuesto basado en resultados en las universidades públicas estatales de México. *Contaduría y Administración*, 65(5), Artículo e6848. <https://doi.org/10.22201/fca.24488410e.2020.2557>

Newscience. (n.d.). La importancia de consumir huevos. Newscience. Recuperado de <https://newsciencestore.com/la-importancia-consumir-huevos/>

Organización Mundial de la Salud. (n.d.). *Resistencia a los antibióticos*. Recuperado el [fecha de consulta], de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>

PIDISCAT. (s.f.). *Dispensadores discos antibiogramas*. Recuperado de <https://pidiscat.cat/es/microbiologia/dispensadores-discos-antibiogramas>

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>

Tissera, G., & Vera, L. (2021). *Evaluación microbiológica de huevos enteros comercializados en la ciudad de Córdoba* [Tesis de grado, Universidad Nacional de Córdoba]. Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba. <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/550289/Evaluaci%C3%B3n%20microbiol%C3%B3gica%20de%20huevos%20enteros%20comercializados%20en%20la%20ciudad%20de%20C%C3%B3rdoba.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

United Nations. (s.f.). Hambre. Obtenido el 2 de julio de 2024, de <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/hunger/>

Unión Europea. (2005). Directiva 2005/338/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de abril de 2005, por la que se modifica la Directiva 2000/14/CE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre la emisión sonora en el medio ambiente debido a la utilización de equipos de maquinaria. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 338, L1-L26. Recuperado de <https://www.boe.es/doue/2005/338/L00001-00026.pdf>

Universidad Santiago de Cali. (s.f.). Estudios en resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en bacterias Gram negativas. Recuperado de <https://libros.usc.edu.co/index.php/usc/catalog/view/113/158/2213-1>

Val, S. (2022, febrero 16). Alerta sanitaria en España por huevos contaminados: Retiran lotes de granjas españolas. *El Español*. Recuperado de https://www.elespanol.com/ciencia/nutricion/20220216/alerta-sanitaria-espana-huevos-contaminados-retiran-granjas-espanolas-salmonelosis/650685038_0.html