

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de broilers y huevos de distintos orígenes y estudio de su transferencia a microorganismos intestinales.

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNO/A: Alejandro Prats Luján

TUTOR/A: Ana Isabel Jiménez Belenguer

COTUTOR/A: Alejandro Fenollar Penadés

Curso Académico: 2014-2015

VALENCIA, JULIO 2015

Licencia Creative Commons “Reconocimiento no Comercial –Sin Obra Derivada”.



Caracterización molecular de la resistencia antimicrobiana en cepas de *E. coli* aisladas de broilers y huevos de distintos orígenes y estudio de su transferencia a microorganismos intestinales.

The usage of extended-spectrum antimicrobials generates the selection of multiresistant strains that are hard to treat. Resistant bacteria may be present in ingested aliments and if these are not processed properly, they can originate severe infections. Different studies have proved the existence of resistance transmission between animals, food and humans, showing that the transference of resistance genes between bacteria is possible. Besides, it has been confirmed the existence of resistance transference between bacterial strains present in chickens towards human strains in diverse studies. If food is contaminated with ESBLs producing *E. coli* and it is not processed adequately, people can ingest these resistant strains and could produce the transfer of said resistance unto endogenous strains.

For this, it will be developed an essay of determination of antimicrobial resistance genes to beta-lactams and tetracycline with isolated *E. coli* strains from broiler's gut and egg shell from different origins. It will be performed a previous bibliographic research to determine which resistance genes among the beta-lactams and tetracycline are the most frequent and select the most suitable primers and PCR conditions for this study. With the result obtained it will be studied the prevalence of those genes both eggs and broiler's gut and the association with its origin. It also will be made conjugation essays to prove the possibility of horizontal genetic transference between resistant strains (donor) and sensitive (recipient).

El uso de antimicrobianos de amplio espectro propicia la selección de cepas multirresistentes difíciles de tratar. Las bacterias resistentes pueden estar presentes en los alimentos que se consumen y si estos no se procesan adecuadamente, pueden originar infecciones graves. Diversos estudios han demostrado la existencia de transmisión de resistencias antimicrobianas entre animales, alimentos y humanos, demostrando que la transferencia de genes de resistencia entre bacterias es posible. Además, se ha confirmado la existencia de la transferencia de resistencias entre cepas bacterianas presentes en pollos a cepas humanas en diferentes estudios. Si los alimentos están contaminados con *E. coli* productores de ESBLs y no se procesan adecuadamente, las personas pueden ingerir las cepas resistentes y podría darse la transferencia de dichas resistencias hacia cepas endógenas.

Para ello se realizará un ensayo de determinación de genes de resistencia antimicrobiana a betalactámicos y tetraciclinas con cepas de *E. coli* aisladas tanto en intestinos de broilers y en cáscara de huevo de diversos orígenes. Se realizará una búsqueda bibliográfica previa para determinar qué genes de resistencia entre los betalactámicos y tetraciclinas se encuentran más frecuentemente y seleccionar los primers y condiciones de PCR más adecuados a nuestro estudio. A partir de los datos obtenidos se estudiará la prevalencia de éstos genes tanto en huevos como en broilers y su relación con los distintos orígenes. Se realizarán también ensayos de conjugación para demostrar la posibilidad de transferencia genética horizontal entre cepas resistentes (donadoras) y sensibles (receptoras).

Antimicrobial resistance, broilers, eggs, *E. coli*, beta-lactams, tetracycline, resistance genes, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, tet(A), tet(B), horizontal genetic transference

Resistencia antimicrobiana, broilers, huevos, *E. coli*, Betalactámicos, tetraciclinas, genes de resistencia, blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, tet(A), tet(B), transferencia genética horizontal

Alumno: D. Alejandro Prats Luján

Valencia, Julio de 2015

Prof. Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer

D. Alejandro Fenollar Penadés

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todos aquellos que han contribuido y hecho posible la realización de este trabajo con todas las ganas y la ilusión posible:

En primer lugar a mi directora, Ana Isabel Jiménez Belenguer, por darme la oportunidad de poder trabajar en el ámbito de la microbiología y en concreto en la interesante disciplina de las resistencias bacterianas a antibióticos. Además, agradecerle toda la dedicación y esfuerzo depositado, proporcionándome los conocimientos y medios necesarios para la realización de dicho proyecto.

Del mismo modo, agradecer a mi tutor, Alejandro Fenollar Penadés, toda la ayuda y la compañía proporcionada a lo largo del ensayo, en especial por servir de guía en el laboratorio y por sus consejos ante cualquier duda del día a día.

También, quería agradecer a todos los compañeros de laboratorio, que han hecho esta experiencia más amena y didáctica al compartir las experiencias y los conocimientos de nuestros variados campos docentes.

Por supuesto, agradecer tanto a mis amigos de siempre como a mis amigos de la facultad, los cuales han demostrado un gran apoyo e interés por el desarrollo de este trabajo.

Finalmente agradecer a aquellas personas más cercanas: a mis padres y a mi hermano, los cuales han hecho posible y han alentado el camino que me ha llevado a estar donde me encuentro ahora mismo, siendo un motivo de orgullo y satisfacción poder contar con todo este apoyo.

Sin nada más que añadir, agradecer a todos el haber formado parte de una de las mejores etapas de mi vida.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. La resistencia a antibióticos.....	1
1.2. Tipos de resistencia.....	3
1.2.1. Inactivación enzimática.....	4
1.2.2. Modificación de las moléculas diana.....	4
1.2.3. Alteraciones en la permeabilidad.....	5
1.2.4. Biopelículas.....	6
1.3. Administración de los antibióticos y normativa.....	7
1.4. Ecología de la transmisión de resistencias.....	8
2. Objetivos.....	9
3. Materiales y métodos.....	10
3.1. Aislamiento de las cepas de <i>Escherichia coli</i>	10
3.2. Selección de cepas de <i>Escherichia coli</i>	11
3.3. Extracción del ADN de <i>Escherichia coli</i>	11
3.4. Estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos.....	11
3.5. Conservación de cepas de <i>Escherichia coli</i>	12
3.6. Amplificación del ADN mediante PCR.....	12
3.6.1. Detección de los genes de β -lactamasas tipo CTX-M.....	12
3.6.2. Detección de los genes de β -lactamasas tipo CMY.....	13
3.6.3. Detección de los genes para tetraciclinas tipo tet(A), tet(B) y tet(C).....	14
3.7. Comprobación de presencia/ausencia de amplificado por electroforesis.....	15
3.8. Conjugación de cepas resistentes (donadoras) y sensibles (receptoras).....	15
3.8.1. Conjugación de cepas de <i>Escherichia coli</i> con <i>Salmonella spp.</i>	15
3.9. Análisis estadístico de los datos.....	16
3.10. Análisis de los primers de PCR.....	17
3.11. Identificación bacteriana.....	17
4. Resultados y Discusión.....	18
4.1. Susceptibilidad a antimicrobianos.....	18
4.1.1. Influencia del origen de la cepa frente a susceptibilidad a antimicrobianos.....	18
4.1.2. Influencia del origen de la cepa frente a resistencia al antibiótico.....	21
4.2. Detección de β -lactamasas tipo CTX-M.....	23
4.3. Detección de β -lactamasas tipo CMY.....	27
4.4. Detección de genes de resistencia a tetraciclina tipo tet(A), tet(B) y tet(C).....	28
4.5. Presencia/ausencia de genes de resistencia en función del origen del huevo.....	30
4.6. Transferencia de genes de resistencia mediante conjugación.....	31
5. Conclusiones.....	33
6. Bibliografía.....	35

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

bp: Pares de bases

PBP: "Penicillin Binding Protein"

BE: Bombas de eflujo

CMI: Concentración mínima inhibitoria

kD: kiloDaltons

CEE: Comunidad Económica Europea

EFSA: "European Food and Safety Authority"

ESBL: "Extended Spectrum Beta-Lactamase"

PCR: "Polymerase Chain Reaction"

CTX-M: gen de β -lactamasa de clase A

tet(): gen de resistencia a tetraciclina

CMY: gen de β -lactamasa de clase AmpC

APT: Agua de peptona tamponada

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la presencia y la rápida difusión de patógenos resistentes a antibióticos de uso en clínica constituye uno de los problemas más importantes tanto en el ámbito de la salud pública como en el de la medicina veterinaria y la ganadería. La presión selectiva derivada de las aplicaciones clínicas de antibióticos y su empleo en ganadería como promotores del crecimiento, supone una de las principales razones de que dicho problema esté alcanzando unos niveles críticos en estos tiempos (Casewell *et al.*, 2003; Tenover y McGowan, 1996). A pesar de ello, un supuesto caso donde se produjera una limitación en el empleo de estos antibióticos, podría suponer un riesgo y un aumento de infecciones bacterianas tanto en humanos como en animales, lo que conllevaría a un problema de salud pública y a elevadas pérdidas económicas en el sector agropecuario o de producción primaria.

El tracto digestivo constituye uno de los reservorios más importantes de microbiota bacteriana para los animales, teniendo un importante rol nutricional al encontrarse este microbioma en simbiosis con el organismo hospedante. En concreto, las bacterias anaeróbicas intestinales y específicamente los microorganismos pertenecientes al género *Bacteroides spp.* son el residente más habitual en dicha microbiota bacteriana, de acuerdo con los estudios metagenómicos realizados sobre el microbioma intestinal (Arumugam *et al.*, 2011). Se piensa que esta microbiota anaerobia actúa como uno de los principales reservorios para genes de resistencia, los cuales pueden ser transferidos hacia otras especies incluyendo aquellas que poseen un potencial patogénico, y hacia diferentes especies aeróbicas (Salyers *et al.* 2004).

1.1. LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Un antibiótico es aquella sustancia química derivada o producida por un ser vivo, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, debido a su acción bacteriostática, o de ocasionar la muerte de estos, por su acción bactericida, incluso a concentraciones mínimas (Korolkovas y Burckhalter, 1983).

En la década de 1950, con la aparición de una gama importante de antimicrobianos, se pensaba que virtualmente todas las infecciones bacterianas eran tratables con éxito. Sin embargo, durante las décadas de los años 60 y 70 se empezaron a observar y desarrollar resistencias a antibióticos por parte de microorganismos patógenos, esta situación ha puesto en entredicho, pese a que los antibióticos han ayudado a combatir las infecciones bacterianas durante los últimos 80 años, que la idea inicial era incorrecta e imprecisa, debido a la aparición de dichas resistencias a antibióticos. En la actualidad se pueden encontrar más de 3000 antibióticos descritos, pero solamente un pequeño porcentaje de ellos se emplea en la práctica clínica y veterinaria debido a que algunos de ellos pueden presentar efectos nocivos o tóxicos sobre el organismo (Kinch *et al.*, 2014). Dichos antibióticos han sido ampliamente usados con el fin de proteger la salud humana y animal, así como promotores del crecimiento en ganadería.

Los antibióticos se pueden clasificar en función de su estructura química, y por tanto, en relación con su mecanismo de acción. Los antibióticos más empleados son: β -lactámicos, quinolonas, tetracilinas, aminoglucósidos, glucopéptidos, macrólidos y cloranfenicol,

destacando el grupo de los β -lactámicos y las tetraciclinas al ser empleados por su amplio espectro de acción (Daza, 1998).

Hay casos donde se han originado complicaciones a la hora de tratar infecciones ocasionadas por cepas resistentes a antibióticos, como es el caso de la salmonelosis, infección tratada con cefalosporinas de amplio espectro y fluoroquinolonas. Debido a este uso y abuso de los antibióticos se ha venido produciendo una presión selectiva sobre las comunidades bacterianas, resultando en la generación de resistencias (American Academy of Microbiology, 2009; Hawkey y Jones, 2009). Muchos de los antibióticos empleados para los tratamientos son producidos por microorganismos ambientales, los cuales son hospedadores naturales de los genes de resistencia a dichos antibióticos, esto se cree que es una medida tomada como defensa frente a los compuestos producidos por ellos mismos (Davies, 1994; Vila y Martínez, 2008).

Un ejemplo de estos microorganismos que han desarrollado resistencia a antibióticos son los patógenos que poseen β -lactamasas de amplio espectro o ESBL según sus siglas en inglés, suponiendo un problema clínico y veterinario a nivel mundial (Wiedemann *et al.*, 1989). Estas β -lactamasas de amplio espectro tienen la habilidad de hidrolizar diversos tipos de antibióticos, incluso a las cefalosporinas de amplio espectro de tercera y cuarta generación (p.e. cefotaxima, ceftriaxona o ceftazidima), antibióticos clasificados como antimicrobianos de crítica importancia por la Organización Mundial de la Salud. Esto ocasiona un impedimento a la hora de realizar un tratamiento efectivo frente a muchas enfermedades infecciosas moderadas o graves (Organización Mundial de la Salud, 2011).

Muchas de estas cepas de bacterias productoras de ESBL son aisladas en muestras de humanos (Carattoli, 2008), y no de animales, pero este hecho está cambiando, ya que algunas cepas de *E. coli* con estos genes de resistencia están empezando a detectarse e incrementarse en animales (Hunter *et al.*, 2010). Dichas resistencias a antibióticos son adquiridas por las bacterias mediante la transferencia de elementos móviles (plásmidos y elementos integrativos o conjugativos) a través de la transformación del ADN desnudo o por medio de bacteriófagos (Carattoli, 2008; Daly y Fanning, 2000).

Actualmente las familias de β -lactamasas de amplio espectro predominantes encontradas en cepas resistentes son la familia de CTX-M, TEM y SHV (Poirel *et al.*, 2012; Bush *et al.*, 2015). Hasta ahora se han encontrado 223 familias diferentes pertenecientes a TEM, así como 191 respecto a la familia de SHV (Bush *et al.*, 2015). Mientras que estas dos familias son prácticamente homólogas exceptuando unas pocas mutaciones en el loci, las familias de las CTX-M presentan un amplio rango de variabilidad. Hasta ahora se conocen 157 variantes descritas para CTX-M, pudiendo dividirse en cinco grupos principales en función de las variaciones de identidad de sus cadenas de aminoácidos. Estos grupos se clasifican como: grupo CTX-M-1, grupo CTX-M-2, grupo CTX-M-8, grupo CTX-M-9 y grupo CTX-M-25. Entre estos destacan los grupos CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9 como los más predominantes (Bradford, 2001).

Respecto a los genes de resistencia a tetraciclinas, se clasifican en función de su mecanismo de acción, encontrándose los genes que generan proteínas de eflujo activo, de protección ribosomal y de enzima inactivadora. Entre estos grupos destaca el de genes que producen proteínas de eflujo activo asociadas a membranas que expulsan tetraciclinas de la célula, disminuyendo la concentración intracelular del antibiótico (Michalova *et al.*, 2004). Aquí se encuentran los genes hallados en plásmidos y transposones, tet(A), tet(B), tet(C), tet(D),

tet(E), tet(L) entre otros, siendo predominantes en las bacterias gram-negativas (Kojima *et al.*, 2005).

Se conoce que la aparición de estas resistencias afecta al mantenimiento del microorganismo ya que implica un coste energético extra que puede comprometer la viabilidad del microorganismo. Se han realizado estudios donde se ha observado que dicho coste afecta a procesos de elevada relevancia como el mantenimiento de la pared celular o la síntesis de ARN mensajero entre otros. Esto ha llevado a un interés por la forma de evolución de estas bacterias de modo que sean capaces de mantener la resistencia y esto no conlleve un detrimento de su supervivencia (Schenk y Visser, 2013). La conclusión sacada de los diferentes estudios ha llevado al descubrimiento de dos factores clave en la evolución de las resistencias: la epistasia y la pleiotropía (Rodríguez-Verdugo *et al.*, 2013). La pleiotropía es aquel fenómeno producido cuando un mismo gen, y por tanto las mutaciones en el mismo, afectan a diversos rasgos fenotípicos. En este caso hay cierta restricción ya que el efecto positivo o negativo dependerá del fenotipo y las condiciones del entorno. Además, tiene elevada probabilidad de ser seleccionada una misma mutación en diferentes poblaciones si el beneficio es extremadamente alto. Por su parte, la epistasia se produce cuando se da una interacción entre mutaciones de diferentes loci de manera no aditiva afectando a un mismo rasgo fenotípico, hecho que supone la combinación de diferentes mutaciones sobre la resistencia, y por lo tanto la determinación de qué vía mutacional será preferente por la evolución, cuando se necesitan varias mutaciones para la resistencia completa.

1.2. TIPOS DE RESISTENCIA

La resistencia por parte de los microorganismos a los antibióticos puede manifestarse de dos formas diferentes: de forma natural o intrínseca, o de forma adquirida. La resistencia natural es aquella que es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano. Por ejemplo, todas las bacterias gram-negativas son resistentes a la vancomicina, debido a que las porinas que forman los canales en la pared bacteriana son demasiado pequeñas como para dejar pasar las moléculas de gran tamaño de vancomicina, siendo una situación invariable. Por su parte, la resistencia adquirida es variable y es obtenida por una cepa de una especie bacteriana (Medeiros, 1997). De este modo, existen cepas de *E. coli* que son resistentes por ejemplo a la ampicilina, fluoroquinolonas o cefalosporinas de tercera generación, llegando a niveles elevados de resistencia en determinadas regiones mundiales (Kozak *et al.*, 2008).

Otro modo de catalogar los mecanismos de resistencia se basa en el efecto producido por un organismo simple o por una población de organismos. La resistencia individual se refiere a aquella interacción molecular entre una célula bacteriana con su arsenal genético y metabólico, y un antibiótico concreto. Los estudios aquí se centran en las herramientas con las que cuenta la bacteria para evitar la acción del antibiótico en cuestión (Jones, 2001). Dicho arsenal genético y metabólico no es suficiente sólo con que posea un gen de resistencia, ha de tener unos niveles de expresión suficientes y encontrarse regulado de forma apropiada y efectiva para que pueda alcanzar la supervivencia bacteriana (Suzuki *et al.*, 2015). Respecto a la resistencia poblacional, hace referencia al comportamiento in vitro del inóculo o población bacteriana que se enfrenta a una determinada concentración de antibiótico, por un periodo de tiempo concreto. Los estudios llevados a cabo para esta causa son los que proporcionan la

información sobre sensibilidad o resistencia, muy importantes en la orientación terapéutica y sobre el conocimiento de la resistencia. En este caso interviene el sitio de infección, las propiedades farmacocinéticas del antibiótico, el estado inmunológico del organismo, el tamaño del inóculo bacteriano, etc (Jones, 2001).

La aparición de resistencias en los microorganismos se debe principalmente a uno o la combinación de varios mecanismos (siendo esta la más habitual) de resistencia bacteriana a los antibióticos, siendo más o menos efectivos en función del antibiótico administrado y del contacto con el microorganismo. A continuación se proporcionará una breve descripción de los mecanismos de resistencia más habituales, siendo estos la inactivación enzimática, la modificación de las moléculas diana, las alteraciones en la permeabilidad y la producción de biopelículas.

1.2.1. Inactivación enzimática

La inactivación enzimática del antibiótico es el principal mecanismo responsable del aumento de las tasas de resistencia encontradas en terapia clínica y veterinaria. El principal mecanismo implicado es la hidrólisis, como sucede con las β -lactamasas y los β -lactámicos, pero también pueden ocurrir modificaciones no hidrolíticas tales como acetilaciones, adenilaciones o fosforilaciones inactivantes de otros grupos de antibióticos como los aminoglucósidos (Livermore, 1991). Estas enzimas son un claro ejemplo de la plasticidad de la genética bacteriana. Las enzimas responsables de proporcionar resistencia contra los β -lactámicos son las β -lactamasas, que hidrolizan en enlace amida del anillo penicilánico o cefalosporánico produciendo derivados ácidos sin ninguna propiedad antimicrobiana. Las familias más representativas de β -lactamasas son: de tipo C o AmpC, ESBL (a las cuales pertenecen TEM, SHV y CTX-M (Livermore, 1995)) y carbapenemasas. Las bacterias que expresan estas enzimas poseen un mecanismo de resistencia muy efectivo, ya que diversas mutaciones en la secuencia génica y a nivel de cadena peptídica otorga variantes enzimáticas o isoformas capaces de degradar diferentes antibióticos como penicilinas, cefalosporinas y carbapenemes (Rasmussen y Bush, 1997).

Mediante diferentes estudios se ha llegado a la conclusión de que provienen de un grupo reducido de enzimas cromosómicas, que a día de hoy han evolucionado hasta constituir un grupo muy numeroso y variado de enzimas. Las evidencias disponibles tienden a asignarle en su comienzo una función en la síntesis de la pared, sobre todo en las bacterias gram-negativas. Esta hipótesis proviene de los experimentos realizados con *Salmonella spp.*, la cual no codifica en su cromosoma para las β -lactamasas de clase C o cefaminasas. Cuando se le introdujo un plásmido que codificaba para una β -lactamasa de tipo C se observaba en el microorganismo alteraciones morfológicas a nivel de pared, así como retardo en la velocidad de crecimiento y una disminución de su virulencia como consecuencia de estas modificaciones.

1.2.2. Modificación de las moléculas diana

Por lo general, los antibióticos actúan uniéndose a moléculas que forman parte de un proceso relevante en la funcionalidad del organismo. Con dicha unión, el proceso se ve impedido en alguno de los pasos que lo constituyen, con el consiguiente efecto bacteriostático o bactericida. El organismo posee diversas estrategias para imposibilitar este objetivo, como: las modificaciones en el gen que codifica el blanco del antibiótico, como por ejemplo las

alteraciones en las PBP que otorga la resistencia a la penicilina y la ceftriaxona; y la adquisición de genes que codifiquen para sustitutos de los blancos originales (Medeiros, 1997).

En el caso de los β -lactámicos, el sitio blanco son las diferentes PBP (Penicillin Binding Proteins) o proteínas de unión a penicilinas. La información genética perteneciente a estas proteínas se encuentra codificada por el genoma bacteriano y no en los plásmidos. Sin embargo, hay elementos reguladores de la expresión de estos genes que si pueden incluirse y codificarse en la secuencia de los plásmidos. La bacteria puede optar por diversas alternativas para que se produzca una PBP que presente menor afinidad por los antibióticos. Una de ellas es la expresión de un gen alternativo, que codifique para una PBP distinta a la existente, como es el caso de la PBP2' que es menos afín a la mayoría de β -lactámicos (Livermore, 1991).

Otro sitio de acción sería la síntesis de proteínas. Este proceso puede inhibirse al atacar a los componentes nucleares de la replicación del ADN y la transcripción del ARN. Por ejemplo, las quinolonas inhiben la topoisomerasa, enzima encargada del desdoblamiento del ADN en la replicación. Asimismo, la síntesis de las proteínas, puede ser inhibida por otras familias de antibióticos como los aminoglucósidos, tetraciclinas, lincosamidas, los macrólidos o el cloranfenicol. Las alteraciones en el sitio de unión de estos medicamentos ocasionan las resistencias de las bacterias (Endtz *et al.*, 1991). Generalmente, estas alteraciones son cromosómicas, aunque recientemente se han asociado mutaciones génicas que se han transmitido mediante los plásmidos (Wang *et al.*, 2004).

1.2.3. Alteraciones en la permeabilidad

Por lo que concierne a los mecanismos de resistencia donde se producen alteraciones en la permeabilidad de la membrana, podemos distinguir dos tipos: cambios en las porinas y aumento de la salida de antibiótico mediante eflujo.

Las bacterias pueden generar cambios de la bicapa lipídica, aunque la permeabilidad de la membrana se ve alterada, principalmente, por cambios en las porinas. Las porinas son unas proteínas integrales de membrana que forman canales embebidos en la membrana externa, encargándose de la regulación de la entrada de determinadas moléculas, entre ellas los antibióticos. Se encuentran mayoritariamente en las bacterias gram-negativas y algunas gram-positivas, aunque también pueden encontrarse en orgánulos como las mitocondrias. Los cambios que se producen en su conformación pueden llevar a que la membrana externa no permita el paso de determinadas moléculas al espacio periplásmico bacteriano (Vila *et al.*, 2007).

Dichas porinas pueden ser específicas o inespecíficas dependiendo de la selectividad de las moléculas que dejan pasar (Kohler *et al.*, 1999). Hay algunas clases de antibióticos, que por su tamaño, son incapaces de pasar a través de las porinas de los organismos gram-negativos, como es el caso de la vancomicina. Se considera que en este caso, los niveles de resistencia alcanzados no suelen ser suficientes como para conferir resistencia absoluta a un antibiótico sino más bien sensibilidad. La ocurrencia simultánea de este mecanismo en conjunción con otro, como por ejemplo la hidrólisis enzimática, sí puede conferir altos niveles de resistencia y ocasionar los fallos en tratamientos terapéuticos (Quale *et al.*, 2006).

El otro mecanismo por el cual se produce alteración en la permeabilidad implica el eflujo, un mecanismo inespecífico, que afecta a diferentes grupos de antibióticos como los β -lactámicos, quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol. Las bombas de salida han sido reconocidas

por muchos años y están presentes en cada célula pero su popularidad ha venido en aumento debido a la creciente evidencia que las implica como responsables de la resistencia contra antimicrobianos. Se encuentran en la membrana externa y expulsan hacia el exterior de la bacteria gran cantidad de moléculas como metabolitos y solventes empleando la hidrólisis del ATP o un mecanismo de co-transporte iónico. El principal papel de este mecanismo es mantener bajo mínimos las concentraciones de sustancias que puedan resultar tóxicas para el organismo (Poole, 2002; Vila *et al.*, 2007).

En las bacterias gram-negativas, estos sistemas se encuentran constituidos por tres proteínas: una de alto peso molecular asociada a la membrana citoplasmática, otra con función de fusión de ambas membranas y una porina asociada a la membrana externa. Existen cinco superfamilias de proteínas de BE: la familia de casete de unión a ATP (*ATP binding cassette*), la superfamilia del facilitador mayor (*mayor facilitator superfamily*), la familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (*multidrug and toxic-compound extrusión*), la familia de resistencia pequeña a multifármacos (*small multidrug resistance*), y la familia de resistencia a división por nodulación (*resistance nodulation division*).

Estas bombas proteicas pueden ser específicas de antibiótico (generalmente codificadas por el plásmido) o inespecíficas (expresadas en el cromosoma bacteriano). Si se aumenta la expresión de una bomba inespecífica, puede generarse resistencia cruzada a múltiples clases de fármacos (Depardieu *et al.*, 2007). Un solo organismo puede expresar más de un tipo de familia a la vez, en el caso de *E. coli* se expresan varios tipos de la familia de resistencia a división por nodulación, estando altamente involucradas en multiresistencias y en alteraciones de la CMI frente a tres o más antibióticos distintos (Vila y Martínez, 2008; Poole, 2004; Poole, 2005).

1.2.4. Biopelículas

Aunque los genes de resistencia y sus productos proteicos son los principales mecanismos de resistencia a antibióticos, existen otros métodos menos explorados, como el relacionado con la producción de biopelículas. Las biopelículas son agregados adherentes que se forman en las superficies bióticas y abióticas (Callow, 2006). Se ha demostrado que las cepas que producen biopelículas son significativamente más resistentes a antibióticos y agentes antimicrobianos, incluso con la respuesta del hospedante (Gilbert *et al.*, 2002; Stewart, 2002).

Se han propuesto tres mecanismos por los cuales las biopelículas pueden contribuir a la resistencia. En el primero se ha postulado que las células bacterianas encajadas en matrices de polisacáridos que constituyen la biopelícula son menos accesibles a la difusión del antibiótico (Anderl *et al.*, 2000). La segunda razón se trata de una forma de indiferencia del fármaco a causa de los nutrientes y otros limitantes, pues muchas células bacterianas dentro de la biopelícula no se replican ni metabolizan lo suficiente, con lo que los antibióticos no tienen el efecto que deberían tener (Gilbert *et al.*, 1990). La tercera hipótesis, y actualmente la más apoyada, es que las bacterias dentro de las biopelículas se diferencian a estados refractarios de los antibióticos, es decir, una combinación de indiferencia y persistencia de los factores ya comentados (Southey *et al.*, 2005).

1.3. ADMINISTRACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS Y NORMATIVA.

Las sustancias antimicrobianas se emplean en veterinaria con fines terapéuticos y profilácticos bien para tratar o bien para prevenir infecciones. En ambos casos, los antibióticos deben ser suministrados bajo el control de un profesional veterinario y la normativa vigente exige la prescripción de la receta veterinaria (desde 1995, fecha de publicación del Real decreto 109/1995 sobre medicamentos veterinarios; Moreno *et al.*, 2000). Los antibióticos también han sido empleados para la producción animal como promotores del crecimiento. Para este fin no se precisaba de un uso de receta veterinaria, ya que eran considerados aditivos del pienso y existía una lista positiva de antibióticos autorizados en relación con el espécimen animal (Bezoen *et al.*, 1998).

Desde la década de los años cincuenta, la adición de antibióticos en pequeñas dosis al pienso en los animales de abasto ha venido siendo una práctica recurrente a modo de mejora de las producciones. A finales de los sesenta fue cuando empezaron a surgir las primeras voces de preocupación sobre el incremento de la resistencia y la posible relación con el consumo de antibióticos a modo de promotores del crecimiento (Swann Committee, 1969).

A partir de los años setenta, la CEE publicó la Directiva 70/524 sobre los aditivos en la alimentación animal. En ella se exponía que solamente serían empleados como promotores aquellos antibióticos que tuvieran un efecto demostrado sobre el crecimiento animal, que fueran activos frente a bacterias gram-positivas y que no presentaran absorción intestinal para prevenir la presencia de residuos en los productos cárnicos.

Además se suprimieron aquellos antibióticos empleados en clínica humana y veterinaria, prohibiendo por completo el empleo de tetraciclinas y β -lactámicos como promotores del crecimiento en Europa (Federación Europea de Salud Animal, 2015; Organización Mundial de la Salud, 2000 y 2015). La legislación europea, en conjunción con la EFSA, ha seguido modificando la legislación con una nueva regulación aprobada en 2006 (EC 1831/2003), donde se controla y reduce de manera más exhaustiva el empleo de los antibióticos como promotores del crecimiento en Europa (Web oficial de la Unión Europea, 2015).

Actualmente hay una serie de Reales Decretos vigentes en la legislación española sobre el uso de medicamentos veterinarios como el R.D 1002/2012, de 29 de junio, por el que se establecen medidas de aplicación de la normativa comunitaria en materia de comercialización y utilización de piensos así como modifica otro R.D sobre la regulación en la elaboración, comercialización, uso y control de los piensos medicamentosos. Otro R.D es el 2098/2004, de 22 de octubre en el que se modifican las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos (Web oficial de la AEMPS, 2015).

1.4. ECOLOGÍA DE LA TRANSMISIÓN DE RESISTENCIAS

El descubrimiento de genes de resistencia a antibióticos en animales ha revelado que la microbiota intestinal es un reservorio importante para dichos genes de resistencia a antibióticos ampliamente conocidos y otros de última generación. Es importante denotar que aunque los animales de producción contribuyen a la diseminación de las bacterias resistentes, no son necesariamente los originadores de dichos problemas de resistencia (Singer *et al.*, 2003). Ciertos estudios han demostrado la prevalencia de estas resistencias en la cadena alimentaria, particularmente en las bacterias que están presentes por los productos de consumo (Duran y Marshall, 2005; Wang *et al.*, 2006).

En estos estudios se examinó cual era el impacto que tenía la resistencia hacia los antibióticos transmitida por diferentes alimentos a la microbiota intestinal. Dicha microbiota fue capaz de desarrollar resistencias en un corto periodo de tiempo, bajo condiciones en las que no se administraba ningún tipo de antibiótico y mediante una alimentación convencional, llegando a la conclusión de que el tracto gastrointestinal posee un papel muy relevante en la amplificación y diseminación de aquellas bacterias capaces de transmitir resistencias a antibióticos (Zhang *et al.*, 2011).

La adquisición de las resistencias a antibióticos por parte de esta microbiota no está del todo clara pero se han realizado estudios donde se observó que algunos antibióticos como la ampicilina son excretados por la vía renal (Eickhoff *et al.*, 1965), por lo que la microbiota intestinal tiene una mínima exposición frente a estos compuestos. Sin embargo, otros antibióticos como las tetraciclinas, son secretados tanto por la vía renal como mediante el tracto gastrointestinal (Fabre *et al.*, 1971), por lo que la microbiota intestinal sí se verá expuesta al antibiótico y a sus derivados.

La colonización del tracto gastrointestinal por bacterias portadoras de genes de resistencia a antibióticos es un factor clave en el impacto clínico y la epidemiología de estas resistencias. Muchas de las infecciones causadas por bacterias productoras de resistencia son precedidas por la colonización del intestino, teniendo una mención especial la colonización de *E. coli* en el tracto gastrointestinal de animales de producción y humanos (Liebana *et al.*, 2013).

Con esto, los residuos fecales humanos y animales suponen una gran fuente de bacterias que pueden haber desarrollado genes de resistencia, circulando en el medio ambiente y en los diferentes ecosistemas. La presencia de estas bacterias resistentes a antibióticos en la microbiota intestinal supone un método de difusión durante el procesado de los productos cárnicos, así como de los derivados, además de su impacto medioambiental ampliamente documentado, siendo una importante fuente de transmisión hacia humanos y animales (Zhang *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Puesto que estos patógenos multirresistentes y la transferencia de los genes de resistencia suponen un desafío de elevada importancia en el ámbito clínico y veterinario, es preciso encontrar y determinar los tipos de resistencia y poner a punto un método de detección sencillo y rápido con el que controlar su difusión. Con análisis exhaustivos y específicos de muestras de ganadería en broilers y huevos, se conseguirá tener información sobre el estado sanitario de estos productos y sobre el avance de las resistencias antimicrobianas en dicho ámbito.

Estos análisis suponen un importante paso de prevención con el cual poder tomar repercusiones frente a las resistencias antimicrobianas y adoptar las medidas más oportunas y eficaces en los tratamientos antibióticos clínicos y veterinarios. Por tal motivo, el desarrollo de protocolos específicos de detección por métodos bioquímicos y el análisis de éstos es un procedimiento de elevada importancia, teniendo en cuenta que el número de resistencias que se producen en estos casos va en aumento con el paso del tiempo.

Este trabajo se ha focalizado en el estudio y análisis de la especie con mayor repercusión y la más representativa del microbioma intestinal en humanos y animales, la *Escherichia coli*. Además la resistencia a antibióticos en esta bacteria ha sido ampliamente documentada (Saenz *et al.*, 2004).

Al mismo tiempo también se procederá al análisis de la transferencia horizontal de genes de resistencia entre cepas de *E. coli* que actuaran como donadoras y de *Salmonella spp.* que actuaran como receptoras, siendo una especie representativa del género de bacterias anaeróbicas. Con este estudio se observará si los genes de resistencia a antibióticos pueden ser transmitidos entre diferentes especies dentro del microbioma intestinal mediante el proceso de conjugación bacteriana. De este modo se conseguirá determinar y constatar el riesgo de dispersión de dichos genes, investigando la aparición o proliferación de multirresistencias en estos patógenos, lo cual plantea un importante desafío, tanto en medicina humana como veterinaria, a la hora de administrar terapias efectivas (Wiedemann *et al.*, 1989; Brinas *et al.*, 2005).

- Estudio de los patrones de resistencias a antibióticos presentes en cepas de *Escherichia coli* procedentes de heces de broilers y huevos de diferentes orígenes mediante la técnica de Kirby-Bauer o difusión en disco-placa.
- Puesta a punto de las condiciones de PCR para la detección de diversos genes de resistencia a diferentes antibióticos β -lactámicos y tetraciclinas en cepas de *Escherichia coli* procedentes de broilers y huevos.
- Valoración de la utilidad de protocolos multiplex PCR a partir de los resultados obtenidos y posibles adaptaciones para las pruebas rutinarias sobre análisis de presencia de genes de resistencia a estos antibióticos en producción primaria y productos alimentarios.
- Estudio de la transmisión de las resistencias a antibióticos por parte de *Escherichia coli* a otros microorganismos de la microbiota intestinal como *Salmonella spp.* mediante protocolos de conjugación *in vitro*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Aislamiento de las cepas de *Escherichia coli*

Las cepas bacterianas procedentes de broilers se consiguieron a partir de muestras fecales de trabajos anteriores. Las muestras fueron recogidas de meconios mediante presión de la zona abdominal de los pollos de un día de vida y se recogieron en un bote para muestras estéril (no se pudo obtener de todos los pollos puesto que algunos no tenían meconios), manteniéndolas a 4°C hasta su procesado. El número de cepas obtenidas con dicho método fue de un total de 15, quedando anotadas en la *Tabla 1*.

TABLA 1. *Escherichia coli* aislados procedentes de los meconios

Cepa	Muestra	Cepa	Muestra
601	a y b	612	a y b
602	a y b	614	a y b
604	a y b	615	a y b
605	a y b	616	a y b
607	a y b	617	a y b
610	a y b	619	a y b
611	a y b	620	a y b
		622	a y b

Así mismo se obtuvieron muestras procedentes de huevos con distintos orígenes, consiguiendo de este modo una variedad de muestras representativas. El origen de los huevos fue: domésticos o de gallinas criadas por personas sin fines lucrativos, comerciales y con la etiqueta de ecológicos. La procedencia de cada una de las muestras se refleja en la *Tabla 2*.

Cada muestreo fue obtenido de la cáscara del huevo con distinto origen. La falta de continuidad en el número de muestreo y la desigualdad entre el número de cepas obtenidas se basa en la ausencia de estas cepas en algunos de dichos muestreos.

TABLA 2. *Escherichia coli* aislados procedentes de las cáscaras de huevos

Muestreo	Nº de cepas	Origen	Muestra
1	10	Doméstico	M1D(1-10)
2	15	5 comerciales y 10 ecológicos	M2C(1-5) / M2E(1-5) / M2EII(1-5)
3	5	Ecológico	M3E(1-5)
4	15	5 ecológicos y 10 domésticos	M4E(1-5) / M4D(1-5) / M4DII(1-5)
7	5	Ecológico	M7E(1-5)
8	15	5 ecológicos y 10 domésticos	M8E(1-5) / M8D(1-5) / M8DII(1-5)

3.2. Selección de cepas de *Escherichia coli*

Para todos los muestreos realizados, tanto para las muestras procedentes de pollos como aquellas provenientes de huevos, se les realizó una selección de colonias en medio selectivo y diferencial para *E. coli*. En el caso de los huevos se introdujo la cáscara de huevo fragmentada en agua de peptona tamponada (APT), se agitó en vórtex al menos 2 minutos para desprender las posibles bacterias adheridas a la cáscara y se dejaron incubar durante 24h a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. La obtención de las cepas bacterianas se efectuó mediante la selección de aquellas colonias típicas de *E. coli* para el medio TBX, siendo colonias con bordes definidos de color verde o verde azulado, y se realizó un pase en triple estría a placas de PCA (Scharlau Plate Count Agar) dejándolas incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h.

La confirmación bioquímica de estas colonias se realizó mediante la prueba del Indol, para ello se resuspendió una colonia aislada de las placas de PCA en 10 ml de caldo de triptófano (Merck Microbiology DEV Tryptophan Broth) y se dejó incubar a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h. Posteriormente se adicionaron dos gotas de reactivo de Kovacs y se seleccionaron aquellas cepas en las que apareció un anillo rojo en la superficie del tubo. En los casos en que no se obtuvo un crecimiento en las placas de TBX sembradas para los recuentos, se volvió a sembrar en triple estría desde el preenriquecimiento en APT a una placa de TBX y se incubó a $44\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24h y se prosiguió según lo ya descrito para confirmar la colonia como *E. coli*. En aquellas colonias que el Indol dio negativo, se procedió al aislamiento de otra colonia sospechosa de ser *E. coli* desde la placa de TBX y se repitió el mismo proceso.

3.3. Extracción del ADN de *Escherichia coli*

La extracción del material genético de las cepas se realizó mediante el empleo de un kit comercial de extracción de ADN (Signa GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit), con un volumen de muestra 1,5mL procedente de caldo de cultivo con crecimiento de 24h, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

También se realizó un método de extracción alternativo, basado en el “método de Holmes y Quigley” o “boiling” (Holmes y Quigley, 1981), que consiste en el hervido de pequeños volúmenes de muestra a unos $95\text{-}100^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, sin la necesidad de una purificación posterior. La calidad del material genético obtenido por este método es inferior que el del kit comercial previo, pero es un procedimiento rápido y de bajo coste con el que se puede obtener suficiente muestra de ADN y de calidad óptima para el objetivo de este estudio.

3.4. Estudio de la susceptibilidad a antimicrobianos

Para la realización de los estudios de susceptibilidad a antimicrobianos se empleó el método del antibiograma disco-placa del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) el cual detalla el método para el estudio de las susceptibilidades bacterianas a los agentes antimicrobianos. Se fundamenta en la difusión radial del antimicrobiano presente en un disco de celulosa a través del agar, formándose un gradiente de concentración en la que, transcurrido el periodo de incubación (24 horas), se observa un halo de inhibición en el crecimiento de la bacteria.

Los once antibióticos en disco que fueron testados y sus concentraciones de uso fueron: gentamicina CN 10µg, amoxicilina/ácido clavulánico AMC 3µg, ampicilina AMP 10µg, amikacina AK 30µg, kanamicina K 30µg, cloranfenicol C 30µg, cefalotina KF 30µg, ciprofloxacino CIP 5µg, ceftriaxona CRO 30µg, tetraciclina TE 30µg, ácido nalidíxico NA 30µg y estreptomina S 10µg (OXOID antimicrobial susceptibility test disc). Se dispusieron seis y seis discos en cada placa mediante un dispensador de discos (OXOID antimicrobial susceptibility testing disc dispenser). Las placas sembradas y con los discos, se incubaron a una temperatura de 37±1°C durante 24h. Cada antimicrobiano posee unos diámetros de inhibición estandarizados (CLSI, 2012), siendo éstos expresados en mm. La lectura de los halos de inhibición se interpretó como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el CLSI, en referencia comparativa con la cepa *E. coli* ATCC 25922 como control de calidad.

El intervalo de diámetro de los halos para considerarse como S, I o R para cada antibiótico medidos en mm fueron: CN (R: ≤12mm; S: ≥15mm; I: 13-14mm), AMC (R: ≤13mm; S: ≥15mm; I: 14-17mm), AMP (R: ≤13mm; S: ≥17mm; I: 14-16mm), AK (R: ≤14mm; S: ≥17mm; I: 14-16mm), K (R: ≤13mm; S: ≥18mm; I: 14-17mm), C (R: ≤12mm; S: ≥18mm; I: 13-17mm), KF (R: ≤14mm; S: ≥18mm; I: 15-17mm), CIP (R: ≤15mm; S: ≥21mm; I: 16-20mm), CRO (R: ≤13mm; S: ≥21mm; I: 14-20mm), TE (R: ≤14mm; S: ≥19mm; I: 15-18mm), NA (R: ≤13mm; S: 19mm; I: 14-18mm) y S (R: ≤8mm; S: ≥10; I: 7-9mm).

3.5. Conservación de cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* de los diferentes muestreos se mantuvieron en crioviales (Pro-lab Diagnostics Microbank™) a una temperatura de -20°C para estudios posteriores, a partir de cultivos en PCA de 24 h de incubación a 37±1°C.

3.6. Amplificación del ADN mediante PCR

Se realizaron diversas PCR para cada gen de resistencia a antibióticos a partir de las extracciones de ADN. Para su realización se emplearon primers de β-lactamasas pertenecientes a CTX-M (Dallenne *et al.*, 2010), CMY (Kojima *et al.*, 2005) y tetraciclinas pertenecientes a tet(A), tet(B) y tet(C) (Kozak *et al.*, 2008). Todas las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research).

3.6.1. Detección de los genes de β-lactamasas tipo CTX-M

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µL (17µL de mix y 8µL de ADN). Se incluyó un control negativo (se reemplazó el ADN por agua miliQ estéril) y un control positivo (se empleó ADN procedente de una muestra control, 4.2b). La concentración de los reactivos usados para la generación del mix queda reflejada en la *Tabla 3*, con un volumen final de 25µL. Las secuencias empleadas en la reacción de PCR quedan descritas en la *Tabla 4*, junto con el tamaño de amplicón para cada una.

TABLA 3. Condiciones de la PCR para CTX-M multiplex

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Agua MiliQ	10,05	-
Buffer	2,5	1x
MgCl ₂	1,5	1,5mM
Primer CTX-M-1-f	0,5	0,4 pmol/ μL
Primer CTX-M-1,2-r (x2)	0,25 (x2)	0,2 pmol/ μL
Primer CTX-M-2-f	0,25	0,2 pmol/ μL
Primer CTX-M-9-f	0,5	0,4 pmol/ μL
Primer CTX-M-9-r	0,5	0,4 pmol/ μL
dNTP's	0,2	0,5 mM/nt
TaqPol	0,5	2U
Muestra ADN	8	-

Las condiciones de la PCR fueron: un primer ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos, posteriormente 30 ciclos formados por una primera fase de 94°C durante 40s, otra fase de 60°C durante 40s y una fase final de 72°C durante 1 minuto. La etapa final fue a 72°C durante 7 minutos.

TABLA 4. Primers de dideoxinucleótidos empleados para la PCR multiplex de CTX-M

Gen de resistencia	Secuencia del primer (5' a 3')		Amplicón (bp)
	Forward	Reverse	
CTX-M-1	TTAGGAAATGTGCCGCTGCA	CGATATCGTTGGTGGTGCCAT	688
CTX-M-2	CGTTAACGGCACGATGAC	CGATATCGTTGGTGGTGCCAT	404
CTX-M-9	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	TGATTCTCGCCGCTGAAG	561

3.6.2. Detección de los genes de β -lactamasas tipo CMY

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25 μL (17 μL de mix y 8 μL de ADN). Se incluyó un control negativo (se reemplazó el ADN por agua miliQ estéril), no hubo control positivo al no obtener una cepa control que presentara la banda característica del gen. La concentración de los reactivos usados para la generación del mix está presente en la *Tabla 5*. Las secuencias de los primers empleados en la reacción se encuentran en la *Tabla 6*.

TABLA 5. Condiciones de la PCR para CMY-2

Reactivo	Volumen (μL)	Concentración
Agua MiliQ	10,8	-
Buffer	2,5	1x
MgCl ₂	1	1,5mM
Primer CMY-f	1	0,4 pmol/ μL
Primer CMY-r	1	0,4 pmol/ μL
dNTP's	0,2	0,5mM/nt
TaqPol	0,5	2U
Muestra ADN	8	-

Las condiciones de PCR fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30s, de hibridación del primer al ADN a 60°C durante 30s, de extensión a 72°C durante 1 minuto. Para terminar un ciclo de 7 minutos a una temperatura de 72°C.

TABLA 6. Primers de dideoxinucleótidos empleados para la PCR de CMY-2

Gen de resistencia	Secuencia del primer (5' a 3')		Amplicón (bp)
	Forward	Reverse	
CMY-2	ATGATGAAAAAATCGTTATGCT	TTATTGCAGCTTTTCAAGAATGCG	1100

3.6.3. Detección de los genes para tetraciclinas tipo tet(A), tet(B) y tet(C)

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 25µL (17µL de mix y 8µL de ADN). Se incluyó un control negativo (se reemplazó el ADN por agua miliQ estéril) y un control positivo para los genes tet(A) y tet(B), para el gen tet(C) no se pudo obtener cepa con resultado positivo (se empleó ADN procedente de una muestra control, 5.3a). La concentración de los reactivos usados para la generación del mix queda reflejada en la *Tabla 7*. Las secuencias de los primers empleados en la reacción están anotadas en la *Tabla 8*.

TABLA 7. Condiciones de la PCR multiplex para tet

Reactivo	Volumen (µL)	Concentración
Agua MiliQ	6,26	-
Buffer	2,5	1x
MgCl ₂	1,5	1,5mM
Primer tet(A)-f	1	0,1 pmol/µL
Primer tet(A)-r	1	0,1 pmol/µL
Primer tet(B)-f	1	0,2 pmol/µL
Primer tet(B)-r	1	0,2 pmol/µL
Primer tet(C)-f	1	0,5 pmol/µL
Primer tet(C)-r	1	0,5 pmol/µL
dNTP's	0,2	0,5mM/nt
TaqPol	0,54	2,7U
Muestra ADN	8	-

Las condiciones con las que se llevó a cabo la reacción fueron: un primer ciclo de desnaturalización de 15 minutos a 94°C, 30 ciclos constituidos por una fase de 1 minuto a 94°C, otra fase de 1 minuto a 63°C y una fase final de 1 minuto a 72°C. Para terminar un ciclo final de 10 minutos a 72°C.

TABLA 8. Primers de dideoxinucleótidos empleados para tet(A), tet(B) y tet(C)

Gen de resistencia	Secuencia del primer (5' a 3')		Amplicón (bp)
	Forward	Reverse	
tet(A)	GGCGGTCTTCTTCATCATGC	CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	502
tet(B)	CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC	CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG	173
tet(C)	GCTGTAGGCATAGGCTTGGT	GCCGGAAGCGAGAAGAATCA	888

3.7. Comprobación de presencia/ausencia de amplificado por electroforesis

Todas y cada una de las reacciones de PCR, con independencia del protocolo empleado previamente, fueron sometidas a su detección mediante gel de electroforesis de agarosa. De este modo se pudo determinar el funcionamiento de la reacción y observar la amplificación del material genético apropiado y su tamaño.

Se visualizó la presencia de bandeo gracias al empleo de Red Safe (iNtRON biotechnology) al 5%, un agente intercalante de menor toxicidad que el bromuro de etidio y por tanto, más seguro. Se realizó la mezcla de 5µL de muestra procedente de la PCR con 2µL de tampón de carga para la carga del gel. El tamaño de los amplicones fue confirmado mediante comparación con el marcador molecular GeneRuler 100-bp DNA Ladder Plus (MBI, Fermentas, Burlington).

Las muestras se corrieron en un del gel de agarosa de 1,2% de concentración (Agarose, Roche) en tampón TAE 1x, durante unos 45 minutos y a un voltaje de 100V. Los geles se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV.

3.8. Conjugación de cepas resistentes (donadoras) y sensibles (receptoras)

3.8.1. Conjugación de cepas de *Escherichia coli* con *Salmonella spp.*

El proceso de conjugación se llevó a cabo mediante un protocolo predeterminado (Gervers *et al.*, 2003) con unas modificaciones oportunas para el ensayo que nos concierne. Para el inóculo inicial se resuspendieron 3-4 colonias de una variedad de cepas bacterianas receptoras de *Salmonella spp.* en 10mL de TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth) durante 24h a 37±1°C. Dichas cepas eran procedentes de estudios anteriores aisladas de heces de pollo, quedando anotadas en la *Tabla 8*. Dichas cepas receptoras habían pasado por un ensayo de susceptibilidad a antimicrobianos, resultando sensibles a todos ellos, lo que las convierte en aptas para el ensayo. Finalmente se escogieron aleatoriamente dos de las cepas para la realización del ensayo, siendo la cepa 179 y la 188.

TABLA 8. Cepas de *Salmonella spp.* empleadas como cepas receptoras

Cepa	Sensibilidad
<i>Salmonella spp.</i> 179	A los 12 antibióticos
<i>Salmonella spp.</i> 182	A los 12 antibióticos
<i>Salmonella spp.</i> 186	A los 12 antibióticos
<i>Salmonella spp.</i> 188	A los 12 antibióticos

Se procedió del mismo modo con las cepas de bacterias donadoras de *E. coli*, inoculando 3-4 colonias en 10mL de TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth) durante 24h a 37±1°C. Las cepas se escogieron en función de los resultados obtenidos por los ensayos de susceptibilidad a antimicrobianos, escogiendo aquellas que presentaran multirresistencia, quedando anotadas en la *Tabla 9*.

TABLA 9. Cepas de *E. coli*. empleadas como cepas donadoras

Cepa	Resistencia
M2E14	C, AMP, KF, AMC, TE, NA
M2B3	AMC, TE
M3E2	CN, AMP, AMC, TE, NA, S, CIP
M8D2	AMC, TE, NA

A continuación se transfirieron 10 µL de cada una de las cepas, receptoras y donadoras (el equivalente a 1 en la escala McFarland, procedente de un tubo de medio de cultivo con valor 4 en la escala McFarland) a otro tubo con 10mL de TSB, dejando crecer durante 4h a 37±1°C. Posteriormente se cogió 1mL, tanto del medio de cepas donadoras como del medio de receptoras (equivalente a 10⁴ céls/mL) y se dispuso en un tubo nuevo, mezclando 1mL de cepa donadora y 1mL de cepa receptora, haciendo un total de 2mL. La mezcla de cepas queda anotada en la *Tabla 10*.

TABLA 10. Mezcla de cepas de *E. coli* donadoras con *Salmonella* spp. receptoras

Cepas de <i>Salmonella</i> spp. 179	Cepas de <i>Salmonella</i> spp. 188
<i>Salmonella</i> spp. 179 + <i>Escherichia coli</i> M2E14	<i>Salmonella</i> spp. 188 + <i>Escherichia coli</i> M2E14
<i>Salmonella</i> spp. 179 + <i>Escherichia coli</i> M2B3	<i>Salmonella</i> spp. 188 + <i>Escherichia coli</i> M2B3
<i>Salmonella</i> spp. 179 + <i>Escherichia coli</i> M3E2	<i>Salmonella</i> spp. 188 + <i>Escherichia coli</i> M3E2
<i>Salmonella</i> spp. 179 + <i>Escherichia coli</i> M8D2	<i>Salmonella</i> spp. 188 + <i>Escherichia coli</i> M8D2

A partir de aquí se procedió con el protocolo predeterminado. En lugar de emplear Peptone Physiological Saline Solution se usó APT. Como medio no selectivo líquido se usó el TSB. Para la selección de las cepas receptoras de *Salmonella* spp. se empleó el medio cromógeno (Oxoid *Salmonella* Chromogenic Agar Base + Oxoid *Salmonella* Selective Supplement) y TBX para *E. coli*.

La selección de las cepas se produjo mediante la adición de antibiótico en el medio TSB que contenía las dos cepas conjuntamente, siendo los 5 antibióticos seleccionados y con concentración: AMP 64µg/mL (Guinama ampicilina trihidrato), Amox 32µg/mL (Sigma Amoxicillin), S 32µg/mL (Guinama estreptomycin sulfato), NA 32µg/mL (AppliChem Nalidixic Acid) y C 32µg/mL (Panreac Chloramphenicol). Estos medios se realizaron con antibióticos a la concentración mínima inhibitoria equivalente para la concentración de los discos usados en el antibiograma, según indica "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. January 2007" para las Enterobacteriaceae. Con esto, se seleccionaron las cepas de *Salmonella* que conjugaron con *E. coli* y que obtuvieron resistencia a algunos de estos antibióticos mediante conjugación bacteriana.

3.9. Análisis estadístico de los datos

Para el análisis estadístico se empleó el programa informático "Statgraphics Centurion XVI". Se realizó un análisis de los datos empleando un análisis de correlación mediante una tabla de contingencia, específicamente una tabulación cruzada con el fin de analizar la relación entre dos o más variables. Se consideró como estadísticamente significativos aquellos análisis con un p-valor inferior a 0,05.

3.10. Análisis de los primers de PCR

Las secuencias de los primers, procedentes de bibliografía, fueron comprobadas mediante el método de alineamiento contra la secuencia génica del microorganismo, en este caso *Escherichia coli*. Esto se produjo mediante el empleo del programa informático nucleotide BLAST, conseguido vía online por el NCBI. Se procedió al alineamiento de las secuencias de todos los primers empleados en las PCR de CTX-M multiplex, tet multiplex y CMY-2 contra el genoma bacteriano de *Escherichia coli* (taxid:562) con el fin de comprobar su validez.

Del mismo modo se realizó un alineamiento similar entre las secuencias de los primers y el genoma bacteriano, empleando otra herramienta informática de la base de datos europea ENSEMBL.

3.11. Identificación bacteriana

Ante algunos casos donde el crecimiento en placa de las cepas no se correspondía con el característico de *Escherichia coli*, se realizó una identificación bacteriana mediante una tinción de gram. El procedimiento se realizó empleando un protocolo estandarizado de tinción Gram (Bergey *et al.*, 1994).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Susceptibilidad a antimicrobianos

Los datos obtenidos de los análisis de susceptibilidad a los 12 antimicrobianos (AK, AMP, AMC, K, CRO, CIP, NA, CN, TE, S, KF y C) de las 80 cepas en total de *Escherichia coli*, procedentes tanto de los meconios (15 cepas) como de los huevos (65 cepas), presentaron unos valores homogéneos exceptuando el caso de determinadas cepas que presentaron resistencias a un elevado número de antibióticos.

4.1.1. Influencia del origen de la cepa frente a susceptibilidad a antimicrobianos

En el caso de las cepas de *Escherichia coli* procedentes de los meconios se comparó la prevalencia de los niveles de sensibilidad mostrados, ya sea sensible, intermedia o resistente, a los antibióticos, tal y como se muestra en la *Figura 4.1*. Los resultados obtenidos de dichas muestras presentan una mayor predominancia de las cepas bacterianas sensibles a dichos antimicrobianos, con unos valores medios de sensibilidad en torno al 69,44%. Las cepas con mayor valor fueron la cepas 605 (a-b) y la 612 (a-b) con valores de un 83,33%. Los resultados de sensibilidad a antimicrobianos por parte de *Escherichia coli* obtenidos en este estudio, se muestran acordes con la situación observada en otros estudios previos similares (Van den Bogaar *et al.*, 2001; Iqbal *et al.*, 2008; Dierikx *et al.*, 2010), con un valor medio de sensibilidad a antibióticos superior al 60%.

Respecto a los valores de resistencia a antimicrobianos, los valores medios son de un 25,56%, encontrándonos con unos valores de resistencia en torno al 25% en la mayoría de casos y con valores elevados en algunas cepas determinadas como la 604 (a-b) y la 617 (a-b), siendo en estas la prevalencia de resistencia de un 58,33% y 37,50% respectivamente. A diferencia de los valores de sensibilidad, en los valores de resistencia se encuentra una mayor disparidad, debido a que encontramos en algunas cepas valores cercanos al 8% y 12%, y en otros casos valores del 25% y 33%. Estos valores de resistencia, pese a ser elevados en determinadas cepas, concuerdan con los valores obtenidos en otros estudios de susceptibilidad a antimicrobianos en *E. coli* (Sánchez *et al.*, 2008).

En cuanto a los valores de sensibilidad intermedia, los datos muestran una prevalencia escasa, con un valor medio de un 5%. En la mayoría de los casos, los valores de resistencia intermedia presentan valores del 8% mientras que en otros casos, los valores están en torno al 4% y determinados casos como en las cepas 605 (a-b) y la 616 (a-b) son del 0%.

Para determinar la validez del análisis realizado, se realizó la prueba de hipótesis con la que poder determinar si dichos valores se podían aceptar o rechazar en función de si el intervalo de confianza era superior al 95%, quedando probado que eran válidas al presentar un p-valor de 0,0089, inferior al valor de corte establecido en el 0,05.

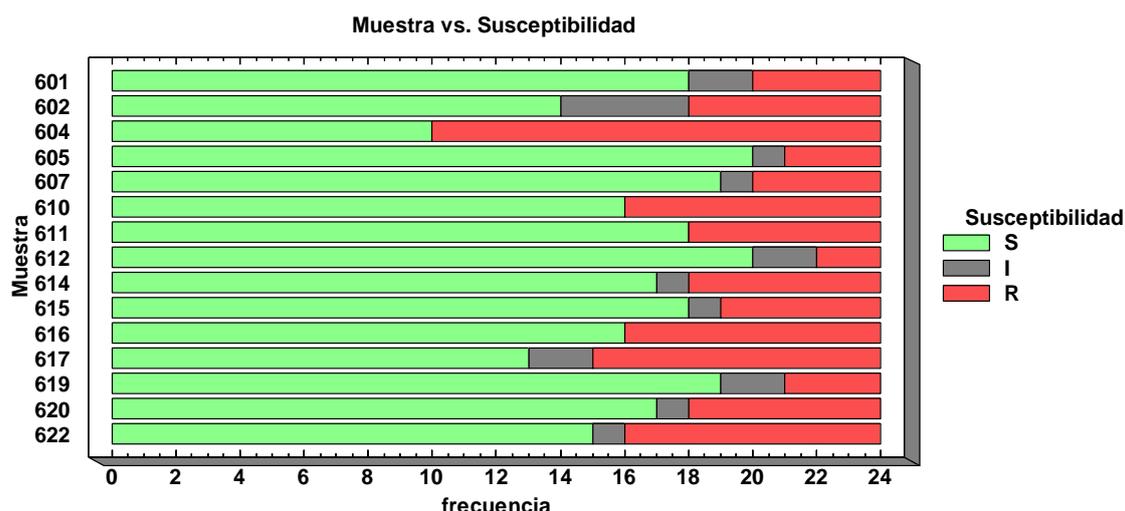


Figura 4.1. Diagrama de barras de Muestra vs. Susceptibilidad en cepas procedentes de meconios. En la gráfica se muestran los valores de susceptibilidad a los 12 antimicrobianos por parte de cada una de las cepas. Al haber dos variantes por cepa el análisis muestra los resultados en 24 antimicrobianos por cepa, con valor sensible (S), intermedio (I) o resistente (R), de las 15 cepas procedentes de los meconios.

Se procedió con el mismo método de análisis para el caso de las cepas de *Escherichia coli* procedentes de las cáscaras de huevos. En este caso se realizó la comparativa entre los diferentes grupos de huevos en función de su origen comercial, doméstico y ecológico, con una comparativa individual entre todos y posteriormente de forma general, frente a la susceptibilidad ante los 12 antimicrobianos.

Los datos obtenidos para las cepas de huevos de origen comercial, mostraron una mayor prevalencia de cepas sensibles a los antibióticos, con un valor medio del 76,67%. Este valor es similar al obtenido en los meconios, ligeramente mayor, puesto que los huevos en su salida quedan expuestos a la microbiota presente en la cloaca del ave, siendo además, muy parejos a los obtenidos en otro estudio (Musgrove *et al.*, 2006). Por lo que respecta a los valores de susceptibilidad intermedia y resistencia, ambos poseen unos valores idénticos, de un 11,67% en los dos casos. Los valores de resistencia obtenidos en las cepas de los huevos comerciales son ligeramente superiores en comparación con los que se postulan en otro estudio (Musgrove *et al.*, 2006), quizás poniendo en manifiesto el aumento de las resistencias a antibióticos con el paso del tiempo.

En este caso, la obtención de cepas procedentes de los huevos comerciales resultó improductiva puesto que en la mayoría de los casos el crecimiento fue negativo. Debido a esto, para obtener unos datos analizables con una mayor fiabilidad, se deberían conseguir aislar un número más elevado de cepas. La teoría postulada para explicar la ausencia de crecimiento de cepas procedentes de los huevos comerciales, se basa en que esta ausencia puede venir ocasionada por el deterioro de las cepas al permanecer un mayor tiempo en unas condiciones no óptimas para su supervivencia, al pasar por las etapas de transporte y almacenamiento típicos de un producto alimenticio comercial. A consecuencia de esta situación, los datos obtenidos de las cepas de huevos comerciales son reducidos, representando el 8,33% del total de las muestras obtenidas y se deben analizar teniendo en cuenta esta reducida representación.

En el caso de las cepas provenientes de los huevos de origen doméstico, con una representación del 41,67%, los resultados mostraron unos valores generales similares a las obtenidas de huevos comerciales. Esto concuerda con lo preestablecido debido a que tanto los huevos comerciales como los domésticos proceden de la misma estirpe de aves con origen comercial (no ecológico), con lo que la variabilidad en los valores de susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas deben ser mínimos. Para los valores de sensibilidad fueron ligeramente mayores que los comerciales, siendo estos muy elevados, del 84%, este dato fue previsible puesto que estas cepas mantienen un menor contacto con moléculas antimicrobianas que las cepas de huevos comerciales. En cuanto a los valores de susceptibilidad intermedia y resistencia, los datos difirieron entre sí, a diferencia de los huevos comerciales. Para la sensibilidad intermedia el valor fue inapreciable, del 4,67%, mientras que para el caso de cepas con resistencia fue del 11,33%, prácticamente idéntico al de las cepas de origen comercial, debido a que comparten el mismo origen de aves progenitoras.

Respecto a los resultados obtenidos para las cepas de huevos de origen ecológico, los valores no correspondieron con la idea preconcebida por estudios previos (Sapkota *et al.*, 2011) de que éstos por su origen tendrían menos cepas resistentes. La prevalencia de cepas sensibles a antimicrobianos ha resultado inferior a la obtenida por los huevos comerciales y domésticos, con un valor del 69,17%. En cuanto a la susceptibilidad intermedia, el valor se situó en un 8,89%, dentro de la media general. Por su parte, la prevalencia de las cepas resistentes a los antibióticos ha sido la más elevada de todas, llegando a ser aproximadamente el doble que en el caso de los huevos comerciales y domésticos, con un valor del 21,94%. La explicación a estos valores de sensibilidad y resistencia obtenidos puede deberse a que pese a que las aves ecológicas no poseen ninguna clase de contacto a antibióticos durante varias generaciones, la posible explicación de esta reducida sensibilidad radica en el contacto de dichas aves en libertad con las bacterias del ecosistema que si puedan haber desarrollado la resistencia, transfiriéndose de este modo a su microbiota. La diferencia entre las cepas de los tres orígenes se puede observar en la *Figura 4.2.*

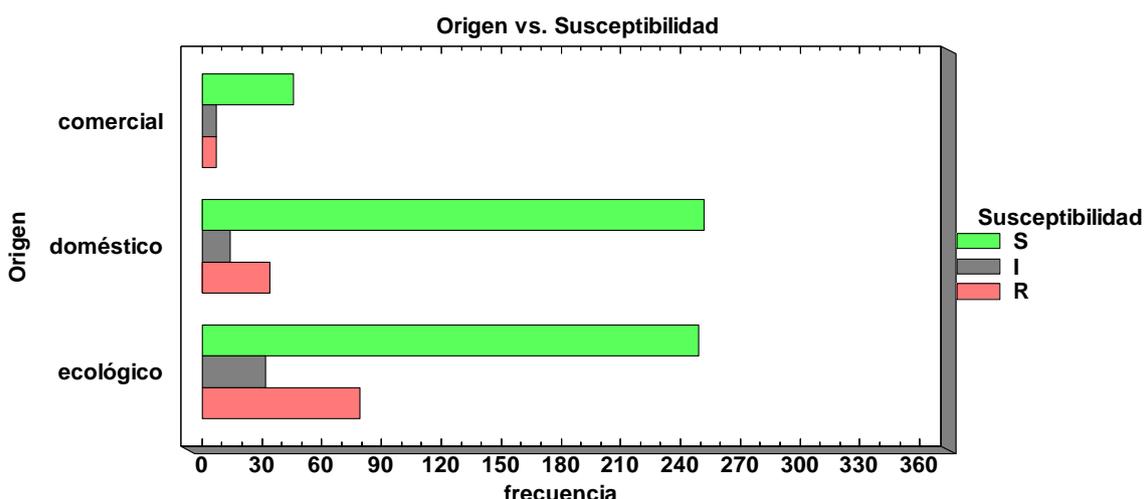


Figura 4.2. Diagrama de barras de Origen de cepas de *E. coli* de los huevos vs. Susceptibilidad. En la gráfica se muestran los valores de frecuencia de susceptibilidad frente a los 12 antimicrobianos de las 60 cepas procedentes de los huevos frente a antimicrobianos, bien sensibles (S), intermedios (I) o resistentes (R), en función de su origen comercial (sobre 60 resultados), doméstico (sobre 300 resultados) o ecológico (sobre 360 resultados).

Los valores generales de susceptibilidad para las cepas de *Escherichia coli* procedentes de la cáscara de huevos con diferente origen, difieren ligeramente de aquellos obtenidos con las cepas procedentes de los meconios. La prevalencia de sensibilidad media a antimicrobianos en las cepas de los huevos tiene un valor del 75,97%, 6 puntos mayor que el valor obtenido por las cepas de meconios. En cuanto a la susceptibilidad intermedia, es ligeramente superior, con un valor del 7,36%, y para el caso de cepas con resistencia, el valor es del 16,67%, siendo inferior al 25,56% obtenido de las cepas procedentes de los meconios.

La explicación a este fenómeno se basaría en que la concentración de bacterias es mucho mayor en los meconios, debido a su naturaleza, que en las cáscaras de los huevos, así como el hecho de que los meconios poseen unas mejores condiciones para la supervivencia. Los huevos sufren un procesado para su comercialización donde la supervivencia bacteriana se ve afectada, a consecuencia de esto la representación bacteriana extraída de los huevos es menor, hecho que afecta a los resultados.

Del mismo modo que se procedió con los resultados obtenidos de los meconios, para determinar la validez del análisis realizado, se realizó la prueba de hipótesis con el fin de poder determinar si los valores obtenidos se podían aceptar o rechazar en función del intervalo de confianza, cuando superara el 95%. En este caso queda probada la validez de los datos al obtener un p-valor de 0,0002, inferior al valor de corte establecido en el 0,05.

4.1.2. Influencia del origen de la cepa frente a resistencia al antibiótico

Se realizó de nuevo un análisis de correlación para determinar la prevalencia de las resistencias en las cepas bacterianas en función su origen, bien meconios o huevos, observando cuales eran las resistencias a antibióticos más predominantes entre cada origen.

Los resultados obtenidos por los meconios demostraron resistencia a un total de 8 antibióticos de los 12 testados, tal y como se muestra gráficamente en la *Figura 4.3*. Las resistencias se centraban mayoritariamente en 3 antibióticos concretos, la amoxicilina (AMC) y la ampicilina (AMP) con 11 cepas resistentes, y el ácido nalidíxico (NA) con 12 cepas resistentes. Por su parte para la tetraciclina (TE) se obtuvieron 5 cepas resistentes, mientras que sólo 2 cepas mostraron resistencia para el ciprofloxacino (CIP) y la cefalotina (KF), y en el caso de la gentamicina (CN) y la estreptomina (S) sólo hubo 1 cepa con resistencia. Los datos obtenidos por este estudio muestran concordancia con los obtenidos en estudios previos (Van den Bogaar *et al.*, 2001; Dierikx *et al.*, 2010) donde se observó la prevalencia de las resistencias a los antibióticos previamente comentados, siendo los β -lactámicos y las fluoroquinolonas los de mayor uso en veterinaria.

La validez de los datos se comprobó mediante la prueba de hipótesis, del mismo modo que con el resto de datos analizados. El valor de corte del p-valor establecido para determinar si aceptar o rechazar la validez de los datos fue del 0,05, obteniendo en este caso un valor de 0,0042, con lo que se demostró que los resultados eran válidos.

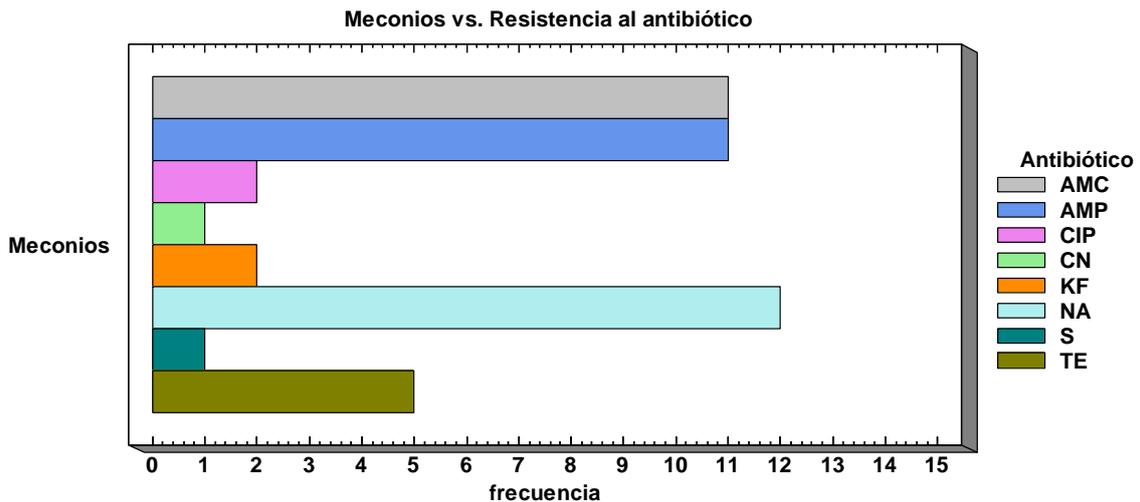


Figura 4.3. Diagrama de barras de Origen de cepas de *E. coli* de meconios vs. Resistencia a antibióticos. En la gráfica se muestran los antibióticos a los cuales se ha presentado resistencia por parte de las 15 cepas obtenidas en los meconios.

Por su parte, en las cepas de *Escherichia coli* procedentes de huevos de origen comercial, las resistencias se centraban principalmente en 2 antibióticos concretos, con 2 cepas resistentes para la amoxicilina (AMC) y 5 para la tetraciclina (TE). El porcentaje de prevalencia de resistencias procedentes de cepas de huevos comerciales supone un 5,83% del total de las resistencias para el conjunto de los huevos. Estos datos concuerdan con los postulados por otros estudios, donde se observa mayor prevalencia de las resistencias a tetraciclinas y β -lactámicos (Van den Bogaar *et al.*, 2001; Musgrove *et al.*, 2006).

En cuanto a las cepas de *Escherichia coli* procedentes de huevos domésticos, se han observado unos valores de resistencia para 5 antibióticos diferentes. Para la amoxicilina (AMC) se encontraron 16 cepas resistentes, para la ampicilina (AMP) 2 cepas, para la cefalotina (KF) 6 cepas y 5 cepas para los antibióticos tetraciclina (TE) y ácido nalidíxico (NA). El total de resistencias supuso un valor del 28,33% frente al conjunto de las cepas procedentes de huevos. De nuevo los valores obtenidos tras el análisis demuestran un patrón similar al conseguido por estudios anteriores (Van den Bogaar *et al.*, 2001; Musgrove *et al.*, 2006).

Finalmente para las cepas provenientes de los huevos de origen ecológico, los datos demuestran que dichas cepas presentaron la mayor variedad de resistencias a antibióticos, frente a un total de 9 antibióticos de los 12 testados. Los datos demostraron una resistencia a la amoxicilina (AMC) en 18 cepas, frente a ampicilina (AMP) en 10 cepas, frente a cloranfenicol (C) en 5 cepas, al ciprofloxacino (CIP) en 10 cepas, frente a gentamicina (CN) en 5 cepas, a la cefalotina (KF) en 1 cepa, al ácido nalidíxico (NA) en 10 cepas, a la estreptomycin (S) en 5 cepas y frente a la tetraciclina (TE) en 15 cepas.

Dichos resultados otorgan a las cepas procedentes de origen ecológico un valor de resistencia frente al total de los huevos del 65,83%. Estos datos son similares aunque ligeramente superiores a los conseguidos en diferentes estudios, donde se analizaron las resistencias más prevalentes en *Escherichia coli* y otras especies de la familia de Enterobacteriaceae (Sapkota *et al.*, 2011; Van den Bogaar *et al.*, 2001; Musgrove *et al.*, 2006), poniendo de manifiesto la elevada prevalencia de la resistencia a antibióticos como tetraciclinas (TE), β -lactámicos (AMP, AMC) y quinolonas (CIP, NA). Los resultados se muestran gráficamente en la *Figura 4.4*.

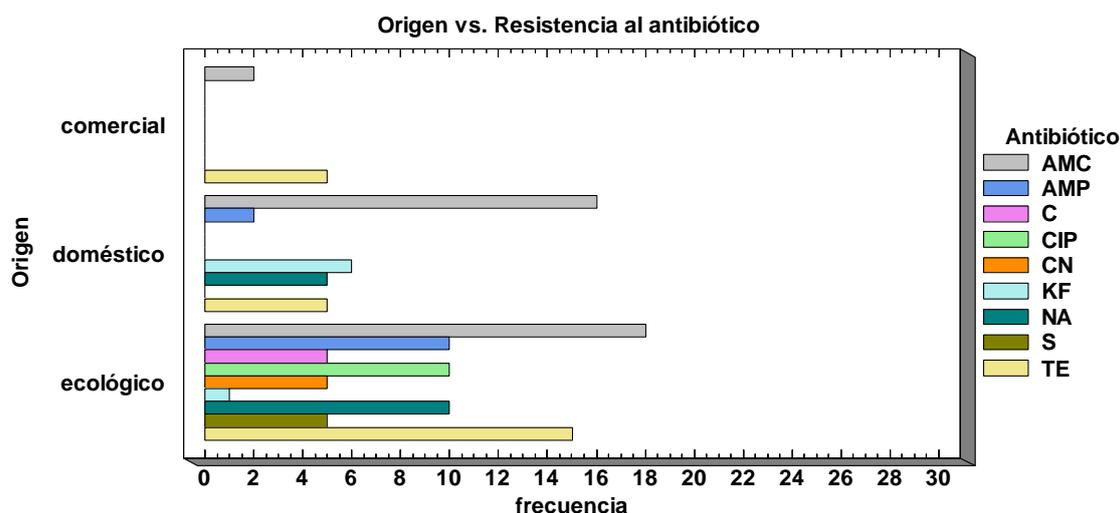


Figura 4.4. Diagrama de barras de Origen de cepas de *E. coli* de los huevos vs. Resistencia a antibióticos. En la gráfica se muestran los grupos de antibióticos a los cuales se ha presentado resistencia por parte de las cepas obtenidas en los huevos, en función de su origen comercial (5 cepas analizadas), doméstico (25 cepas analizadas) o ecológico (30 cepas analizadas).

La validez de los datos analizados quedó demostrada tras superar el intervalo de confianza establecido en el 95%. El valor otorgado por la prueba de hipótesis fue de 0,0005, inferior al p-valor de 0,05 determinado para establecer como válidos los resultados.

4.2. Detección de β -lactamasas de amplio espectro de tipo CTX-M

Como ya se ha comentado con anterioridad, existe una gran variedad de β -lactamasas de amplio espectro de tipo CTX-M. Sin embargo, en este estudio nos hemos centrado en el análisis de las más prevalentes, siendo estas las CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9.

Los resultados obtenidos mostraron una amplificación inespecífica tal y como se muestra en la *Figura 4.5*. Esto indicó que los primers extraídos de la referencia bibliográfica de Dallenne *et al.* del 2010 y empleados en la PCR no resultaron discriminativos para los genes de CTX-M, puesto que además de amplificar dichas regiones génicas, se obtuvo una amplificación de otras regiones de diferente tamaño molecular.

Dichos primers han sido empleados por otros estudios (Blaak *et al.*, 2015; van Hoek *et al.*, 2015; Fernández *et al.*, 2014) con éxito utilizando las condiciones establecidas por Dallenne *et al.* de 2010. Ante esta situación, los primers empleados en la amplificación fueron analizados mediante algoritmos de alineamiento contra el genoma bacteriano de *Escherichia coli* empleando el programa informático BLAST nucleotide, con el fin de acreditar su validez.

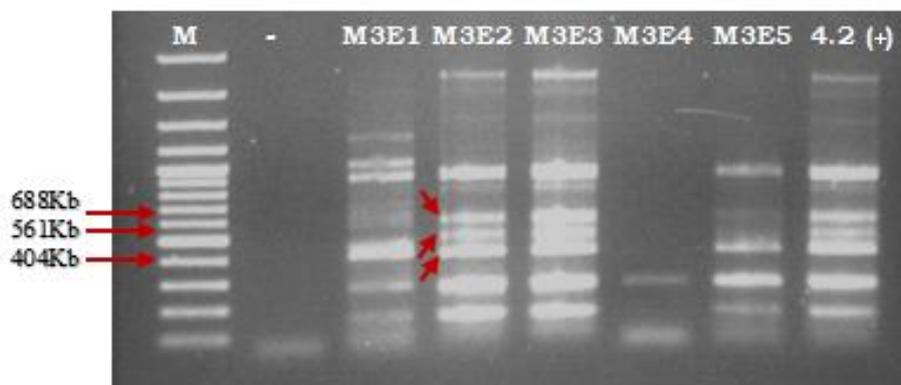


Figura 4.5. Electroforesis tras la amplificación por PCR multiplex de los genes para β -lactamasas de amplio espectro de tipo CTX-M. En la imagen se puede observar una amplificación de regiones inespecíficas, así como las regiones de los genes determinados CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9, señalados con las flechas.

Los resultados obtenidos mediante los gels de electroforesis, mostraron que las secuencias de los primers amplificaban regiones de los genes específicas para CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9, con un tamaño molecular idéntico al correspondido en la bibliografía. A pesar de dichas anomalías en los resultados obtenidos por la amplificación, se procedió a la detección de los genes. La prueba se realizó mediante una PCR multiplex de los tres genes para las muestras provenientes de meconios, generando unos resultados para cada gen específico muy variables.

Para el gen CTX-M-1, de las 30 variantes (15 cepas) de muestras disponibles se obtuvieron resultados positivos en 6 de ellas, para las cepas 602 (a-b), 604 (a-b) y 607 (a-b), lo que supuso el 20% del total de las cepas analizadas. Respecto a los negativos, fueron 24 muestras las que obtuvieron este resultado, suponiendo el 80% restante de las cepas.

En cuanto al gen CTX-M-2, los resultados revelaron 10 muestras positivas, correspondiendo a las cepas 602 (a-b), 604 (a-b), 611 (a-b), 614 (a-b) y 615 (a-b), suponiendo el 33,33% de las cepas totales. Por su parte las 20 muestras restantes dieron negativo.

Finalmente para los resultados del gen CTX-M-9, se han observado 16 muestras con resultado positivo, siendo las cepas 602 (a-b), 604 (a-b), 607 (a-b), 611 (a-b), 614 (a-b), 615 (a-b), 619 (a-b) y 620 (a-b), suponiendo el 53,33% del total de las cepas. Para las 14 muestras restantes se obtuvo un resultado negativo.

Los resultados generales indican que el gen con mayor prevalencia en las cepas procedentes de los meconios es el CTX-M-9, suponiendo el 50% de los positivos para la PCR multiplex de CTX-M, seguido del CTX-M-2 con un valor del 31,25%. Finalmente el gen con menor prevalencia es el CTX-M-1 suponiendo el 18,75% de los positivos, como se muestra en la *Figura 4.6*. Los resultados de este estudio llegan a la misma conclusión que aquellos publicados en estudios anteriores (Rossolini *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015) donde se pone de manifiesto la elevada prevalencia del gen de β -lactamasas tipo CTX-M-9 en *Escherichia coli* y otros géneros de la familia de Enterobacteriaceae.

La prueba de hipótesis realizada sobre los resultados mostro un p-valor del 0,00378, con lo cual se probó la validez de los datos resultados obtenidos tras el análisis, ya que es inferior al valor de corte establecido en el 0,05.

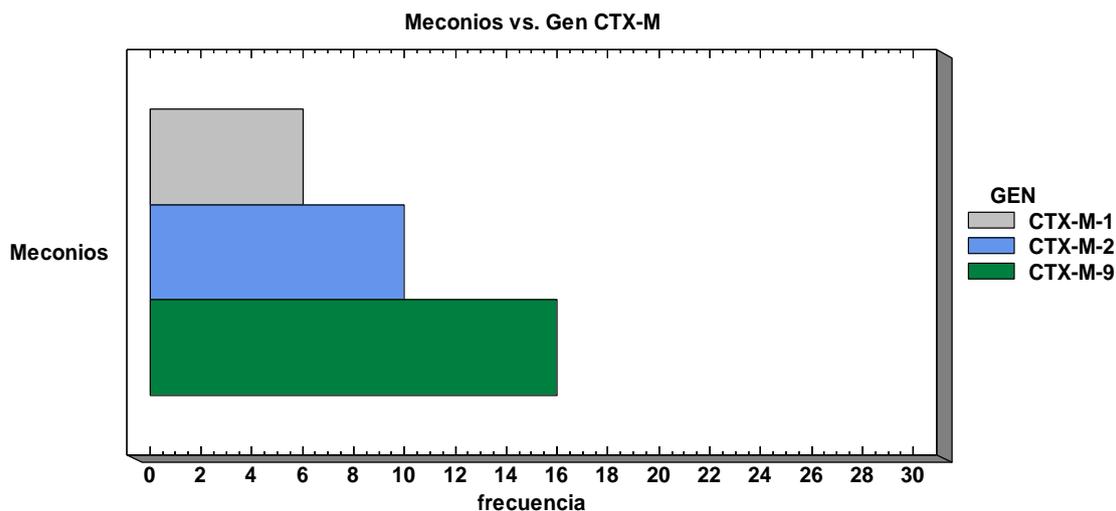


Figura 4.6. Diagrama de barras de Meconios vs. Resistencia en genes de CTX-M. En la gráfica se muestra el número de muestras (30 muestras analizadas) que han dado positivo para la presencia de los genes de CTX-M, diferenciadas por los positivos para cada gen, CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9.

Por lo que concierne a los resultados para las cepas procedentes de los huevos de diferente origen, los resultados obtenidos siguen el mismo patrón que aquellos obtenidos en las muestras de meconios, la amplificación vuelve a mostrar regiones inespecíficas, además de las correspondientes con los genes estudiados.

Los datos conseguidos muestran una gran prevalencia del gen CTX-M-1 para todos los orígenes, con un valor medio de un 76% de positivos, 38 cepas de las 50 estudiadas. En el caso de los huevos comerciales, las cepas han presentado un 100% de positivos, dato que de nuevo hay que tomar con precaución debido a la baja representación de las cepas en esta categoría, por motivos comentados previamente. Por su parte en las cepas de huevos con origen doméstico, tanto los positivos como los negativos se encontraron repartidos, con 10 cepas para cada uno, un 50% de positivos y de negativos en las 20 cepas estudiadas. En cuanto a las cepas provenientes de huevos con origen ecológico, de las 25 cepas estudiadas, 23 han dado positivo para el gen, con un valor del 92%, a diferencia de los negativos que solo han supuesto el 8%.

Por lo que respecta al gen CTX-M-2, los valores medios indican que en el 96% de las cepas han dado positivo para la presencia del gen, dándose en 48 de las 50 cepas totales estudiadas. En el caso de los huevos comerciales y domésticos, los positivos han supuesto el 100% de las cepas analizadas, con 5 y 20 positivos respectivamente, mientras que para el caso de las cepas de huevos ecológicos, el valor de positivos se ve ligeramente disminuido hasta el 92%, suponiendo 23 positivos de las 25 cepas estudiadas.

Respecto a los análisis de presencia del gen CTX-M-9, los resultados indicaron un valor medio de un 86% de positivos, siendo 43 de las 50 cepas las que han dado positivo, frente al 14% de negativos. De nuevo, las cepas provenientes de huevos de origen comercial y doméstico obtuvieron un 100% de positivos, mientras que para el caso de las cepas de huevos ecológicos, los positivos supusieron el 72% de las cepas, esto es, 18 de las 25 analizadas.

En datos de prevalencia del gen en función del origen de los huevos, la prevalencia de cada uno de los tres genes de CTX-M analizados fue similar para las tres categorías de origen. En el caso de las cepas de origen comercial, los tres genes mostraron el mismo valor de prevalencia

siendo un 33,33% para cada uno. En el caso de las cepas de origen doméstico, los valores se distribuyeron con un 20% para el gen CTX-M-1, frente al 40% para los genes CTX-M-2 y CTX-M-9 cada uno. En cuanto a las cepas de huevos ecológicos, tanto el gen CTX-M-1 como el CTX-M-2 presentaron unos valores del 35,94%, mientras que el gen CTX-M-9 supuso el 28,13% restante, datos que quedan mostrados en la *Figura 4.7*.

A nivel general, el gen con mayor prevalencia en las cepas procedentes de los huevos ha sido el gen CTX-M-2 con un valor del 37,21%, seguido por el gen CTX-M-9 con un 33,33%. Finalmente el gen que menor presencia ha demostrado ha sido el CTX-M-1 con un valor del 29,46%, siendo ligeramente menor que los otros dos. Este resultado pone de manifiesto la presión antibiótica de las progenitoras, propiciando una homogeneidad en la dispersión de los genes de CTX-M en los huevos, puesto que no hay una gran diferencia de prevalencia entre ellos.

Además, como queda reflejado en la *Figura 4.7*, la dispersión de los genes en los huevos comerciales es homogénea, resultado que concuerda con una dispersión de los genes a nivel generacional y de modo uniforme. En contraposición a esto, se encuentra la variación obtenida en las cepas de huevos domésticos y ecológicos, donde la dispersión y herencia de los genes no sigue un patrón homogéneo al no haber una presión antibiótica como en los huevos comerciales, puesto que no tienen contacto alguno con moléculas antimicrobianas.

Analizando los resultados en función del origen, los huevos comerciales han supuesto el 11,63% de los resultados positivos, frente a los domésticos que han obtenido el 38,76%. Esto deja a los huevos ecológicos como los que presentan el mayor nivel de presencia de genes de resistencia a β -lactámicos de tipo CTX-M, suponiendo el 49,61% de los casos analizados. Estos resultados pueden deberse a la teoría postulada con anterioridad, donde las aves de origen ecológico están en contacto con un microbioma más diverso que le puede transmitir una mayor variedad de resistencias.

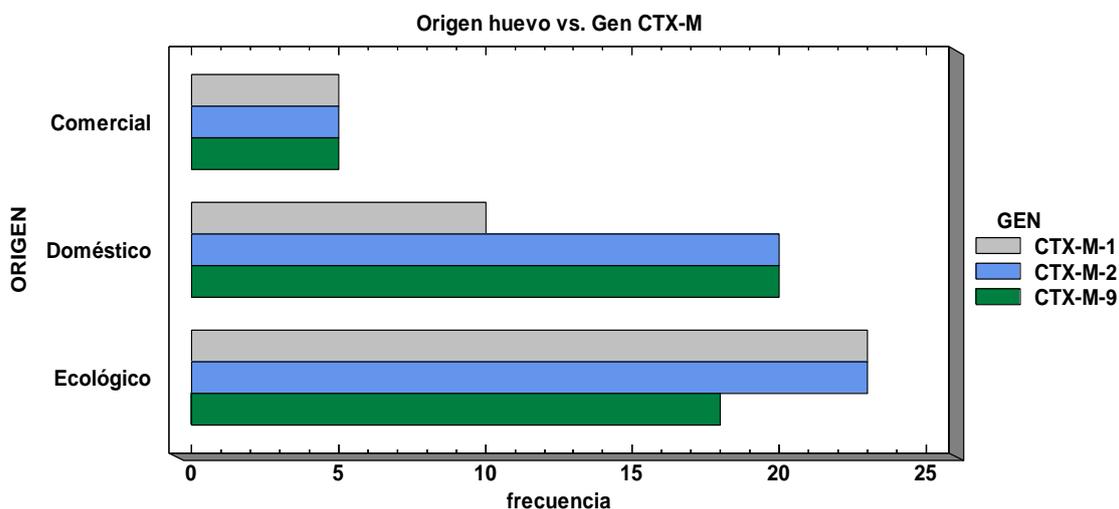


Figura 4.7. Diagrama de barras de Origen de cepas de *E. coli* de huevos vs. Resistencia en genes de CTX-M. En la gráfica se muestran las cepas que han presentado valor positivo para la presencia de genes de CTX-M, en función de los positivos de cada gen, CTX-M-1, CTX-M-2 y CTX-M-9 y de su origen comercial (5 cepas analizadas), doméstico (20 cepas analizadas) y ecológico (25 cepas analizadas).

4.3. Detección de β -lactamasas de amplio espectro de tipo CMY

Con el fin de analizar la presencia del gen para la β -lactamasa de amplio espectro de tipo CMY-2 se siguió el mismo procedimiento que en el caso de las enzimas tipo CTX-M mediante la realización de una PCR específica y posterior visualización del amplificado con un gel de electroforesis.

Los resultados obtenidos en las cepas procedentes de los meconios, demostraron un 100% de ausencia, suponiendo 30 negativos de los 30 posibles, tal y como se observa en la *Figura 4.8*. Frente a la ausencia de cualquier positivo se procedió a la repetición del proceso, obteniendo el mismo resultado en 3 ocasiones. Además, para comprobar que el error no se basaba en si había material genético tras la purificación, se realizó un gel de electroforesis con una muestra de dicho material, observando una banda que verificaba su presencia.

Para determinar si los resultados obtenidos en la amplificación eran válidos, se procedió con una búsqueda bibliográfica donde, además de la original donde se extraen las secuencias de los primers (Kojima *et al.*, 2005), se observó que otros autores empleaban los mismos primers y las condiciones establecidas por éste para la realización de sus estudios (Randall *et al.*, 2011; Shahada *et al.*, 2013; Baron *et al.*, 2014) mostrando resultados positivos para la presencia del gen. Así mismo, se empleó el programa informático de algoritmos de alineamientos de secuencias BLAST nucleotide, para observar las regiones de alineamiento de los primers empleados frente al genoma bacteriano de la *Escherichia coli*, observando resultados válidos al mostrar las secuencias del gen blaCMY-2.

Tras los análisis realizados a fin de verificar la validez de la metodología empleada, y pese a no poseer una cepa control positiva con la que ratificar resultados, se toma como válida la prueba de amplificación por PCR, donde se concluye que las cepas procedentes de los meconios no han mostrado la presencia del gen de β -lactamasas tipo CMY-2 al dar negativo en todas las cepas analizadas.



Figura 4.8. Electroforesis tras la amplificación por PCR del gen para β -lactamasas de amplio espectro de tipo CMY-2. En la imagen se puede observar la ausencia de cualquier banda indicativa de la presencia del gen, siendo esta característica a un peso molecular de 1100Kb.

En el caso de las cepas obtenidas de los huevos de diferente origen, el resultado en la determinación de la presencia del gen fue idéntico al conseguido en las cepas de los meconios, dando valores negativos para todas las cepas analizadas. De nuevo, se realizó el proceso por triplicado a fin de corroborar los datos y se procedió con las comprobaciones previamente comentadas del mismo modo que con las cepas de los meconios.

4.4. Detección de genes para resistencia a tetraciclina tipo tet(A), tet(B) y tet(C)

Como ocurre con los genes de β -lactamasas de amplio espectro de tipo CTX-M, los genes para enzimas de resistencia a tetraciclinas son muy numerosas, por ello, en este estudio nos hemos centrado en el análisis de aquellas más prevalentes en el entorno agropecuario, siendo la tet(A), tet(B) y tet(C) las escogidas para el estudio.

Los resultados analizados, obtenidos mediante amplificación de las cepas procedentes de los meconios, muestran que en el 33,33% de los casos dieron un resultado positivo para el gen de tet(A), suponiendo 5 de las 15 cepas analizadas, correspondiendo con las cepas 601 (a-b), 602 (a-b), 616 (a-b), 617(a-b) y 619 (a-b) las que dieron positivo para la presencia del gen.

En cuanto al gen de tet(B), los resultados muestran que en el 20% de las cepas se dio positivo para la presencia del gen, siendo la 604 (a-b), 617 (a-b) y la 619 (a-b) las 3 cepas con dichos resultados.

Por lo que respecta al gen tet(C), ninguna de las 30 cepas proporcionó un valor positivo. Al no disponer de un control positivo válido para el gen tet(C), se realizó el mismo análisis de los primers mediante el programa de alineamiento BLAST, así como las pertinentes repeticiones de la prueba de amplificación, del mismo modo que se procedió con el gen de las β -lactamasas CMY-2. Finalmente se obtuvieron resultados positivos para el gen en las pruebas realizadas para las muestras de los huevos. Con esto se confirmó que el proceso de amplificación era válido y que en las cepas procedentes de los meconios no se mostró la presencia del gen tet(C).

A nivel de prevalencia general, el gen que presenta mayor presencia es el tet(A), suponiendo un 62,50% de los casos de positivos, frente al 37,50% de presencia del gen tet(B), valores demostrados en la *Figura 4.9*. Dichos valores corresponden con los mostrados en estudios previos (Bryan *et al.*, 2004; Chopra y Roberts, 2001) donde se demuestra la mayor prevalencia de los genes tet(A) y tet(B) en *Escherichia coli* y muestras procedentes de animales.

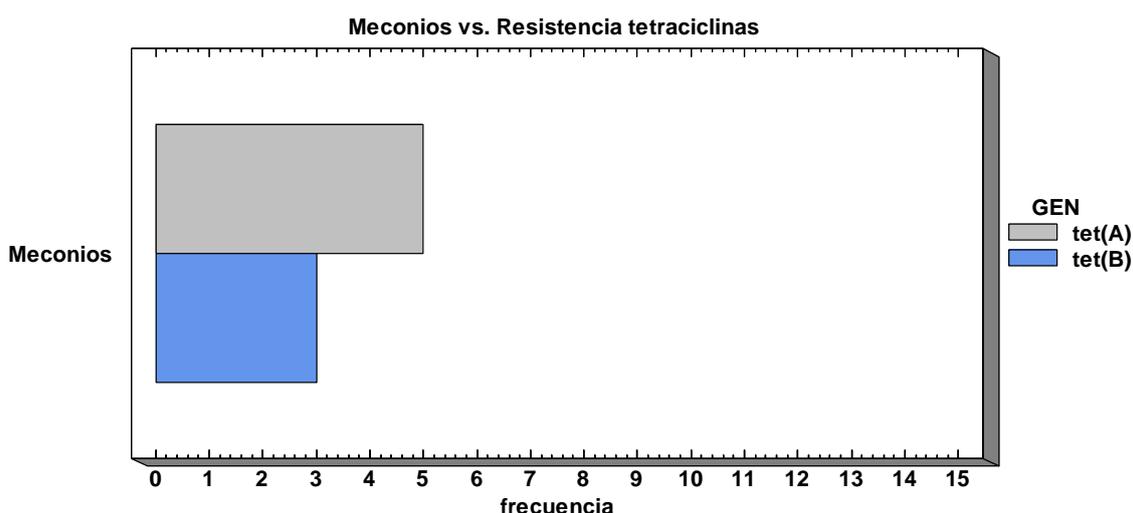


Figura 4.9. Diagrama de barras de Meconios vs. Resistencia en genes de tetraciclinas. En la gráfica se muestra el número de cepas, de las 15 analizadas, que han dado positivo para la presencia de los genes de resistencia a tetraciclinas.

En cuanto a los resultados de las cepas provenientes de los huevos, los análisis por amplificación del gen mostrados en la *Figura 4.10*, se observó un mayor nivel de presencia del gen tet(A) que en los meconios, en el caso de los huevos comerciales y ecológicos, el 100% de las cepas han dado resultado positivo, con 5 y 25 cepas respectivamente, mientras que para los huevos domésticos, el valor fue inferior, situándose en un 65% con 13 cepas positivas de las 20 cepas analizadas.

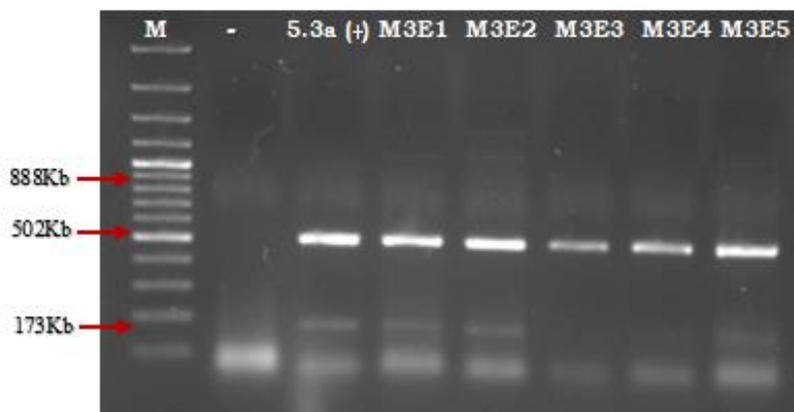


Figura 4.10. Electroforesis tras la amplificación por PCR de los genes de resistencia a tetraciclinas tipo tet(A), tet(B) y tet(C). En la imagen se observa la amplificación de las regiones específicas para los genes, señalados por flechas, de las cepas M3E (ecológicas) analizadas.

Para el gen de tet(B), los resultados indican que en los huevos comerciales de nuevo hay un 100% de positivos, contrastando con el 20% de positivos obtenido en el caso de los huevos de origen doméstico, suponiendo en este solo 4 de las 20 cepas analizadas. En cuanto a los huevos ecológicos, 15 cepas de las 25 han dado valor positivo, suponiendo el 60 % de ellas.

En cuanto a la presencia del gen tet(C), tan sólo 5 cepas de huevos de origen ecológico presentaron un valor positivo para la presencia del gen, suponiendo el 20% de las cepas de origen ecológico.

La prevalencia de cada gen en función del origen, demuestra que para las cepas de huevos comerciales, los genes tet(A) y tet(B) poseen el mismo valor, con el 50% de positivos para cada uno. Por su parte, en el origen doméstico, es el gen tet(A) el que obtiene la mayor presencia, con un 76,47% de los positivos, frente al 23,53% del gen tet(B). Finalmente para el origen ecológico, la prevalencia sigue el patrón general, dominando el gen tet(A) con un 59,72%, seguido del gen tet(B) con un 33,33% y del gen tet(C) con un inapreciable 6,94%. Los datos quedan reflejados gráficamente en la *Figura 4.11*.

A nivel general, los datos muestran que el gen tet(A) es que el que consigue una mayor prevalencia en las cepas procedentes de los huevos, con un valor del 59,72%, frente al 33,33% de prevalencia que se ha obtenido para la presencia del gen tet(B). Finalmente el gen tet(C) es el que menor presencia ha demostrado, con tan solo un 6,94% de los casos.

Los datos alcanzados en este estudio se ajustan a los obtenidos en estudios anteriores sobre la prevalencia de las resistencias a tetraciclinas en muestras animales (Bryan *et al.*, 2004; Chopra y Roberts, 2001), donde los gen de resistencia tet(A) y tet(B) se encuentran entre los de mayor prevalencia.

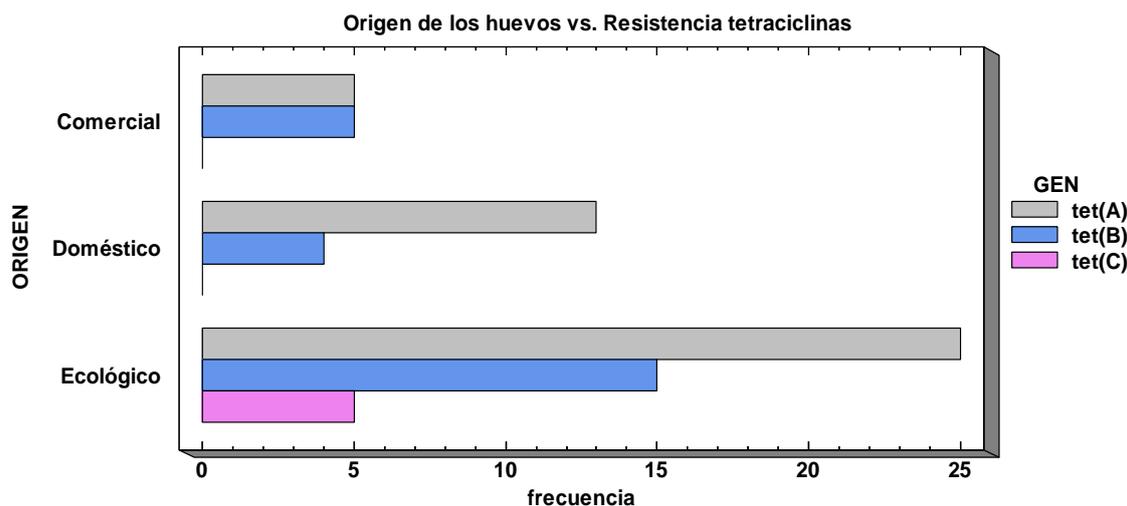


Figura 4.11. Diagrama de barras de Origen de cepas de *E. coli* de los huevos vs. Resistencia en genes de tetraciclinas. En la gráfica se muestran las cepas que han presentado valor positivo para la presencia de los genes de resistencia a tetraciclinas, en función de su origen comercial (5 cepas analizadas), doméstico (20 cepas analizadas) o ecológico (25 cepas analizadas).

Por lo que respecta a la prevalencia general de las resistencias en función del origen, los huevos domésticos supusieron el 13,89% de los positivos obtenidos, frente al 23,61% de los huevos domésticos. Esto indica que los huevos ecológicos fueron los que obtienen el mayor índice de presencia de genes de resistencia a tetraciclinas, suponiendo un valor del 62,50% de positivos obtenidos tras el análisis de las cepas.

Estos datos muestran un resultado similar a los obtenidos en la amplificación de los genes de β -lactamasas tipo CTX-M. Como se observa en la *Figura 4.11*, los huevos comerciales poseen una distribución homogénea de los genes, mientras que en domésticos y ecológicos hay mayor variabilidad. De nuevo los ecológicos poseen el mayor índice de resistencias, posible consecuencia del mayor contacto con un microbioma más variado que le pueda transmitir las resistencias.

4.5. Presencia/ausencia de genes de resistencia en función del origen del huevo

En términos generales de presencia o ausencia de genes de resistencia a antibióticos, los resultados obtenidos tras el análisis han demostrado que los huevos ecológicos son los que mayor presencia de genes de resistencia contienen, suponiendo el 54,23% de todos los positivos obtenidos en las cepas de los huevos. Por su parte los huevos domésticos han sido los segundos, suponiendo el 33,33% de positivos obtenidos a nivel general, frente a los huevos comerciales con un 12,44%, siendo estos últimos los que contienen las cepas con menor presencia de genes de resistencia han presentado, tal y como se demuestra gráficamente en la *Figura 4.12*.

Estos datos se explican con la teoría postulada con anterioridad frente a las resistencias obtenidas en los genes de β -lactamasa tipo CTX-M y tetraciclinas, donde se observa una homogeneidad en los huevos comerciales, y mayor variabilidad en los domésticos y ecológicos, suponiendo estos últimos los que mayor presencia de genes de resistencia poseen en todos los genes analizados.

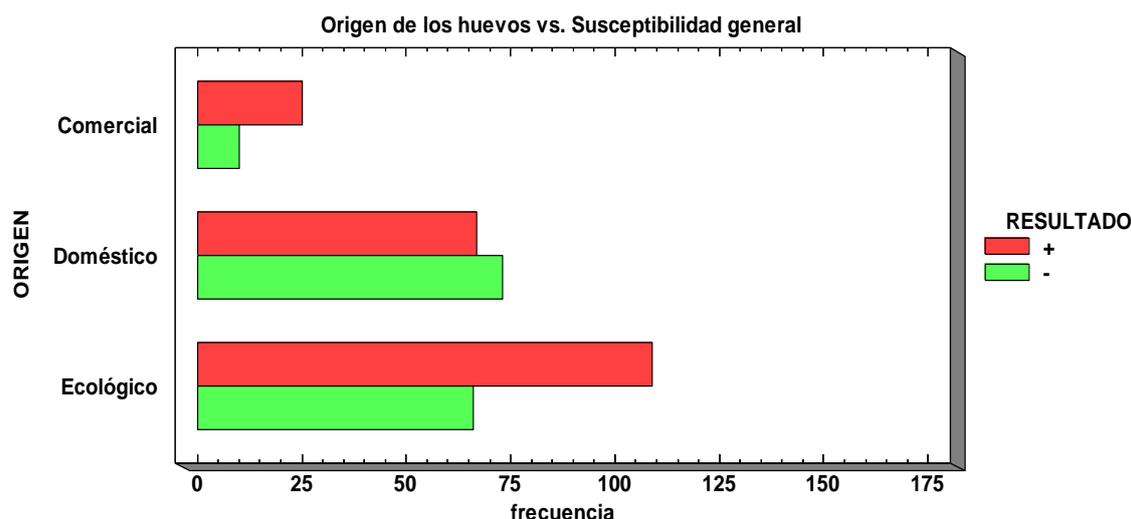


Figura 4.12. Diagrama de barras de Origen de cepas de *E. coli* de los huevos vs. Presencia de positivos y negativos a genes de resistencia. En la gráfica se muestran los positivos y negativos a nivel general para la presencia de genes de resistencia de los 7 genes examinados, obtenidos del análisis de las cepas de huevos comerciales (5 cepas analizadas, 35 datos obtenidos), domésticos (20 cepas analizadas, 140 datos obtenidos) y ecológicos (25 cepas analizadas, 175 datos obtenidos).

4.6. Transferencia de genes de resistencia mediante conjugación

Los resultados obtenidos tras la conjugación de las 8 mezclas de cepas donadoras de *Escherichia coli*, poseedoras de genes de resistencia, tal y como se muestra en la *Tabla 9*, con las cepas receptoras de *Salmonella spp.* sensibles a los antibióticos tal y como se muestra en la *Tabla 8*, han demostrado la transferencia de genes de resistencia en un total de 6 mezclas.

Las 2 cepas 178 y 188 de *Salmonella spp.* empleadas, mostraron sensibilidad a los 12 antibióticos testados, manifestando que no poseían ningún mecanismo de resistencia frente a antimicrobianos. Tras la conjugación de estas cepas con las de *Escherichia coli* resistentes, los resultados mostraron una adquisición por parte de las cepas de *Salmonella spp.* de resistencias frente a algunos antimicrobianos, quedando anotados en la *Tabla 11* y demostrados gráficamente en la *Figura 4.13*.

TABLA 11. Cepas de *Salmonella spp.* receptoras que han mostrado resistencia tras la conjugación

Cepa de <i>Salmonella</i>	Cepa de <i>E. coli</i>	Antibiótico selectivo	Resistencias mostradas
179	M2B3	Ampicilina	2
179	M2B3	Ácido Nalidíxico	1
179	M3E2	Amoxicilina	7
188	M2B3	Cloranfenicol	1
188	M3E2	Amoxicilina	7
188	M3E2	Ácido Nalidíxico	7

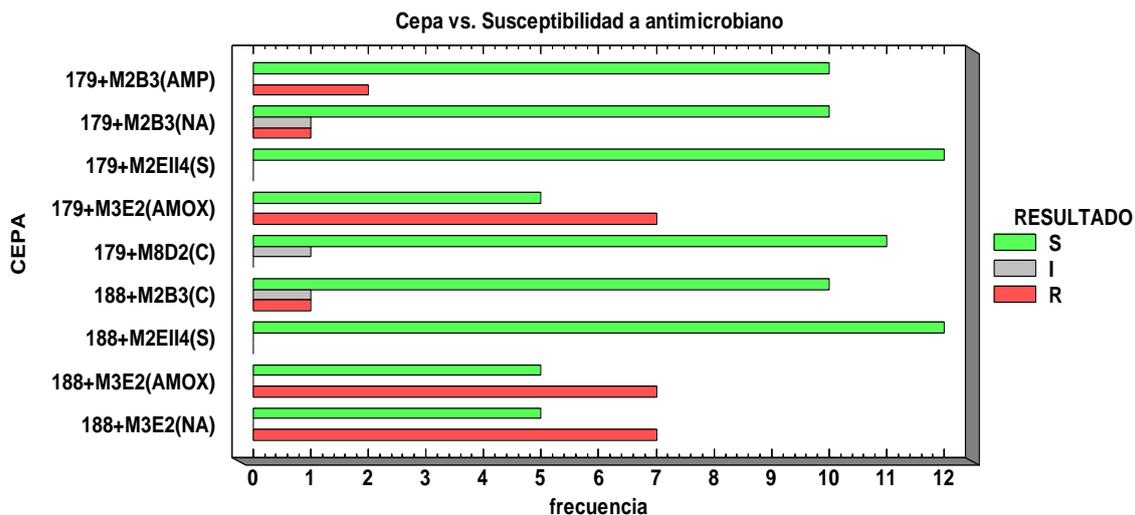


Figura 4.13. Diagrama de barras de Cepas conjugadas vs. Susceptibilidad al antimicrobiano. En la gráfica se muestran los valores obtenidos para los 12 antimicrobianos analizados de sensibilidad (S), susceptibilidad intermedia (I) y resistencia (R) obtenidos por las cepas de *Salmonella spp.* conjugadas con las de *Escherichia coli*.

En cuanto a la resistencia en función del antibiótico, de las cepas de *Salmonella spp.* procedentes de las 6 mezclas positivas para resistencia, los resultados obtenidos muestran que el mayor nivel de transferencia de resistencia a antibiótico ha sido frente a la tetraciclina (TE) suponiendo el 24% de los positivos (positivo en 6/6 cepas), seguido de la amoxicilina (AMC) con valor del 16% frente al total de positivos (positivo en 4/6 cepas). Finalmente se ha obtenido resistencia en 3/6 cepas para los antibióticos ampicilina (AMP), ciprofloxacino (CIP), gentamicina (CN), estreptomycin (S) y ácido nalidíxico (NA), suponiendo cada uno de ellos el 12% de positivos del total. Los resultados obtenidos quedan gráficamente demostrados en la *Figura 4.14*. Estos resultados muestran similitud con otros estudios de transferencia de genes (San Martín *et al.*, 2008) donde se observó un mayor nivel de transferencia de los genes de resistencia a tetraciclinas y β -lactámicos.

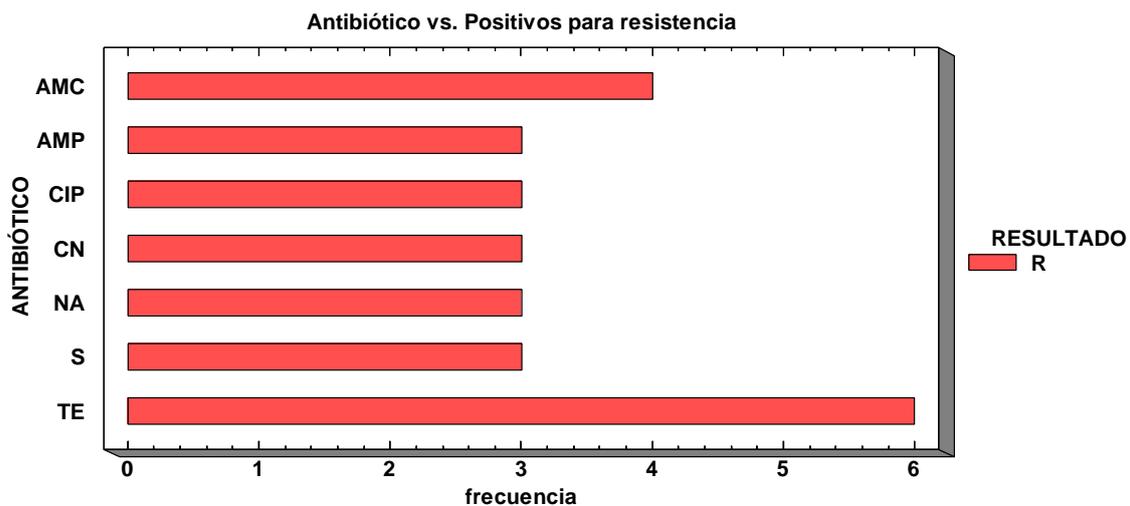


Figura 4.14. Diagrama de barras de Antibióticos vs. Positivos mostrados. En la gráfica se muestran los antibióticos frente a los que se ha mostrado resistencia, en las 6 mezclas de conjugación que presentaban resistencias, por parte de las cepas de *Salmonella spp.*

5. CONCLUSIONES

- Las bacterias procedentes de los meconios muestran unos niveles de resistencia elevados. Pese a poseer unos valores de sensibilidad a antimicrobianos superiores al 60%, en todas las cepas se presentaron resistencias a 1 o más agentes antimicrobianos. Esto pone de manifiesto que las resistencias están presentes desde el inicio de vida del pollo, puesto que éstos son portadores de las cepas resistentes transmitidas por los progenitores.
- Los huevos de origen comercial tienen un menor desarrollo de colonias bacterianas. Las condiciones a las que se ven sometidos los huevos comerciales, de transporte, refrigeración y almacenamiento, hace que las bacterias que se encuentren en su cáscara no puedan tener un desarrollo apropiado, afectando a su supervivencia. Los domésticos y ecológicos por su parte, tienen un menor procesamiento, o nulo, por lo que las bacterias poseen un mayor nivel de supervivencia.
- Los huevos ecológicos poseen el mayor índice de resistencias, por su parte los comerciales poseen una mayor homogeneidad. Los huevos ecológicos proceden de aves ecológicas que se encuentran en libertad, hecho que les permite estar en contacto con un microbioma muy diverso, donde el desarrollo de las resistencias y su transferencia es más variada. Los huevos comerciales provienen de aves comerciales sujetas a una presión antibiótica que promueve una distribución homogénea de las resistencias.
- Las cepas obtenidas de los meconios poseen resistencia a una gran diversidad de antibióticos. Los broilers son portadores de resistencias mayoritariamente a ácido nalidíxico, ampicilina, amoxicilina-clavulánico y tetraciclinas, siendo todos antibióticos ampliamente usados en clínica humana y veterinaria, un hecho que supondría la disminución de la eficacia por parte de los tratamientos administrados en caso de infecciones.
- La distribución de resistencias en los huevos sigue un patrón similar al de los meconios, habiendo un mayor número en los huevos ecológicos. Los huevos comerciales y domésticos presentan resistencias similares a la de los meconios, pero en el caso de los ecológicos, presentan además resistencia a antibióticos como la ciprofloxacina y la estreptomina. Este hecho supone un gran riesgo de transmisión de éstas resistencias, siendo estos antibióticos empleados en clínica para el tratamiento de infecciones graves, pudiendo suponer un problema sanitario.
- Los genes de resistencia a β -lactámicos tipo CTX-M se encuentran entre los de mayor dispersión en *Escherichia coli*. Este hecho expone que la resistencia frente a β -lactámicos se encuentra ampliamente extendida, puesto que tanto en las cepas de meconios como en los huevos se encontró una o varias de las variantes del gen de las β -lactamasas tipo CTX-M.

- Las β -lactamasas tipo AmpC (CMY) no se encuentran representadas en las muestras de broilers y huevos en esta región. Las pruebas de amplificación han demostrado que ninguna de las cepas bacterianas poseía el gen de la β -lactamasa CMY, con lo que pone de manifiesto que en la región analizada para el estudio este mecanismo de resistencia no se encuentra presente.
- La mayoría de cepas bacterianas obtenidas de meconios y huevos presentan uno o varios genes de resistencia a tetraciclina. El gen tet(A) y tet(B) se encuentran en la mayoría de las cepas analizadas para huevos comerciales y domésticos, y en el caso de los ecológicos se ha observado presencia para los tres genes analizados, quedando expuesto la amplia dispersión de los genes de resistencia de un antibiótico con gran uso en veterinaria.
- Las resistencias observadas en *Escherichia coli* se han transmitido mediante conjugación a *Salmonella spp.* Esto confirma la disponibilidad de elementos genéticos móviles y de mecanismos de conjugación, con los cuales poder transmitir la resistencia a antimicrobianos.
- Los genes con mayor índice de transmisión son frente a tetraciclina y amoxicilina-clavulánico. Estos dos antibióticos se encuentran entre los de mayor uso en clínica, con lo que su transmisión y dispersión es un riesgo sanitario de elevada importancia.
- Mediante el empleo de un protocolo simple de amplificación por PCR se puede realizar un análisis de las resistencias a antibióticos presentes y poder determinar el estado de éstas, lo cual supondría en veterinaria la posibilidad de utilizar tratamientos antibióticos más efectivos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- American Academy of Microbiology. 2009. Antibiotic resistance: an ecological perspective on an old problem. Report of a colloquium, 12 to 14 October 2008, Annecy, France. American Academy of Microbiology, Washington, DC.
- Anderl J.N, Franklin M.J & Stewart P.S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44:1818-1824.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.*, 473:174e80.
- Baron S, Jouy E, Larvor E, Eono F, Bougeard S & Kempf I. 2014. Impact of Third-Generation-Cephalosporin Administration in Hatcheries on Fecal *Escherichia coli* Antimicrobial Resistance in Broilers and Layers. *American Society for Microbiology.*, 10.1128/AAC.03106-14.
- Bergey, Holt D, Krieg J, Sneath N & Peter HA. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. *Lippincott Williams & Wilkins*, 9ª edición., ISBN 0-683-00603-7.
- Bezoen A, Van Haren W & Hanekamp J.C. 1998. Emergence of a debate: antibiotic growth promoters (AGPs) and public health. *Heidelberg Appeal Nederland Foundation*. Amsterdam. Netherlands.
- Blaak H, Lynch G, Italiaander R, Hamidjaja RA, Schets F.M & de Roda Husman A.M. 2015. Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *Plos ONE.*, 10(6): e0127752. 10.1371.
- Bradford P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:933–951.
- Brinas L, Moreno M.A, Teshager T, et al. 2005. Monitoring and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains from healthy and sick animals in Spain in 2003. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 49:1262–4.
- Bryan A, Shapir N & Sadowsky M. 2004. Frequency and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in Genetically Diverse, Non-selected, and Non-clinical *Escherichia coli* Strains Isolated from Diverse Human and Animal Sources. *American Society for Microbiology.*, p. 2503-2507.
- Bush K, Palzkill T & Jacoby C. LAHEY CLINIC, β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Burlington, Massachusetts, visto el 18 de abril de 2015. <http://www.lahey.org/studies/>
- Callow J.A & Callow M.E. 2006. Biofilms. *Prog. Mol. Subcell. Biol.*, 42:141-169.
- Carattoli A. 2008. Animal reservoirs for extended spectrum b-lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.*, 14:117-123.
- Casewell M, Friis C, Marco E, McMullin P & Phillips I. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.* 52:159-161.

- Chopra I & Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *American Society for Microbiology.*, 10.1128.
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C & Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.*, 10.1093.
- Daly M, & Fanning S. 2000. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4842-4848.
- Davies J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264:375–382.
- Daza Pérez R.M. 1998. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.*, 22:57-67.
- Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, Collatz E & Courvalin P. 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.*, 20:79-114.
- Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H & Mevius H. 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiology.*, 145:273-278.
- Duran G.M & Marshall D.L. 2005. Ready-to-eat shrimp as an international vehicle of antibiotic-resistant bacteria. *J. Food Prot.*, 68:2395-2401.
- Eickhoff T, Kislak J & Finland M. 1965. Sodium ampicillin: absorption and excretion of intramuscular and intravenous doses in normal young men. *Am. J. Med. Sci.*, 249:163-171.
- Endtz H.P, Ruijs G.J, van K.B, Jansen W.H, van der R.T & Mouton R.P. 1991. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J. Antimicrob. Chemother.*, 27:199-208.
- Fabre J, Milek E, Kalfopoulos P & Merier G. 1971. Kinetics of tetracyclines in human. Excretion, penetration into normal and inflamed tissues, behavior in a case of renal insufficiency and in hemodialysis. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 101:625-633.
- Federación Europea de Salud Animal. Bruselas. Bélgica. Visto el 27 de abril de 2015. <http://www.ifaheurope.org/regulatory-affairs/efficient-regulation.html>.
- Fernández J, Montero I, Fleites A & Rodicio MR. 2014. Cluster of *Escherichia coli* Isolates Producing a Plasmid-Mediated OXA-48 β -Lactamase in a Spanish Hospital in 2012. *American Society for Microbiology.*, 10.1128/JCM.01271-14
- Gervers D, Huys G & Swings J. 2003. In vitro conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *Fed. of Europ. Microbiol. Soc.*, 10.1016/S0378.1097(03)00505-6
- Gilbert P, Collier P.J & Brown M.R.W. 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents, biofilms, cell-cycle, dormancy, and stringent response. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34:1865-1868.

- Gilbert P, Allison D.G & McBain A.J. 2002. Biofilms in vitro and in vivo: Do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.*, 92:98S-110S.
- Hawkey P.M & Jones A.M. 2009. The changing epidemiology of resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64(Suppl. 1):i3-i10.
- Holmes D & Quigley M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, Volumen 114, Issue 1. Páginas 193-197, 0003-2697.
- Iqbal M, Patel K, Ain Q, Barney N, Kiani Q, Rabbani Z, Zaidi G, Mehdi B & Shah S. 2002. Susceptibility Patterns of *Escherichia coli*: Prevalence of Multidrug-resistant Isolates and Extended Spectrum Beta-Lactamase Phenotype. *J Pak Med Assoc.*, 52(9):407-11.
- Jones R.N. 2001. Global aspects of antimicrobial resistance among key bacterial pathogens. Results from the 1997-1999 SENTRY Antimicrobial Program. *Clin Infect Dis.*, 32:S8 1-S156.
- Kinch M.S, Haynesworth A, Kinch S.L & Hoyer D. 2014. An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827-2013. *Drug Discov. Today.*, 19(8):1033-9.
- Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Epp S.F & Pechere J.C. 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:424-7.
- Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, Esaki H, Asai T, Oda C, Tamura Y, Takahashi T & Yamaguchi K. 2005. Extended-spectrum- β -lactamase producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring program. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10.1128/AAC.49.8.3533-3537
- Korolkovas A & Burckhalter J.H. 1983. Compendio esencial de química farmacéutica. *Ed. Reverté.*
- Kozak G, Boerlin P, Janecko N, Reid-Smith R, Jardine C. 2008. 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. *Appl. Environ. Microbiol.*, 10.1128/AEM.01821-08.
- Liebana E, Carattoli A, Coque T.M et al. 2013. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or ampC beta-lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin. Infect. Dis.*, 56: 1030-1037.
- Livermore D.M. 1991. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis.*, 78(Suppl.):7-16.
- Livermore D.M. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8:557-84.
- Medeiros A. 1997. Quality and Resistance. *Clinical Microbiology and Infection.*, 3:452-459.
- Michalova E, Novotna P & Schlegelova J. 2004. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Vet. Med. Czech.*, 49:79-100.
- Moreno M.A, Domínguez L, Teshager T, Herrero I.A & Porrero M.C. 2000. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. *Int. J. Antimicrobial Agents.*, 14:285-90.

- Musgrove M.T, Jones D.R, Northcutt J.K, Cox N.A, Harrison M.A, Fedorka-Cray P.J & Ladely S.R. 2006. Antimicrobial Resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* Isolated from Commercial Shell Eggs. *Poultry Science*. 85:1665-1669
- Organización Mundial de la Salud. 2000. WHO global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO consultation. *Organización Mundial de la Salud.*, Geneva, Switzerland.
- Organización Mundial de la Salud. 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 3rd Revision.
- Poirel L, Bonnin R.A & Nordmann P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum beta-lactamases in Gram-negative rods. *Infect. Genet. Evol.*, 12:883-893.
- Poole K. 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 3:77-98.
- Poole K. 2004. Efflux mediated multi-resistance in Gramnegative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.*, (10):12-26.
- Poole, K. 2005. Efflux mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, (56):20-51.
- Quale J, Bratu S, Gupta J & Landman D. 2006. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:1633-41.
- Randall L, Clouting C, Horton R, Coldham N, Wu G, Clifton-Hadley F, Davies F & Teale C. 2011. Prevalence of *Escherichia coli* carrying extended-spectrum b-lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.*, 66:86-95.
- Rasmussen B & Bush K. 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 41(2):223-32.
- Report of the Joint Committee of the use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine. Swann Committee Report. London: HMSO, 1969.
- Rodríguez-Verdugo A, Gaut B.S, Tenailon O. 2013. Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evol. Biol.*, 13:50.
- Rossolini G, D'Andrea M & Mugnaioli C. 2008. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Journal Comp. European. Soc. Of Clinical Microb.*, (Suppl. 1), 33-41.
- Sáenz Y, Brinas L, Dominguez E et al. 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:3996-4001.
- Salyers A.A, Gupta A & Wang Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.*, 12:412e6.
- San Martín B, Lapierre L, Cornejo J & Bucarey S. 2008. Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella spp.* isolated from swine. *Can. J. Microbiol.*, 54 : 1-8. 10.1139/W08-045

- Sánchez J.M, Guilán C, Fuster C, López R, González M, Raya C & García J. 2008. Evolución de la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* en muestras de orina procedentes de la comunidad. *Arch. Esp. Urol.*, 61, 7(776-780).
- Sapkota A, Hulet R.M, Zhang G, McDermott P, Kinney EL, Schwab KJ & Joseph S. 2011. Lower prevalence of antibiotic-resistant Enterococci on U.S. Conventional Poultry Farms that Transitioned to Organic Practices. *Environ. Health Perspectives.*, 119:1622-1628
- Schenk M.F & de Visser J.A. 2013. Predicting the evolution of antibiotic resistance. *BMC Evol. Biol.*, 11:14.
- Shahada F, Chuma T, Kosugi G, Kusumoto M, Iwata T & Akiba M. 2013. Distribution of extended-spectrum cephalosporin resistance determinants in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from broilers in southern Japan. *Poultry Science.*, 92:1641-1649.
- Singer R.S, Finch R, Wegener H.C, Bywater R, Walters J & Lipsitch M. 2003. Antibiotic resistance, the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect. Dis.*, 3:47-51.
- Southey-Pillig C.J, Davies D.G & Sauer K. 2005. Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* 187:8114-8126.
- Stewart P.S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial bio-films. *Int. J. Med. Microbiol.*, 292:107-113.
- Suzuki S, Horinouchi T & Furusawa C. 2015. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. *Nature Comm.*, 10.1038.
- Tenover F.C & McGowan J.E. 1996. Reasons for the emergence of antibiotic resistance. *Am. J. Med. Sci.* 311:9-16.
- Van den Bogaard A.E, London N, Driessen C & Stobberingh E.E. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*, 47:763-771.
- Van Hoek A.H.A.M, Schouls L, van Santen M.G, Florijn A, de Greeff S.C & van Duijkeren E. 2015. Molecular Characteristics of Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Enterobacteriaceae from Humans in the Community. *Plos ONE.*, 10(6):e0129085. 10.137
- Vila J, Marti S & Sanchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 59:1210-5.
- Vila J & Martínez J.L. 2008. Clinical impact of the over-expression of efflux pump in non-fermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors. *Curr. Drug Targets.*, (9):797-807.
- Wang M, Sahm D.F, Jacoby G.A, Hooper D.C. 2004. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the qnr gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48:1295-9.
- Wang H.H, Manuzon M, Lehman M, Wan K, Luo H, Wittum T.E, Yousef A & Bakaletz L.O. 2006. Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:226-231.

Web oficial de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Medicamentos veterinarios, Legislación. Madrid, España. Visto el 18 de Febrero de 2015. <http://www.aemps.gob.es/legislacion/espana/medicamentosVeterinarios/medVeterinarios.htm>

Web oficial de la Organización Mundial de la Salud. Media Centre. WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Ginebra, Suiza. Visto el 15 de Mayo de 2015. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>

Web oficial de la Unión Europea. Food and feed Safety, basic legislation on Animal Nutrition, Bruselas. Bélgica. Visto el 27 de Abril de 2015. http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/legisl_en.htm

Wiedemann B, Kliebe C & Kresken M. 1989. The epidemiology of betalactamases. *J. Antimicrob. Chemother.*, 24(Suppl. B):1–22.

Zhang L, Kinkelaar D, Huang Y, Li Y, Li X & Wang HH. 2011. Acquired antibiotic resistance: are we born with it? *Appl. Environ. Microbiol.*, 77:7134-7141.

Zhang L, Huang Y, Zhou Y, Buckley T & Wang H. 2013. Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10.1128/AAC.00670-13.

Zhang H, Zhou Y, Guo S & Chang W. 2015. High prevalence and risk factors of fecal carriage of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae from healthy rural residents of Taiwan, China. *Front. Microbiol.*, 6:239-10.3389.