



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Escola Tècnica Superior
d'Enginyeria Agronòmica i del Medi Natural

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

DETECCIÓN DE CEPAS
MULTIRRESISTENTES DE *E. coli*
MEDIANTE ANÁLISIS DE
RESISTENCIA FENOTÍPICA Y
GENOTÍPICA, EN PRODUCTOS
AVÍCOLAS DESTINADOS A
CONSUMO HUMANO.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
Y DEL MEDIO NATURAL

AUTORA: NEUS BLANCO GUARNER
TUTORA: ROSA M^a MONTES ESTELLÉS

CURSO ACADÉMICO: 2018/2019
FECHA: València, septiembre, 2019

DETECCIÓN DE CEPAS MULTIRRESISTENTES DE *E. COLI* MEDIANTE ANÁLISIS DE RESISTENCIA FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA, EN PRODUCTOS AVÍCOLAS DESTINADOS A CONSUMO HUMANO.

Blanco Guarner, Neus¹, Montes Estellés, Rosa M^{a2}.

Valencia, septiembre de 2019

RESUMEN

El uso incontrolado de antimicrobianos de amplio espectro para el tratamiento de ciertas patologías en el sector avícola, ha dado lugar a la aparición de cepas multirresistentes de *Escherichia coli* en la industria alimentaria. En el presente estudio, se evaluó el perfil de resistencia a nivel fenotípico de un total de 114 cepas de *E. coli* aisladas a partir de 30 muestras de pollo procedentes de trece comercios del este de España, para ello se empleó la prueba de susceptibilidad agar-difusión en discos, en la cual se utilizaron ocho antimicrobianos distintos de interés clínico. De las cepas aisladas, se seleccionaron 58 según su patrón de resistencias, para completar este perfil mediante el estudio por PCR de los genes involucrados en las resistencias a dos familias antimicrobianas ampliamente utilizadas, las tetraciclinas y los β -lactámicos. Los resultados muestran un ratio de resistencia elevado (50-70%) para el ácido nalidíxico, resistencia moderada (30-50%) para la tetraciclina y la ampicilina, y por último, resistencia baja o muy baja ($\leq 10\%$) para el ciprofloxacino, la gentamicina, el cloranfenicol, la cefotaxima y la ceftriaxona. Asimismo, se detectaron 14 patrones de resistencia diferentes, sin embargo, solo un 27,19% de los aislamientos mostraron un fenotipo con multirresistencia a 3 y 4 familias de antibióticos. Los resultados genéticos muestran que el 100% de las cepas que presentaban un fenotipo de resistencia a tetraciclinas contenían al menos en su genotipo un gen de resistencia tet (A) o tet (B). En relación a la ampicilina (β -lactámicos), en el 100% de aislamientos resistentes se detectó el gen bla_{TEM}.

Palabras clave: multirresistencia, *E. coli*, pollo, PCR, genes de resistencia, antibióticos, antibiograma, patrones de resistencia.

ABSTRACT

The uncontrolled use of broad-spectrum antimicrobials for the treatment of certain pathologies in the poultry sector has resulted in the emergence of multi-resistant strains of *Escherichia coli* in the food industry. In the present study, the phenotypic resistance profile of a total of 114 strains of *E. coli* isolated from 30 chicken samples from thirteen stores in eastern Spain was evaluated, for this purpose the agar-diffusion susceptibility test was used, in which eight different antimicrobials of clinical interest were used. Of the isolated strains, 58 were selected according to their resistance pattern to complete this profile by PCR study of the genes involved in resistance to two widely used antimicrobial families, tetracyclines and β -lactams.

¹ Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

² Departamento de Biotecnología, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España.

The results show a high resistance ratio (50-70%) for nalidixic acid, moderate resistance (30-50%) for tetracycline and ampicillin, and finally, low or very low resistance ($\leq 10\%$) for ciprofloxacin, gentamicin, chloramphenicol, cefotaxime and ceftriaxone. In addition, 14 different resistance patterns were detected, however, only 27.19% of the isolates showed a phenotype with multi-resistance to 3 and 4 antibiotic families. Genetic results show that 100% of the strains with a tetracycline resistance phenotype contained at least one tet (A) or tet (B) resistance gene in their genotype. In relation to ampicillin (β -lactamic), the bla_{TEM} gene was detected in 100% of resistant isolates.

Key words: multiresistance, *E. coli*, chicken, PCR, resistance genes, antibiotics, antibiogram, resistance patterns.

RESUM

L'ús incontrolat d'antimicrobians d'ampli espectre per al tractament de certes patologies en el sector avícola, ha donat lloc a l'aparició de ceps multiresistents d'*Escherichia coli* en la indústria alimentària. En el present estudi, es va avaluar el perfil de resistència fenotípica d'un total de 114 ceps d'*E. coli* aïllades a partir de 30 mostres de pollastre procedents de tretze comerços de l'est d'Espanya, per a dur-ho a terme, es va emprar la prova de susceptibilitat agar-difusió en discs, en la qual es van utilitzar huit antimicrobians diferents d'interès clínic. Dels ceps aïllades, es van seleccionar 58 segons el seu patró de resistències per així, poder completar el perfil per mitjà de l'estudi per PCR dels gens involucrats en les resistències a dues famílies antimicrobianes àmpliament utilitzades, les tetraciclins i els β -lactams. Els resultats mostren un radi de resistència elevat (50-70%) per a l'àcid nalidíxic, resistència moderada (30-50%) per a la tetraciclina i l'ampicil·lina, i finalment, resistència baixa o molt baixa ($\leq 10\%$) per al ciprofloxacina, la gentamicina, el cloramfenicol, la cefotaxima i la ceftriaxona. Així mateix, es van detectar 14 patrons de resistència diferents, no obstant això, només un 27,19% dels aïllaments van mostrar un fenotip amb multiresistència a 3 i 4 famílies d'antibiòtics. Els resultats genètics mostren que el 100% dels ceps que presentaven un fenotip de resistència a tetraciclins contenien almenys en el seu genotip un gen de resistència tet (A) o tet (B). Respecte a l'ampicil·lina (β -lactams), en el 100% d'aïllaments resistents es va detectar el gen bla_{TEM}.

Paraules clau: multiresistència, *E. coli*, pollastre, PCR, gens de resistència, antibiòtics, antibiograma, patrons de resistència.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTADO DE TABLAS	II
LISTADO DE FIGURAS	II
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades.....	1
1.2. Estrategias.	1
1.3. Problema actual.....	2
1.4. Antimicrobianos como promotores del crecimiento y posible implicación en la resistencia de cepas bacterianas	3
1.5. Resistencias antimicrobianas	4
1.6. <i>Escherichia coli</i> y su importancia en la resistencia antimicrobiana	8
1.7. <i>E. coli</i> comensal como indicador de la resistencia a antimicrobianos.	9
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Muestreo, aislamiento y recuento de los microorganismos.....	12
3.2. Test de sensibilidad fenotípica a antimicrobianos.....	13
3.3. Análisis de la resistencia genotípica a antimicrobianos	14
3.3.1. <i>Extracción del ADN</i>	14
3.3.2. <i>Detección de genes de resistencia</i>	14
3.3.3. <i>Visualización del ADN</i>	15
4. RESULTADOS	17
4.1. Recuento de microorganismos.....	17
4.2. Análisis de la resistencia fenotípica.....	18
4.2.1. <i>Tasas de resistencia a antibióticos</i>	18
4.2.2. <i>Patrón de resistencia</i>	21
4.3. Análisis de la resistencia genotípica.	23
5. DISCUSIÓN	27
6. CONCLUSIONES	28
7. REFERENCIAS	29
8. ANEXOS	33

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. Límites máximos de residuos en productos de aves de corral según las autoridades legislativas.....	3
TABLA 2. Mecanismos de resistencias de las principales familias de antimicrobianos utilizados en la industria avícola.....	10
TABLA 3. Genes de resistencias asociados a las familias de antibióticos, secuencia de los cebadores, tamaño de amplicón, cepas analizadas y referencias.....	15
TABLA 4. Recuento y detección de microorganismos en muestras cárnicas del sector avícola.....	16
TABLA 5. Resistencia fenotípica de <i>E. coli</i> a los antibióticos testados.....	18
TABLA 6. Patrón de resistencias de las cepas aisladas de <i>E. coli</i>	21
TABLA 7. Resultados del análisis de la presencia de 5 genes de resistencia en cepas de <i>E. coli</i> resistentes.....	23
TABLA 8. Resultados del análisis de la presencia de 5 genes de resistencia en cepas de <i>E. coli</i> sensibles.....	24

LISTADO DE FIGURAS

FIGURA 1. Ejemplo de recuento de coliformes a partir de una muestra de hígado.....	13
FIGURA 2. Halos de resistencia-sensibilidad de la cepa aislada 23-1-17 de <i>E. coli</i> frente a los 8 antimicrobianos seleccionados.....	17
FIGURA 3. Patrón de multirresistencia a tres clases de antimicrobianos: Ampicilina, Tetraciclina y Ácido nalidíxico.....	20
FIGURA 4. Amplificación de los genes de resistencia tet (A) y tet (B) en <i>E. coli</i> con la presencia de bandas de amplificación de 502 y 173, respectivamente.....	24
FIGURA 5. Amplificación de los genes de resistencia bla _{TEM} y bla _{CMY-2} en <i>E. coli</i> con la presencia de bandas de amplificación de 247 y 1000, respectivamente.....	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1. GENERALIDADES.

El uso desenfrenado de antimicrobianos de moderado y amplio espectro para el tratamiento humano, veterinario y como factor de crecimiento en el sector avícola, ha dado lugar a la aparición de resistencias en patógenos bacterianos, pudiéndose identificar cepas multirresistentes. En la actualidad, este hecho ha desencadenado un importante problema de salud pública, que afecta a distintos ámbitos relacionados con el ser humano (Roca *et al.*, 2015).

Desde hace tiempo, se han empleado enormes cantidades de antimicrobianos en diferentes especies de animales destinados a la industria alimentaria, para aumentar el crecimiento y el rendimiento de estos, para higiene y prevención o para ofrecer tratamientos frente a determinadas infecciones. Debido a estas prácticas, se ha ido incrementando la presión selectiva de los microorganismos comensales y de los patógenos que invaden a los animales, con ello los microorganismos que superan la presión de selección son capaces de introducirse en la cadena alimentaria y llegar a ser consumidos por el hombre (Roca *et al.*, 2015).

Cabe destacar la importancia de ámbitos como el ambiental o sanitario, en los cuales se puede favorecer una mayor selección de microorganismos, obteniendo así más genes de resistencia mediante transferencias horizontales. Por lo que respecta al medio ambiente, el principal foco son las plantas de saneamiento de aguas residuales en donde se van acumulando ciertos compuestos que, actúan como un gran reservorio (Klein *et al.*, 2018); mientras que en el campo de la sanidad, se debe tener en cuenta el uso inadecuado de antibióticos y, por otra parte, la afluencia de personas debido a la migración nacional e internacional, la cual facilita la dispersión de agentes patógenos (Roca *et al.*, 2015; Tyson *et al.*, 2017).

1.2. ESTRATEGIAS.

Con el objetivo de reducir la dispersión y aparición de bacterias con genes de resistencia en la cadena alimentaria, se han propuesto una serie de estrategias en el sector ganadero y avícola: (a) prohibición del empleo de antimicrobianos como impulsores del crecimiento y limitación de su uso en otras aplicaciones como la profilaxis, (b) disminución de la entrada de microorganismos multirresistentes en la cadena alimentaria mediante el desarrollo de sistemas de bioseguridad en las granjas y la mejora de las prácticas higiénicas en la industria alimentaria, (c) mejora de planes educativos dirigidos a trabajadores del sector, y (d) unificación de los sistemas de vigilancia de resistencia a los antibióticos. Por otra parte, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha presentado una serie de sugerencias para detectar riesgos potenciales. Estas propuestas, se basan en la vinculación de los sistemas de monitoreo para identificar agentes antimicrobianos, reforzar la vigilancia de las resistencias a antibióticos, llevar a cabo planes de muestreo aleatorios en animales sanos y productos derivados, además de, acordar los valores epidemiológicos (Roca *et al.*, 2015).

A nivel nacional, la agencia española de medicamentos y productos sanitarios (AEMPS), ha elaborado un plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de aparición y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Para alcanzar el objetivo de dicho plan, se han propuesto seis líneas estratégicas correspondientes a las áreas prioritarias. La línea estratégica I, está basada en la vigilancia del consumo y de la resistencia a los antimicrobianos, para ello se deben implantar medidas recomendadas por la EFSA, como la monitorización del consumo de antibióticos, el control del uso de antibióticos críticos o la participación en los proyectos europeos e internacionales de vigilancia. La línea II pretende controlar las resistencias bacterianas mediante el diseño y difusión de herramientas para promocionar las buenas prácticas de uso de antimicrobianos. Las estrategias III y IV aspiran a identificar e impulsar medidas alternativas y/o complementarias de prevención y tratamiento, así como definir las prioridades para la investigación, ya que es necesario mejorar el conocimiento de los mecanismos de acción contra las bacterias, además de determinar las causas y consecuencias de la aparición y propagación de las resistencias. Por otro lado, las estrategias V y VI van dirigidas a informar y formar a los profesionales sanitarios, los cuales son los que deben poner en marcha el uso prudente de antibióticos, y a sensibilizar a la población mediante campañas (SENASA, 2010).

1.3. PROBLEMA ACTUAL.

En las últimas dos décadas, la tasa de consumo de antibióticos ha aumentado más de un 39%, este aumento ha sido favorecido por los países con medios y bajos ingresos donde se ha incrementado la economía. Los antimicrobianos que más preocupan por su excesivo uso son los carbapenems, las glicinas, las oxazolidinonas y las polimixinas. A nivel global, los antibióticos más consumidos son de la clase de cefalosporinas, quinolonas y macrólidos, haciendo especial hincapié en su incremento en países con bajos ingresos. La intensificación que se ha dado en estos países, se debe principalmente al consumo de cefalosporinas como sustitución de las penicilinas y quinolonas (con elevados niveles de resistencia), para realizar prácticas de preinscripción cambiantes en el caso de infecciones en el tracto respiratorio, en la piel o en tejidos blandos (Klein *et al.*, 2018).

Por otra parte, los antibióticos usados generalmente en las prácticas de animales en granjas, han favorecido el aumento de la resistencia de los patógenos, como es el caso de la resistencia a antimicrobianos como la tetraciclina, ácido nalidíxico o principalmente la ampicilina, más del 70% en China (Yassin *et al.*, 2017). En España el consumo de antibióticos ha aumentado aproximadamente un 15% desde el año 2000 hasta el 2015. Cabe destacar que según los niveles actuales de empleo de antimicrobianos, se calcula que el uso global de estos se elevará un 15% para el 2030 (Klein *et al.*, 2018).

Dado que, los antibióticos, en ocasiones, se emplean de forma innecesaria, se ha producido una disminución de su eficacia, lo cual representa un grave peligro para la salud, además de un aumento de los costes sanitarios a causa de largos periodos de hospitalización y del uso de medicamentos de último recurso para el tratamiento (SENASA, 2010). Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS), ha fijado una lista de agentes antimicrobianos esenciales para el tratamiento de los individuos. Dichos antibióticos, son críticos para la salud humana y su uso debe estar limitado a los

humanos mediante medidas restrictivas en los hospitales, para evitar resistencias cruzadas (Roca *et al.*, 2015).

El control de las preinscripciones de antibióticos y de la automedicación, es crucial para evitar un mayor aumento de las resistencias, puesto que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas parece haber llegado a un callejón sin salida. En países de bajos ingresos, además deben tener especial vigilancia por la falta de saneamiento y los medicamentos falsificados. Es por ello, que la realización de investigaciones se ha vuelto muy importante para determinar los métodos más efectivos, con el fin de implementar programas de administración desde el nivel local hasta el nacional, de forma que no se restrinjan los antimicrobianos a las personas más afectadas por enfermedades tratables (Klein *et al.*, 2018).

1.4. ANTIMICROBIANOS COMO PROMOTORES DEL CRECIMIENTO Y POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA RESISTENCIA DE CEPAS BACTERIANAS.

A mitad de la década de los 50, se empezaron a utilizar los antibióticos para favorecer el crecimiento de los animales en las granjas. Sin embargo, los mecanismos por los que los antimicrobianos promueven el crecimiento, aún no están determinados. Algunos estudios afirman que el crecimiento producido en los animales, es debido a la acción de los antibióticos contra patógenos y bacterias dañinas, ya que los agentes antimicrobianos pueden estar protegiendo a los nutrientes y facilitando su absorción al reducir el crecimiento de bacterias intestinales, minimizar la producción de toxinas por bacterias intestinales y disminuir la incidencia de enfermedades (Mund *et al.*, 2017).

A pesar de ello, los antimicrobianos también se absorben en el intestino de las aves después de su administración y son transportados por todo el cuerpo a través del plasma sanguíneo, lo cual supone un grave problema, porque los residuos de estos medicamentos se terminan acumulando en las partes comestibles de los animales tratados. Estos residuos están formados generalmente por compuestos primarios y/o derivados que incluyen metabolitos, conjugados y restos de macromoléculas (Mund *et al.*, 2017).

La ingesta de órganos o tejidos (carne, despojos, etc.) que contienen residuos de medicamentos por encima del límite máximo de residuos (Tabla 1) se asocia con diversos problemas para la salud.

De manera directa, los residuos pueden desencadenar una respuesta exagerada del sistema inmunológico del ser humano, denominada como reacción de hipersensibilidad o alergia, así como erupciones o dermatitis a nivel cutáneo. Indirectamente, pueden producir problemas carcinógenos, teratógenos y promover el aumento de la toxicidad a los medicamentos (Mund *et al.*, 2017).

Por otra parte, esta práctica favorece que las cepas de los microorganismos comensales del ser humano desarrollen resistencias a los antimicrobianos (Mund *et al.*, 2017).

TABLA 1. Límites máximos de residuos en productos de aves de corral según las autoridades legislativas.

Agentes antimicrobiales	Límite máximo de residuo ($\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$)	Producto de aves de corral	Autoridades legislativas
Sulfonamidas (Cloranfenicol)	0	Hígado, músculos	Unión Europea (UE)
β -Lactámicos	50	Riñón, hígado	FAO / OMS
Quinolonas	200	Hígado	Unión Europea (UE)
	100	Músculos	
	300	Riñones	
Aminoglucósidos (Gentamicina)	100-400	Huevos	Estados Unidos
	100		Holanda
	200		Alemania
	100-200		Francia
Tetraciclinas (Clortetraciclina, Oxitetraciclina, Doxiciclina)	100	Músculos, carne	Unión Europea (UE)
	100 / 300 (*)	Hígado	
	100 / 600 (*)	Riñón	
(*) Depende del tipo de tetraciclina se permite un límite u otro.			

Fuente: Mund *et al.*, 2017.

1.5. RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS.

La resistencia que ofrece una bacteria a un antibiótico puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es la que una bacteria obtiene de manera natural sin exposición previa a los antibióticos, es decir, es la resistencia propia de cada familia, especie o grupo bacteriano en ausencia de presión de selección antimicrobiana. Un claro ejemplo, es la resistencia que tienen los microorganismos Gram-negativos a la vancomicina (Vignoli y Seija, n.d.).

Los mecanismos en los que se fundamenta la resistencia intrínseca son la producción de enzimas que inactivan antibióticos, las bombas de expulsión, los cambios en la permeabilidad de la membrana externa y las alteraciones del sitio de acción (Tafur y Villegas, 2008).

- **Modificación enzimática del antibiótico:** las bacterias producen unas enzimas que pueden dar lugar a cambios en la estructura del antibiótico, produciendo la pérdida de funcionalidad de este. Un ejemplo de este caso, son las β -lactamasas, metilasas, acetil-transferasas y aminoglucósidos, entre otras (Tafur y Villegas, 2008).

- **Bombas de expulsión:** también denominadas de eflujo. Estas bombas se encuentran en la membrana externa de la célula. Su función principal es mantener bajos los niveles de sustancias tóxicas dentro de la célula, es por ello que pueden expulsar únicamente una molécula (sustrato específico) por medio de transportadores específicos o bien, pueden expulsar distintas clases de moléculas, es decir, puede expulsar tanto agentes antimicrobianos como aplicar su acción a todas aquellas

sustancias que representan una amenaza para el funcionamiento de la célula (amplio espectro) mediante el uso de transportadores de múltiples fármacos (Tafur y Villegas, 2008).

- **Permeabilidad de la membrana externa:** la membrana citoplasmática de las células actúa como una barrera separando el ambiente externo del citoplasma. Estas membranas regulan la entrada de moléculas al interior de la célula por lo que, cuando más flexibles son, mayor permeabilidad. Si por el contrario, disminuye la permeabilidad, también lo hace la fluidez, de esta forma se modifica su estructura y actividad. Con el fin de evitar la entrada de sustancias tóxicas, las bacterias Gram- negativas han creado una estructura externa que sirve como barrera permeable. Esta membrana externa está formada por porinas (proteínas), las cuales son canales que contienen agua y tienen la capacidad de diferenciar las moléculas por el tamaño. Su función es permitir el paso de nutrientes necesarios para la célula y evitar el paso a los antibióticos, para ello utilizan la limitación del tamaño, la hidrofobicidad y la repulsión por carga (Tafur y Villegas, 2008).

- **Alteración del sitio de acción:** se basa en el cambio de la estructura donde los antibióticos ejercen su acción, los sitios de acción se suelen encontrar en diferentes componentes bacterianos que involucran actividades vitales, como es el caso de los β -lactámicos que actúan sobre las proteínas que se unen a las penicilinas, produciendo así la lisis de la pared celular. Por lo tanto, si se da un cambio estructural, los β -lactámicos podrían perder afinidad por las proteínas unidoras de las penicilinas (Tafur y Villegas, 2008).

No obstante, la resistencia más importante desde el punto de vista de la salud pública es la resistencia antimicrobiana adquirida, la cual se define como aquella resistencia que se produce solamente en algunos microorganismos de un mismo género o especie bacteriana, debido a cambios en el genoma bacteriano (mutaciones) o por obtención de elementos genéticos externos como bacteriófagos, plásmidos, transposones o integrones, mediante transferencia horizontal de material genético por transducción, transformación o conjugación (Torreón, 2011).

- La **transducción** es un proceso mediante el cual se produce la transferencia de material genético desde un microorganismo donador a uno receptor mediante la acción de un bacteriófago, es decir, mediante una partícula vírica que se ha replicado en la bacteria donadora. Las limitaciones de la transducción son el tamaño de los bacteriófagos y la necesidad de que haya elementos receptores en la célula receptora, es por ello, que por este sistema solo se transite una pequeña cantidad de ADN (Schwarz *et al.*, 2017).
- La **transformación** es el método por el que una bacteria capta y expresa material genético que se encuentra libre de forma exógena a través de la membrana celular. Este método permite que algunos microorganismos no relacionados entre sí se transmitan ADN. Sin embargo, hay algunas bacterias que necesitan una serie de condiciones físicas o químicas para ser competentes (Schwarz *et al.*, 2017).

- La **conjugación** es el mecanismo más importante de intercambio de genes de resistencia entre bacterias, además, es el único proceso por medio del cual, se produce la transferencia del material genético desde una célula donadora a una receptora con contacto. Este contacto, requiere la intervención de estructuras superficiales especializadas, como son los pilis sexuales por los que se transfiere el ADN a través de plásmidos o transposones conjugativos (Schwarz *et al.*, 2017). Cabe destacar que la transferencia de un gen de resistencia será más eficaz, cuanto menor sea la diferencia genética entre las bacterias implicadas (Oromí, 2014).

En todos los mecanismos de resistencia adquirida, se produce la transferencia de material genético móvil, el cual se inserta en el ADN de una célula bacteriana. Los elementos genéticos móviles que transmiten las bacterias donadoras son los plásmidos, los transposones y los integrones.

Los **plásmidos** son fragmentos de ADN circular extra-cromosómico, autónomos que poseen la capacidad de replicarse de forma independiente del cromosoma. Están presentes en todo tipo de bacterias por lo que, su tamaño puede variar desde menos de 2 kb hasta más de 100 kb y tienen un papel clave en la adaptación y evolución bacteriana porque pueden ser portadores de genes de resistencia a antibióticos (plásmidos R), además de poder conferir elementos de virulencia (Schwarz *et al.*, 2017). Se pueden distinguir dos tipos de plásmidos, los plásmidos móviles, pero no conjugativos y los plásmidos conjugativos. Los primeros tienen la facultad de parasitar la estructura de un plásmido conjugativo y transferirse, mientras que los últimos son los más importantes en el proceso de diseminación de genes de resistencia, dado que tienen la información genética necesaria para iniciar por ellos mismos el proceso de conjugación (Francia *et al.*, 2004).

Los **transposones** se definen como elementos genéticos móviles que contienen varios pares de kilobases de ADN y que incluyen, además de los genes adicionales, la información genética necesaria para llevar a cabo su transposición (migración) desde un locus genético a otro. Los elementos genéticos transponibles siempre están integrados en plásmidos, en el cromosoma bacteriano o incluso en otros transposones. Generalmente, los transposones no requieren una elevada homología con el lugar de inserción del ADN, como consecuencia, se producen mutaciones en los sitios donde se insertan y, es por ello que son especialmente importantes en la diseminación de genes de resistencia entre las bacterias no relacionadas (Aleksun y Levy, 2007).

Actualmente, se han descrito diferentes tipos de transposones. Los elementos transponibles más sencillos son unas secuencias de inserción o elementos IS, estos consisten en segmentos cortos de ADN que tienen entre 750 y 1600 pb. Estas secuencias, únicamente contienen los genes necesarios para su propia transposición, es decir, contienen la información genética para codificar la enzima transposasa, la cual está implicada en la escisión e inserción de los elementos de transposición. Además, estos segmentos se caracterizan por contener repeticiones invertidas o IR, las cuales se encuentran flanqueando el elemento IS. Las secuencias invertidas son reconocidas por la transposasa antes de llevarse a cabo la transposición (Roberts *et al.*, 2008). Por otro lado, los transposones compuestos constan de una región central rodeada por dos

elementos de inserción (IS), la región central contiene la transposasa y un número variable de genes entre los cuales, se pueden encontrar genes de resistencia. En este caso, la transposasa actúa igual que en los elementos IS (Roberts *et al.*, 2008). El tercer tipo de elementos de transposición son los transposones conjugativos o elementos móviles de integración (ICEs), estos contienen genes accesorios como los genes de resistencia a antibióticos, sin embargo, su importancia se basa en que contiene los genes que codifican las enzimas encargadas de la escisión e integración de la secuencia genética (escisionasa e integrasa) (Burrus *et al.*, 2002; Hinerfeld y Churchward, 2001; Roberts *et al.*, 2008).

Hay dos mecanismos por los cuales se lleva a cabo la transposición, el primero es la transposición conservativa, en la cual el transposón pasa de una bacteria donadora a una receptora sin pérdida de enlaces ni aumento del número de copias, es decir, el transposón pasa de un sitio a otro sin replicarse y sale de la célula donadora que queda vacía en esa posición para integrarse en una nueva posición en el interior de la célula receptora. Por otro lado, la transposición replicativa, que se basa en el aumento del número de copias del transposón mediante un proceso de replicación y recombinación específica, en el cual interviene la enzima resolvasa, la copia del transposón sale desde la bacteria donadora y se integra en la bacteria receptora en una nueva posición mientras que, el transposón permanece en la célula donadora (Hickman y Dyda, 2015).

Los **integrones** son elementos genéticos de longitud variable que están compuestos por tres secuencias necesarias para la inserción y expresión de genes exógenos. El primer fragmento codifica para una enzima integrasa en su extremo 5' (intl), en la otra secuencia, se encuentran los genes móviles que ofrecen resistencia a los antimicrobianos denominados casetes y, por último, hay una secuencia específica (attI) reconocida por la integrasa, a la que se unen los genes en casetes (Mosquito *et al.*, 2011). Dentro del segmento intl, en su extremo 3', hay una secuencia promotora (Pc) a partir de la cual se transcriben los casetes integrados (Sabaté y Prats, 2013). La inclusión de los genes exógenos de resistencia en los integrones, se da por un mecanismo de recombinación específico de sitio. El lugar de recombinación específico del integrón está formado por 65 pb. Los genes casete pueden encontrarse en este sitio como moléculas de ADN no replicativas circulares o como secuencias lineales, su estructura se basa en un gen y una secuencia de recombinación específica de sitio en el extremo 3' de dicho gen, la cual se denomina como elemento de 59 bases. Los genes casete son movilizados por la integrasa, la cual, reconoce el lugar attC del gen casete y el lugar attI del integrón receptor (Sabaté y Prats, 2013).

Los integrones no poseen la información genética necesaria para codificar su traslado de unas bacterias a otras, es por ello, que a menudo se encuentran asociados con estructuras que les sirven como vehículo para su transmisión como es el caso de los transposones y/o los plásmidos conjugativos (Sabaté y Prats, 2013).

La clasificación de los integrones, se ha realizado en función de la secuencia de la integrasa. En los microorganismos Gram-negativos sólo se han identificado tres tipos: integrones de clase 1, de clase 2 y de clase 3 (Sabaté y Prats, 2013). Los integrones de clase 1 están ampliamente distribuidos y por tanto, son los de mayor relevancia porque se suelen encontrar en cepas aisladas. Estos son reconocidos porque su estructura

mantiene la secuencia 5', la cual contiene el gen que codifica la integrasa, asimismo, la mayoría de ellos conservan la secuencia 3' (Sabaté y Prats, 2013). Los de la clase 2 también mantienen el segmento 5' en el cual se encuentra el gen *int2* que codifica la integrasa, sin embargo, la capacidad de recombinación de esta clase está reducida debido a que el gen de la integrasa contiene una mutación en el codón 179 que provoca que la proteína no sea funcional. Por último, los integrones de clase 3 suelen ir asociados a transposones conjugativos y son poco frecuentes (Mosquito *et al.*, 2011; Sabaté y Prats, 2013).

1.6. *Escherichia coli* Y SU IMPORTANCIA EN LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

En este estudio se va a analizar la resistencia de *Escherichia coli* en productos avícolas destinados al consumo humano, los cuales constituyen uno de los reservorios más importantes de esta bacteria junto con productos vacunos y porcinos (Yassin *et al.*, 2017).

E. coli es una bacteria Gram-negativa y anaerobia facultativa que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, forma parte de la microbiota intestinal de seres humanos y animales, localizándose en la mucosa del colón. Además, se puede encontrar en el medio ambiente. No obstante, *E. coli* también puede ser un patógeno que actúa provocando alteraciones intestinales, extra-intestinales o causando otras afecciones como patógeno oportunista. Este microorganismo es considerado como un excelente indicador de resistencia, porque posee una gran capacidad de adquisición y transmisión de elementos genéticos que favorecen dicha resistencia debido a diversas razones: (a) habita en el tracto gastrointestinal y, (b) está expuesto directamente a los antibióticos, ya que muchos tratamientos se realizan por vía oral (Yassin *et al.*, 2017).

Los principales elementos genéticos de resistencia que se han observado a partir de cepas aisladas de *E. coli* en estudios previos han sido los plásmidos, los transposones conjugativos y los integrones. Se han descrito plásmidos portadores de genes de resistencia frente a antimicrobianos como las tetraciclinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, β -lactámicos y sulfonamidas entre otros (Cantón, 2009; Hong *et al.*, 2014). Por otra parte, el transposón conjugativo Tn916 de 18 kb se detectó en un amplio rango de bacterias, dentro del cual se encontraba *E. coli* (Clewell *et al.*, 1995). Cabe señalar, que los transposones también pueden ser la vía para el intercambio de genes entre bacterias comensales de la microbiota como *E. coli* y patógenos que se transmiten de forma temporal al intestino (Doucet-Populaire *et al.*, 1991). Por último destacar que, en el estudio de Mosquito *et al.*, (2011) se observaron cepas multirresistentes de *E. coli* comensales con integrones de clase 1.

Los elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones e integrones) constituyen el mayor vector de multirresistencia en bacterias Gram-negativas. Actualmente, se ha llegado a una situación en la que no se pueden comercializar antimicrobianos capaces de hacer frente completamente a las bacterias que proliferan en la industria avícola (Oromí, 2014), en la Tabla 2 se pueden observar los principales mecanismos de resistencia de *E. coli* frente a las familias de antibióticos empleadas en este sector.

1.7. *E. coli* COMENSAL COMO INDICADOR DE LA RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.

Como bien se ha comentado anteriormente, *E. coli* es una bacteria que tiene gran capacidad de adquisición de elementos genéticos debido a su favorable situación. Dicha situación, se potenció hace décadas cuando en los sectores de cría de animales para el consumo humano, se empezaron a utilizar distintas técnicas para aumentar la producción mediante el empleo de antibióticos en dosis no reguladas, favoreciendo así, el incremento de resistencias por parte de las bacterias (Mcewen y Fedorka-cray, 2002). Con el paso del tiempo, tanto las bacterias como los elementos genéticos móviles de resistencia, se han ido diseminando a través de los animales y del ambiente, de tal manera que, se han encontrado cepas de bacterias resistentes a los antimicrobianos en el agua utilizada para el riego de productos que se consumen en fresco, como es el caso de cepas de *E. coli* que producen β -lactamasas de espectro extendido (Gekenidis *et al.*, 2018).

Con esta información se puede afirmar, que es necesaria la implantación de un programa de monitoreo de los productos frescos y productos crudos procedentes de animales sacrificados, tanto para microorganismos patógenos como para bacterias comensales, las cuales suponen un gran reservorio de genes de resistencia que pueden transferirse de manera horizontal. Es por ello, que en el año 2000 en Estados Unidos, se agregó como microorganismo indicador del sistema de monitoreo a *E. coli* (Mcewen y Fedorka-cray, 2002).

A nivel europeo, el problema viene dado cuando se intenta contrastar la información de distintos países, ya que cada país ha establecido su propio programa de monitoreo basado en distintas pautas (Mcewen y Fedorka-cray, 2002). Para evitarlo, la EFSA ha propuesto una lista con los indicadores (bacterias), que se deben analizar, dichos indicadores han de ser revisados cada cinco años para comprobar que son útiles, *E. coli* forma parte de este grupo por su tasa de prevalencia (Scienti, 2017).

Para monitorear las resistencias antimicrobianas en animales productores de alimentos, la EFSA propone analizar la susceptibilidad total de *E. coli* a un panel predefinido de antimicrobianos, cuantificar los patrones de resistencia mediante la detección de la resistencia de esta bacteria frente a tres o más clases de antimicrobianos y caracterizar mejor la resistencia de este microorganismo frente a las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino (Scienti, 2017). Además, se pretende determinar el número de muestras, respecto del total, que contienen productos de β -lactamasas de espectro extendido con AmpC, dado que las cepas de *E. coli* que tienen en su genoma estos productos, muestran resistencias a una gran variedad de antibióticos (Scienti, 2017) por lo que se reducen la posibilidades de un tratamiento efectivo (Gekenidis *et al.*, 2018).

Por otro lado, en las industrias cárnicas, sobre todo en aquellas plantas especializadas en el procesamiento de carne y sacrificio, se han implantado programas de APPCC, entre los cuales se incluyen pruebas genéricas de *E. coli* que sirven para verificar el buen estado del producto (Mcewen y Fedorka-cray, 2002).

TABLA 2. Mecanismos de resistencias de las principales familias de antimicrobianos utilizados en la industria avícola.

Familia de antibióticos	Antimicrobianos	Mecanismo de acción	Mecanismos de resistencia	Genes implicados.
Betalactámicos	Amoxicilina, penicilina, cefalosporinas, ampicilina y carbapenems	Interfiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana	Betalactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico	Genes que codifican betalactamasas: bla _{TEM} , bla _{SHV} , bla _{CARB} , bla _{OXA} , bla _{CTX-M} y bla _{GES} .
Quinolonas	Ácido nalidíxico, ácido oxolínico, norfloxacin y ciprofloxacino	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la ADN girasa bacterianas	Mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico	Mutaciones a nivel de gyrA (gen que codifica una subunidad de la ADN girasa) y parC (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV).
			Sistemas de expulsión	AcrAB-like (sistemas presente en diferentes enterobacterias)
			Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica	Familia de genes qnr (A, B, C, D S) que codifican proteínas Qnr que impiden estericamente la unión del antibiótico al blanco./ Gen que codifica la variante cr de la acetiltransferasa 6' (AAC (6')-Ib-cr), capaz de acetilar fluoroquinolonas
Tetraciclinas	Tetraciclinas, clortetraciclina y tigeciclina	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas	Genes tet (A) y tet (B) que codifican sistemas de eflujo
Fenicoles	Cloranfenicol	Inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S	Inactivación enzimática por acetilación	Gen cat que codifica a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa
			Exportadores específicos de cloranfenicol	Genes floR y cmlA
Aminoglucósidos	Neomicina, kanamicina y gentamicina.	Inhibición irreversible de la síntesis proteica	Alteración del sitio blanco. Por mutación de los genes de proteínas ribosomales o del ARN 16S	Mutaciones debido a un plásmido que se ubica en los genes que codifican para EMA./ Genes de resistencia presentes en cassettes genéticos asociados a integrones.
			Reducida acumulación intracelular del compuesto debido a la impermeabilidad de la membrana externa causada por cambios en las proteínas de membrana externa	
			Inactivación de los compuestos por enzimas que catalizan la modificación de aminoglucósidos.	

Fuente: (Mella M. *et al.*, 2004; Mosquito *et al.*, 2011).

2. OBJETIVOS

Las resistencias antimicrobianas que han obtenido diversos microorganismos constituyen en la actualidad un grave problema en la cadena alimentaria, poniendo en riesgo la seguridad de los productos destinados al consumo humano.

Las autoridades europeas de seguridad alimentaria (EFSA) y de prevención y control de enfermedades (ECDC), advierten del peligro de la transmisión transversal entre las distintas bacterias comensales que encontramos en los alimentos, de las resistencias a antimicrobianos. Por ello han designado el estudio de *E. coli* como indicador del nivel de resistencias que se encuentra en el ambiente alimentario.

En vista de esta situación, el objetivo principal de este estudio es detectar cepas multiresistentes de *E. coli*, en productos avícolas de nuestros mercados. Para poder alcanzar dicho objetivo general, se abordarán los siguientes objetivos específicos:

- a) Aislamiento y recuento de coliformes y *E. coli* a partir de 30 muestras cárnicas de pollos.
- b) Estudiar y analizar las resistencias fenotípicas de cepas de *E. coli* aisladas frente a 8 antimicrobianos distintos de interés clínico.
- c) Detectar y examinar la presencia de los principales genes de resistencias mediante análisis de PCR de las cepas de *E. coli* obtenidas en las 30 muestras.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO, AISLAMIENTO Y RECuento DE LOS MICROORGANISMOS.

En el presente estudio se ha analizado 30 muestras procedentes de productos avícolas (hígados, mollejas y carcasas) que fueron compradas entre septiembre y diciembre de 2018 en 13 comercios distintos situados en Valencia (España). Las muestras estaban congeladas, por lo que, se descongelaron y se mantuvieron a temperatura ambiente en el momento de realizar el análisis. Los detalles de las 30 muestras analizadas están disponibles en el anexo 1 del presente documento.

Las muestras se cortaron en un ambiente aséptico, en donde se recogieron 10 gramos de distintas partes de la misma muestra, para proceder a su estudio de forma representativa. A continuación, se introdujeron en una bolsa stomacher a la que se adicionaron 90 mL de agua de peptona tamponada (Scharlau, España). Las bolsas se depositaron en un homogenizador de paletas durante 3 minutos.

Para realizar el recuento de microorganismos, en cada muestra se redujo la concentración de unidades formadoras de colonias mediante una dilución seriada hasta la concentración de 10^{-3} . Partiendo de la bolsa stomacher (10^{-1}), se cogió 1 mL y se introdujo en un tubo con 9 mL de agua estéril, obteniendo así la dilución de 10^{-2} , de la misma forma a partir de esta dilución se obtuvo la siguiente (10^{-3}). Por otra parte, de cada dilución se cogieron 0,1 mL y se depositaron en una placa con medio Microinstant® Chromogenic Coliforms Agar Base (Scharlau, España), seguidamente se empleó una asa de Digralsky para extender el inóculo en toda la superficie del agar. Finalmente, las placas de cada muestra fueron incubadas a 37°C durante 24 horas.

Las colonias que después de la incubación, resultaron ser azul-violetas en el medio cromogénico de coliformes, fueron resembradas en PCA (Scharlau, España) mediante una triple estría y se incubaron a 37°C durante 24 horas, con el fin de obtener cepas aisladas.

Asimismo, estas colonias fueron empleadas para efectuar el recuento de UFC por medio de la aplicación de la ecuación 1. Para que dicho recuento sea válido, se considera necesario que la placa utilizada contenga más de 15 colonias y menos de 150 colonias características, además, debe contener menos de 300 colonias características y no características. Si por el contrario, la placa contiene menos de 15 colonias características, se considerará que el total de UFC es menor de $1,5 \times 10^3$ UFC/g, de igual modo, si la placa contiene un número mayor a 150 colonias, se aceptará que el valor de UFC es superior a $1,5 \times 10^6$ UFC/g, en la Figura 1 se puede observar un ejemplo de recuento de más de 150 colonias características.

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

Donde: $\sum a$, es la suma de las UFC contadas en todas las placas retenidas de dos diluciones sucesivas; n_1 , es el número de placas utilizadas para el recuento de la primera dilución; n_2 , es el número de placas que se cuentan para la segunda dilución; V , es el

volumen del inóculo (en mL) aplicado a cada placa y d, es el factor de dilución correspondiente a la primera dilución utilizada para el recuento.

Por último, las cepas que fueron aisladas se congelaron en crioviales (Pro-lab Diagnostics Microbank™, Canadá) para futuros ensayos.

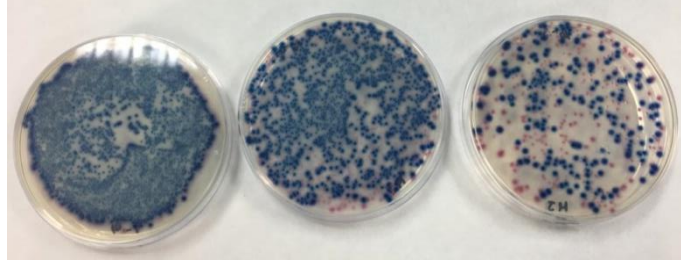


FIGURA 1. Ejemplo de recuento de coliformes a partir de una muestra de hígado.

3.2. TEST DE SENSIBILIDAD FENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS.

Para estudiar el grado de sensibilidad fenotípica a los antimicrobianos se analizaron 114 cepas aisladas de *E. coli* mediante el método de Kirby-Bauer o de agar-difusión en Mueller-Hinton (CLSI 2015).

Esta técnica se basa en la elaboración de antibiogramas, gracias al empleo de discos que contienen una concentración de antibiótico predeterminada, lo cual permite una adecuación bastante precisa con la concentración mínima inhibitoria que dicho antibiótico alcanza.

En este estudio, se emplearon ocho antimicrobianos probados para las cepas de *E. coli* (Oxoid, Reino Unido), estos fueron: Ácido nalidíxico (30 µg), Ampicilina (10 µg), Cefotaxima (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Cloranfenicol (30 µg), Gentamicina (10 µg) y Tetraciclina (30 µg) según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2015).

El análisis consiste en coger cada una de colonias aisladas con un asa de siembra y llevarlas a una solución de suero fisiológico estéril equivalente al tubo de 0,5 de la escala McFarland. Una vez se ha realizado la comparación, agitando previamente la suspensión del microorganismo, se sumerge un aplicador de algodón estéril y se rota contra las paredes del tubo para remover el exceso de inóculo. Seguidamente, se siembra el inóculo en tres direcciones para obtener uniformidad sobre toda la placa que contiene agar Mueller-Hinton. A continuación, se colocan los discos sobre la superficie del agar con un dispensador y finalmente, se incuban las placas en pilas de cinco a 37°C durante 16 horas.

Para un correcto uso de los discos, estos deben mantenerse refrigerados a 4-5°C y deben tener una temperatura ambiente en el momento de su utilización, de igual modo, los dispensadores que se usan para la prueba de susceptibilidad, deben almacenarse con un desecante en el refrigerador pero cuando se vayan a usar deben alcanzar la temperatura ambiente.

Con el fin de obtener el valor de los halos de inhibición, los diámetros de las zonas de inhibición de cada disco fueron medidos con una regla contra una superficie oscura bajo una luz reflejada. Cabe destacar que, en dicha medida se incluyeron los 6 mm correspondientes al disco y que por tanto, una lectura de 6 mm indica que no hay zona de inhibición. Por otra parte, la interpretación de los resultados se realizó siguiendo los límites recomendados por el CLSI. Las cepas se clasificaron como sensibles o resistentes, asimismo, aquellas cepas que mostraron una sensibilidad intermedia fueron consideradas como sensibles.

En el siguiente apartado referente a Resultados y Discusión, se utilizará la terminología definida por Knezevic y Petrovic (2008), con la que se definirán 5 ratios teniendo en cuenta el porcentaje de colonias resistentes para cada antibiótico: ratio de resistencia muy elevada (< 75% de colonias resistentes), ratio de resistencia elevada (50-75%), ratio de resistencia moderada (30-50%), ratio de resistencia baja (10-30%) y ratio de resistencia muy baja (0-10%).

Además, las cepas que presentaron resistencia a nivel fenotípico en tres o más familias de antimicrobianos, se designaron como multirresistentes.

3.3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA GENOTÍPICA A ANTIMICROBIANOS.

3.3.1. Extracción del ADN.

Teniendo en cuenta las distintas agrupaciones de resistencia fenotípica de las cepas, se seleccionaron las cepas para el estudio genético. La extracción de ADN para *E. coli* se realizó por el método de lisis por choque térmico.

Para llevarlo a cabo, se resuspendió 3-5 colonias en 150 µl de tampón TE 1X, a continuación, se homogenizaron todos los eppendorf en el vórtex y se depositaron en un termobloque a 95°C durante 10 minutos. Después, se dejaron enfriar los eppendorf durante 2 minutos en hielo y posteriormente, se centrifugaron durante 8 minutos a 13.000 rpm. Por último, el sobrenadante fue transferido a tubos eppendorf estériles e irradiados con la precaución de no transferir nada de pellet.

3.3.2. Detección de genes de resistencia.

Para la detección de genes de resistencia en cepas de *E. coli* se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa a fin de obtener una infinidad de copias de una determinada región del ADN, en este caso se estudió la presencia de 5 genes en cepas aisladas.

El procedimiento consistió en realizar dos PCR múltiples distintas, en la primera de ellas, se estudió la presencia de genes de resistencia frente a antibióticos de la familia de las tetraciclinas, para ello, se estudió la presencia de los genes tet (A) y tet (B).

Las concentraciones empleadas de los reactivos para el mix fueron 1X de NH₄ solución tampón, 2,5 mM de MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 1,25 U de taq-polimerasa y para los primers, se utilizó 0,1 µM de los primers de tet (A) y 0,2 µM de los de tet (B). Finalmente, se adicionó 2,5 µL de ADN y se completó con agua MiliQ estéril hasta el volumen final.

Las condiciones empleadas para dicha PCR fueron un ciclo inicial a 94°C durante 15 minutos; seguido de 30 ciclos basados en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 63°C y un minuto a 72°C; la PCR se concluyó con un ciclo de extensión a 72°C durante 10 minutos.

La segunda PCR múltiple se llevó a cabo para analizar la presencia de genes de resistencia a la familia de las penicilinas. Las concentraciones utilizadas de los reactivos para el mix fueron 1X de NH₄ solución tampón, 2,5 mM de MgCl₂, 200mM de cada dNTP y 1,25 U de taq-polimerasa, también se adicionó 0,4 μM de cada uno de los primers de bla_{SHV} y 0,2 μM de los primers bla_{TEM} y bla_{CMY-2}. Por último, se añadió 3,5 μL de ADN y se completó con agua MiliQ estéril hasta el volumen final.

Por lo que respecta a las condiciones de la PCR, se realizó un ciclo inicial a 94°C durante 15 minutos; se continuó con 30 ciclos consistentes en 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C y 1 minuto a 72°C; seguido de un ciclo final a 72°C durante 10 minutos.

Cabe destacar que, el volumen final obtenido en ambas PCR para la detección de todos los genes de resistencia fue de 25 μL.

Además, en cada PCR se incluyó un control positivo, el cual debía contener todos genes de resistencia al antimicrobiano estudiados y un control negativo, el cual se obtuvo sustituyendo el ADN por agua MiliQ estéril.

Las secuencias de los primers empleados se obtuvieron de TIB MOLBIOL, Alemania, el ADN empleado en cada PCR y el tamaño del amplicón a detectar se puede observar en la Tabla 3 junto a las referencias consultadas. Por otra parte, las reacciones se llevaron a cabo en en Termociclador modelo Mastercycler Pro (Eppendorf Ibérica, España) y PTC-100 Peltier Thermal Cycler.

3.3.3. Visualización del ADN.

Con el fin de visualizar el ADN de los productos obtenidos en cada PCR, se realizaron electroforesis en gel, en la que se separó los fragmentos de ADN por tamaño. Para llevarla a cabo, se preparó un gel de agarosa 1,2% (Conda, España) con solución TAE 1X.

Seguidamente, se cargaron los productos de la PCR junto con el tampón de carga 6X y se adicionó un marcador de 100pb (Fisher Scientific, EE.UU.). Finalmente, se ajustó el voltaje a 100 y se dejó correr durante 60 minutos, de esta manera se consiguió una correcta separación de los fragmentos más cortos del ADN (extremo positivo) y los fragmentos más largos (extremo negativo).

Pasado el tiempo, el gel se visualizó con luz ultravioleta con la ayuda de un transiluminador (Viber Lourmat, Francia).

TABLA 3. Genes de resistencias asociados a las familias de antibióticos, secuencia de los cebadores, tamaño de amplicón, cepas analizadas y referencias.

Familia de antimicrobianos	Gen	Cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	ADN utilizado	Referencia
Tetraciclinas	tet (A)	5'-GGCGGTCTTCTTCATCATGC-3'	502	<i>E. coli</i>	Kozak <i>et al.</i> , (2009)
		5'-CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA-3'			
	tet (B)	5'-CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC-3'	173	<i>E. coli</i>	Kozak <i>et al.</i> , (2009)
		5'-CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG-3'			
β- Lactámicos	bla _{TEM}	5'-TTAACTGGCGAACTACTTAC -3'	247	<i>E. coli</i>	Kozak <i>et al.</i> , (2009)
		5'-GTCTATTTTCGTTTCATCCATA -3'			
	bla _{SHV}	5'-AGGATTGACTGCCTTTTTG -3'	393	<i>E. coli</i>	Kozak <i>et al.</i> , (2009)
		5'-ATTTGCTGATTTGCTCG -3'			
	bla _{CMY-2}	5'-GACAGCCTCTTTCTCCACA-3'	1000	<i>E. coli</i>	Kozak <i>et al.</i> , (2009)
		5'-TGGACACGAAGGCTACGTA-3'			

4. RESULTADOS

Este estudio analizó la posibilidad de contaminación de la carne procedente del sector avícola con *E. coli* en comercios de la cadena minorista.

4.1. RECUENTO DE MICROORGANISMOS.

Para la obtención de cepas aisladas de *E. coli*, se analizaron 30 muestras procedentes de distintas partes del pollo, como son hígados, carcasas y mollejas. El recuento de coliformes y *E. coli* obtenido en cada muestra se muestra en la Tabla 4, además en dicha tabla, se especifican los comercios minoristas en donde se ha adquirido la muestra y el tipo de muestra.

TABLA 4. Recuento y detección de microorganismos en muestras cárnicas del sector avícola.

Número de muestra	Tipo de muestra	Comercio	Coliformes (UFC/ g)	<i>E. coli</i> (UFC/g)	Presencia <i>E. coli</i>
1	Hígado	1	1,8x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
2	Hígado	2	6,7x10 ⁴	<1,5x10 ³	SI
3	Hígado	3	7x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
4	Molleja	3	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
5	Hígado	4	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
6	Hígado	5	>1,5x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
7	Carcasa	6	>1,5x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
8	Carcasa	7	1,7x10 ⁵	<1,5x10 ³	SI
9	Hígado	7	>1,5x10 ⁶	<1,5x10 ³	NO
10	Hígado	6	2,5x10 ⁶	1,5x10 ⁴	SI
11	Carcasa	8	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	NO
12	Hígado	9	>1,5x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
13	Carcasa	9	3,4x10 ⁴	1,8x10 ⁴	SI
14	Hígado	6	1,5x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
15	Hígado	10	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	NO
16	Hígado	13	5,8x10 ⁵	<1,5x10 ³	SI
17	Molleja	13	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	NO
18	Carcasa	3	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	NO
19	Carcasa	1	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
20	Carcasa	4	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
21	Carcasa	10	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
22	Carcasa	11	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
23	Carcasa	4	6,6x10 ⁴	6,3x10 ⁴	SI
24	Carcasa	2	3,4x10 ⁵	<1,5x10 ³	SI
25	Hígado	12	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI
26	Hígado	13	7x10 ⁶	<1,5x10 ³	SI
27	Hígado	11	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	NO
28	Molleja	13	1,9x10 ⁴	<1,5x10 ³	SI
29	Molleja	4	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	NO
30	Carcasa	13	<1,5x10 ³	<1,5x10 ³	SI

Los comercios 1,2,3,4,6,9 y 13, pertenecen a una conocida cadena de distribución de carne, por lo que su numeración es distinta para hacer referencia a cada una de las tiendas físicas en donde se han comprado las muestras. Por otro lado los comercios 5, 7, 8, 10, 11 y 12, representan tiendas minoristas que distribuyen productos cárnicos en el Mercado Central de Valencia.

Se han detectado cepas de *E. coli* en 23 de las 30 muestras analizadas, lo que representa un 76,67%. De las muestras que contienen *E. coli*, 20 de ellas presentan un recuento de menos $1,5 \times 10^3$ UFC/g, mientras que las otras 3, muestran un recuento heterogéneo que varía de $1,5 \times 10^4$, $1,8 \times 10^4$ y $6,3 \times 10^4$ UFC/g. Con respecto al tipo de comercio, se observan algunas distinciones, ya que en casi todas las tiendas minoristas (7, 8, 10, 11), en las cuales las muestras han sido manipuladas por los carniceros, no se detecta la presencia de estos microorganismos o hay menos de $1,5 \times 10^3$ UFC/g. Por otro lado, en los comercios 3, 4 y 13 de la cadena de distribución, donde los productos se sirven en bandejas, tampoco se ha detectado *E. coli* o su valor de UFC/g ha sido muy bajo. A pesar de las diferencias, este criterio de clasificación no esclarece el motivo por el cual pueden darse las variaciones. Sin embargo, si se tiene en cuenta el tipo de muestra, se puede observar una cierta tendencia, puesto que, de las 12 muestras analizadas de carcasa, 10 presentaban *E. coli*, lo que representa un 83,33%, este valor es menor para el caso del hígado (78,57%) y sigue disminuyendo en el caso de la molleja (50%).

4.2. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA FENOTÍPICA.

4.2.1. Tasas de resistencia a antibióticos.

Se obtuvieron un total de 114 aislamientos de *E. coli* a partir de las 30 muestras analizadas. Siguiendo con el objetivo de este estudio, se identificaron los perfiles de resistencia de dichas cepas de *E. coli* mediante análisis fenotípico por el método de Kirby-Bauer con 8 antimicrobianos procedentes de distintas familias como se puede observar en la Figura 2.

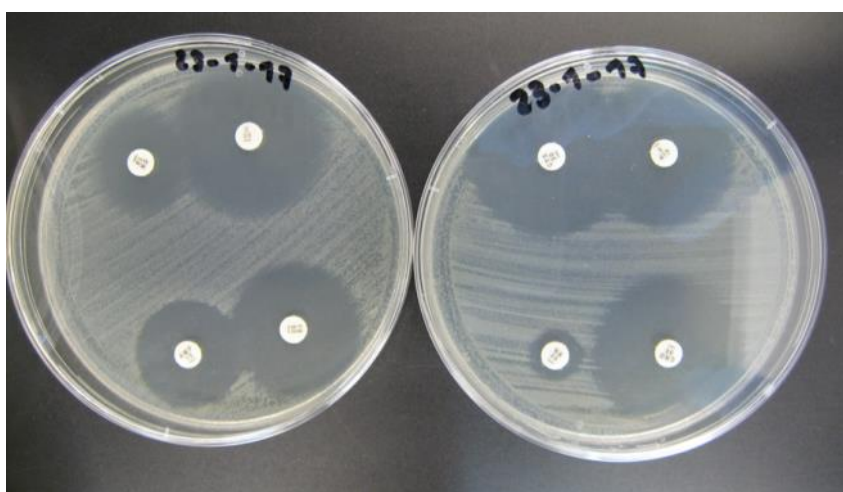


FIGURA 2. Halos de resistencia-sensibilidad de la cepa aislada 23-1-17 de *E. coli* frente a los 8 antimicrobianos seleccionados.

Los resultados obtenidos se muestran en los anexos 2 y 3 del presente documento. A modo de resumen, se dispone de la Tabla 5, en dónde se indica el número de cepas aisladas resistentes a cada antibiótico con su respectivo porcentaje.

TABLA 5. Resistencia fenotípica de *E. coli* a los antibióticos testados.

ANTIBIÓTICOS	<i>E. coli</i> (N=114)	%	Ratios de resistencia (Knezevic y Petrovic (2008))
Ácido nalidíxico	83	72,81	Resistencia elevada
Ampicilina	42	36,84	Resistencia moderada
Cefotaxima	1	0,88	Resistencia muy baja
Ceftriaxona	1	0,88	Resistencia muy baja
Ciprofloxacino	12	10,53	Resistencia baja
Cloranfenicol	4	3,51	Resistencia muy baja
Gentamicina	9	7,89	Resistencia muy baja
Tetraciclina	47	41,23	Resistencia moderada

De todas las cepas aisladas, más de un 82% mostraron resistencia frente al menos un antimicrobiano. Por el contrario, no se detectaron cepas resistentes a los 8 antibióticos probados. Los antimicrobianos con mayor grado de resistencia son el ácido nalidíxico y la tetraciclina con un 72,81% y un 41,23%, respectivamente.

Por lo que respecta al ácido nalidíxico, pertenece al grupo de las quinolonas, concretamente a las quinolonas de primera generación, las cuales tienen un espectro de acción limitado a algunos organismos Gram-negativos. Su uso en el sector avícola se ha basado en el tratamiento de infecciones de la piel u otros tejidos, asimismo se ha utilizado para tratar la gastroenteritis. Su tasa de resistencia obtenida es elevada comparada con la que se ha observado en otros países para el mismo antimicrobiano, en Túnez, Nigeria, Islandia y Alemania se obtuvo un ratio de resistencia de 54,4%, 25%, 18,2% y 60%, respectivamente (Abbassi *et al.*, 2017; Paridah *et al.*, 2016; Roth *et al.*, 2019; Thorsteinsdottir *et al.*, 2010). Mientras que, en China y en estudios previos realizados en España, la tasa obtenida es más del 75%, alcanzando el 88% en España el 2014, lo cual es similar al valor presentado en este trabajo, esto se debe a la extensa utilización en China de este fármaco para prácticas veterinarias (Yassin *et al.*, 2017) y al uso permitido de este medicamento en el caso de España (Roth *et al.*, 2019). Por el contrario, según el estudio de Millman *et al.*, (2013), en Estados Unidos solo un 3,3% de las cepas ofrecieron resistencia al ácido nalidíxico.

De la misma manera, ciertas cepas de *E. coli* han desarrollado resistencia a los derivados fluorados de las quinolonas (fluoroquinolonas), como es el caso del ciprofloxacino, este es un antibiótico de segunda generación empleado para los mismos usos que el ácido nalidíxico. Si se comparan ambas prevalencias, el ciprofloxacino tiene bajo porcentaje de resistencia (10,53%), esta tendencia que también se observa en Túnez (Abbassi *et al.*, 2017) y en Estados Unidos (Millman *et al.*, 2013), podría estar relacionada con que este medicamento se comenzó a utilizar en la década de los 80, es decir, se empleó varios años más tarde que el ácido nalidíxico (Gouvêa *et al.*, 2015). Sin embargo, en otros países como India o Nigeria, la resistencia del ciprofloxacino alcanza tasas de entre 42-70% y sigue en aumento (Hussain *et al.*, 2017; Paridah *et al.*, 2016),

a causa del incremento de la economía, el cual ha favorecido el consumo de antibióticos en estos países (Klein *et al.*, 2018). Asimismo, en algunos países desarrollados la resistencia al ciprofloxacino ha ido en aumento en los últimos años, como se ha podido demostrar en estudios anteriores realizados en España, en los cuales, los datos de monitoreo mostraron que el porcentaje de cepas resistentes al ciprofloxacino aumentó de un 17% en el 2001 al 91% en 2016 (Roth *et al.*, 2019).

Por otra parte, la tetraciclina y la ampicilina, presentan un ratio de resistencia moderado. Las tetraciclinas son utilizadas para el tratamiento de onfalitis aviar, infecciones respiratorias y como factor de crecimiento en aves de consumo. Estas ya no se suelen usar como tratamiento en humanos pero, se han podido aislar genes de resistencia en ciertas bacterias de la flora intestinal (Mosquito *et al.*, 2011), esta situación puede deberse a la deposición de este medicamento en los músculos de las aves (Mund *et al.*, 2017). En países como India, China o Brasil la tasa de resistencia de la tetraciclina es muy elevada, alcanzando el 84%, el 94% y el 95,4%, respectivamente (Bezerra *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2011), por otro lado en Túnez la tasa es elevada, 74,7% (Abbassi *et al.*, 2017). No obstante, si se compara esta cifra en otros estudios se puede encontrar alguna discrepancia, ya que en el estudio de Paridah *et al.*, (2016), la resistencia de este fármaco es del 81%, mientras que en países europeos se observa mayor variabilidad. En Noruega el valor de prevalencia se estima que es bajo, del 27,7% (Kaspersen *et al.*, 2018) pero en Polonia, Alemania o Francia este valor está entre el 40-60% (Roth *et al.*, 2019; Wasyl *et al.*, 2013). En el caso del presente ensayo, se ha calculado que el ratio de resistencia que han adquirido las cepas aisladas ha sido moderado, del 41,23%.

La ampicilina, es un beta-lactámico de amplio espectro que actúa contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, su empleo está indicado para el tratamiento de enteritis e infecciones en las vías respiratorias en el caso de aves de corral. En referencia a su tasa de resistencia, esta es distinta en los países en vías de desarrollo, en el caso de China y Brasil es muy elevada (99,5% y 87,3%, respectivamente) (Bezerra *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2011), por contra en países como Túnez y Nigeria es moderada, (57% y 36%, respectivamente) (Abbassi *et al.*, 2017; Paridah *et al.*, 2016). En este estudio, las cepas mostraron una resistencia moderada del 36,84%, lo cual se aproxima más a los valores obtenidos en Nigeria, Noruega cuya tasa es de 21,5% (Kaspersen *et al.*, 2018) o en el estudio realizado en 2001 en España por Saenz *et al.*, 2001, en donde se detectó una resistencia a la ampicilina del 38%, por ello, se puede afirmar que la resistencia que se ha producido a este medicamento está más relacionada con las malas prácticas en las granjas que con la situación económica del país en cuestión.

Los antimicrobianos que han presentado un ratio de resistencia muy baja son la gentamicina y el cloranfenicol. La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que está indicado para el tratamiento de enteritis en aves. Su empleo se extendió durante la década de los 70 para sustituir a la estreptomina, la tasa de resistencia obtenida en este estudio fue de 7,89% por lo que la mayoría de las cepas analizadas fueron sensibles, este ratio es similar al obtenido en Túnez (5,1%) o Nigeria (8%) (Abbassi *et al.*, 2017; Paridah *et al.*, 2016), por el contrario países como India y China tienen tasas moderadas y elevadas (32-66%), lo cual indica que la utilización de este medicamento como promotor del crecimiento y profilaxis se ha extendido debido al

aumento de ingresos (Hussain *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). Cabe señalar que, en España el empleo de este fármaco ha disminuido con el tiempo, ya que el porcentaje de resistencia para este medicamento en el 2001 era del 40% (Saenz *et al.*, 2001).

El cloranfenicol, es un antimicrobiano de amplio espectro que interfiere en la síntesis proteica bacteriana, la tasa de resistencia obtenida en este estudio es de 3,51%, este hecho contrasta con estudios realizados previamente en otros países, ya que en China el ratio es casi del 70% (Lei *et al.*, 2010), aunque el uso de este medicamento está prohibido en animales. Sin embargo, en países como Nigeria y Polonia el ratio es bajo, del 22% y 17,3%, respectivamente (Paridah *et al.*, 2016; Wasyl *et al.*, 2013), pero también hay tasas muy bajas, como en India, que no alcanza el 8% (Hussain *et al.*, 2017) o en Islandia en donde no llega al 3% (Thorsteinsdottir *et al.*, 2010). En España se detectaron un 12% de cepas resistentes a este medicamento en 2001 (Sáenz *et al.*, 2001).

Por último, se ha observado que la cefotaxima y la ceftriaxona tienen un ratio de resistencia muy baja. En ambos casos, únicamente una cepa de los 114 aislamientos ha resultado ser resistente, es decir, su tasa es de 0,88%. Esta cifra puede ser explicada por el origen de los antimicrobianos, los dos pertenecen a la familia de las cefalosporinas y son antibióticos de tercera generación, con lo que su uso es bastante reciente. Esta afirmación es respaldada por los datos obtenidos en otros estudios en China donde la prevalencia de resistencia a la cefotaxima y ceftriaxona es bastante baja, de 14,8% y 17,1%, respectivamente (Yassin *et al.*, 2017), a pesar de ello, en estudios previos en este país, la tasa era más elevada. Por otro lado, en el estudio realizado en Túnez, un 5,6% de cepas aisladas en muestras cárnicas eran resistentes a cefotaxima (Abbassi *et al.*, 2017).

4.2.2. Patrón de resistencia.

La multiresistencia (MDR) es el fenómeno mediante el cual algunas cepas bacterianas son resistentes a varios antimicrobianos. En el presente estudio se ha designado como multirresistentes a aquellas cepas de *E. coli* que mostraron resistencia a tres o más familias de antibióticos.

De los 114 aislamientos, 20 cepas (17,54%) son sensibles a los 8 antibióticos, 41 (35,96%) muestran resistencia a 1 familia de antimicrobianos y 22 (19,30%) son resistentes a 2 clases de antibióticos, mientras que 31 aislamientos muestran un fenotipo con multiresistencia (27,19%), estos aislamientos comprenden cepas resistentes a 3 y 4 familias de antimicrobianos, en la Figura 3 se puede observar una cepa con un perfil de multiresistencia.

Sin embargo, no se han encontrado cepas aisladas que sean resistentes a 5 o 6 clases de antibióticos. En total, se han identificado 14 patrones de resistencia diferentes, en la Tabla 6, se encuentra toda la información relativa a estos valores.

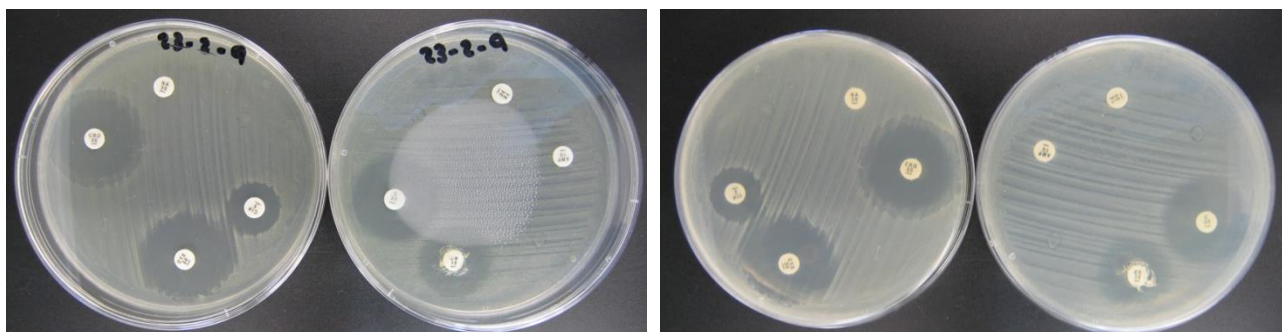


FIGURA 3. Patrón de multirresistencia a tres clases de antimicrobianos: Ampicilina, Tetraciclina y Ácido nalidíxico.

TABLA 6. Patrón de resistencias de las cepas aisladas de *E. coli* a las distintas familias de antibióticos.

Número de resistencias	Cepas aisladas		Patrón de resistencia	
	Número	%	Antimicrobianos	%
0	20	17,54	-	-
1	37	32,46	NA/CIP	39,36
	4	3,51	AMP	4,26
2	12	10,53	TE, NA/CIP	12,77
	5	4,39	AMP, NA	5,32
	4	3,51	AMP, TE	4,26
	1	0,88	CN, NA/CIP	1,06
3	18	15,79	AMP, TE, NA/CIP	19,15
	3	2,63	CN, AMP, TE	3,19
	1	0,88	C, TE, NA	1,06
	1	0,88	CN, TE, NA	1,06
4	4	3,51	CN, AMP, TE, NA/CIP	4,26
	2	1,75	C, AMP, TE, NA/CIP	2,13
	1	0,88	C, AMP, TE, NA	1,06
	1	0,88	AMP, TE, CRO/CTX, NA	1,06
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
TOTAL:	114	100,00		100,00

NA/ CIP: ácido nalidíxico/ ciprofloxacino, AMP: ampicilina, TE: tetraciclina, CN: gentamicina;
C: cloranfenicol; CRO/ CTX: ceftriaxona/ cefotaxima

Estudios realizados con anterioridad en España, muestran una incidencia mayor al resultado obtenido en este trabajo, llegando al 98% de cepas multirresistentes (Vitas *et al.*, 2018; Sáenz *et al.*, 2001). La enorme diferencia de multirresistencias puede ser explicada por el número de antimicrobianos empleados, ya que en estos estudios previos se probaron entre 16 y 33 antimicrobianos distintos, mientras que en este estudio se ha realizado únicamente con 8. Dado que, la multirresistencia es alcanzada cuando una cepa aislada es resistente mínimo a 3 familias de antibióticos, es normal que el porcentaje se incremente cuando se analiza un mayor número de

antimicrobianos. Esta premisa es respaldada por la comparación de los ratios de resistencias de cada uno de los antibióticos testados.

A nivel global, los países en desarrollo tienen una tasa de multirresistencia mayor, como es el caso de Túnez o India, el porcentaje de cepas multirresistentes aisladas en pollos llega al 44% (Abbassi *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2017). En este tipo de países, hay menor regularidad en los controles sanitarios de los productos cárnicos, con lo que el uso de antibióticos en las explotaciones avícolas es inferior. En el caso de China, la multirresistencia ha aumentado en las últimas décadas (Zhang *et al.*, 2017), el porcentaje de cepas multirresistentes de *E. coli* en aves de corral se encuentra entre el 89,20%-92,19% (Wang *et al.*, 2016; Yassin *et al.*, 2017). Estas cifras son similares a las obtenidas en estudios previos en España, esto se debe, generalmente, al empleo de ciertos medicamentos como promotores del crecimiento y para la prevención de enfermedades (Hussain *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016).

No obstante, en países del norte de Europa como Suecia o Noruega, el porcentaje de multirresistencia es menor, un estudio ha detectado que Suecia tiene un 3% de cepas multirresistentes, mientras que, en Noruega un 23,1% de las cepas han sido resistentes a tres o más clases de antimicrobianos (Kaspersen *et al.*, 2018), asimismo, en Islandia este valor alcanza el 15%. Esto podría deberse a que, según artículos previos, hay una mayor frecuencia de detectar cepas multirresistentes en aquellas áreas donde se ha extendido el uso de antibióticos para la producción en el sector avícola. Teniendo en cuenta que en los países nórdicos el uso de antimicrobianos como factores de crecimiento nunca se ha permitido, se puede comprender que haya una variación en las tasas de aislamientos multirresistentes (Thorsteinsdottir *et al.*, 2010).

Cabe señalar ciertos aspectos de la tabla, el porcentaje de la columna de cepas aisladas se ha elaborado respecto del total de cepas obtenidas (114), mientras que, el porcentaje obtenido en el patrón de resistencia está definido respecto del total de cepas con resistencias (94). Asimismo, para comparar los valores de multirresistencia con otros artículos, se ha empleado la primera columna de porcentajes.

4.3. ANÁLISIS DE LA RESISTENCIA GENOTÍPICA.

Se ha demostrado que en la mayor parte de las transferencias horizontales, los genes transferidos, están situados en estructuras genéticas móviles como son los plásmidos y transposones, ambos elementos se basan en una secuencia de ADN que contiene genes de resistencia y puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula. No obstante, Mosquito *et al.*, (2011) afirmaba que las cepas de *E. coli* podían adquirir resistencia de manera general, a través de los integrones, los cuales son unas piezas genéticas no móviles por sí mismas, formadas por un fragmento que codifica una proteína integrasa y una secuencia a la cual se unen los genes de resistencia. A pesar de ello, estas estructuras tienen una amplia difusión entre las bacterias, debido a que se suelen hallar en transposones, los cuales a su vez, se encuentran en plásmidos conjugativos (Sabaté y Prats, 2013).

En el presente estudio se realizaron pruebas con la finalidad de detectar genes relacionados con la resistencia de *E. coli* a dos antimicrobianos, la tetraciclina y la ampicilina. El principal mecanismo de resistencia a la tetraciclina son las bombas de

eflujo, estas son codificadas en las *E. coli* por los genes tet (A) y tet (B). Por otra parte, la ampicilina es un antibiótico de espectro extendido derivado de la penicilina, que pertenece al grupo de los β -lactámicos. En general, el mecanismo de resistencia hacia β -lactámicos es la hidrólisis enzimática, producida por la presencia de unas proteínas denominadas β -lactamasas generadas principalmente, por microorganismos Gram-negativos. Estas se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo β -lactámico, inactivando de esta manera el antimicrobiano antes de generar cualquier efecto (Mosquito *et al.*, 2011). Existen varios genes responsables de codificar estas proteínas, como el bla_{SHV}, bla_{TEM} y bla_{CMY-2} (Abd-EITawab *et al.*, 2015).

Las pruebas se realizaron en 58 cepas aisladas, las cuales fueron seleccionadas por tener distinto patrón de resistencia, se realizaron dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), dependiendo del antimicrobiano analizado. Los patrones de resistencia de dichas cepas así como el estudio de los 5 genes que confieren resistencia, se muestran en los Anexos 3 y 4 de este estudio. Además, estos resultados se resumen en las Tablas 7 y 8. En ellas, aparece el análisis genético de las cepas fenotípicamente resistentes a los antimicrobianos y el de las cepas sensibles, respectivamente.

TABLA 7. Resultados del análisis de la presencia de 5 genes de resistencia en cepas de *E. coli* resistentes.

Antimicrobianos	Cepas analizadas	Gen probado	Cepas <i>E. coli</i> fenotípicamente resistentes	
			Número de cepas	%
Ampicilina	27	bla _{SHV}	0	0
		bla _{TEM}	27	100
		bla _{CMY-2}	0	0
		Todos negativos	0	0
		Todos positivos	0	0
Tetraciclina	30	tet (A)	21	70
		tet (B)	6	20
		Todos negativos	0	0
		Todos positivos	3	10

En este trabajo, se ha encontrado que de los 58 aislamientos seleccionados, 27 mostraban un fenotipo de resistencia a la ampicilina y además, todos ellos (100%) presentaban el gen bla_{TEM}. Por otro lado, no se han encontrado cepas resistentes que incluyeran en su genotipo los genes bla_{SHV} y bla_{CMY-2}, como se puede observar en la Figura 5. Este porcentaje se asemeja al que se ha obtenido en otros estudios de *E. coli* en muestras de pollo, los cuales indican que la resistencia que han adquirido las cepas a la ampicilina (β -lactámico), se debe principalmente a la presencia del gen bla_{TEM}. Particularmente, Vuthy *et al.*, (2017) lo identificaron en el 62% de los aislamientos resistentes, el estudio de Abd-EITawab *et al.*, (2015) lo detectó en el 73% de estas cepas y la cifra se incrementa más en otros estudios llegando hasta el 88,2% (Colom *et al.*, 2003) o el 88,9% (Jiang *et al.*, 2011). Además, en el estudio de Colom *et al.*, (2003), se detectó que el 3,92% de las cepas resistentes contenían el gen bla_{SHV}, porcentaje mayor al obtenido en el presente estudio.

Con relación a la tetraciclina, el 100% de las cepas fenotípicamente resistentes contenían en su genotipo uno o ambos genes de resistencia. De los 30 aislamientos resistentes, 21 (70%) presentaban el gen tet (A), 6 (20%) presentaban el gen tet (B) y 3 (10%) presentaban ambos genes, algunos ejemplos de los genes de resistencia encontrados en estas cepas se pueden observar en la electroforesis de la Figura 4. Las cifras son muy parecidas a las del estudio de Vuthy *et al.*, (2017) para muestras de pollo en China. Las cepas resistentes presentaban el gen tet (A) en un 86%, el tet (B) en un 7% y se encontró que el 2% de los aislamientos eran resistentes a ambos genes. Por el contrario, tanto en el estudio de Martí *et al.*, (2006) como el de Mosquito *et al.*, (2011) el porcentaje de resistencia de las cepas al gen tet (B) fue mayor que el del gen tet (A), adquiriendo unos valores de entre 51-66% frente a 14-49%, respectivamente.

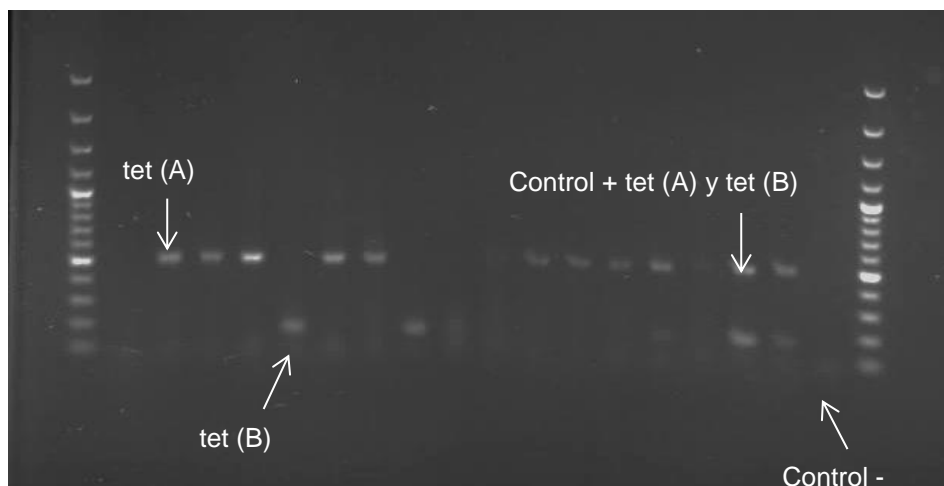


FIGURA 4. Amplificación de los genes de resistencia tet (A) y tet (B) en *E. coli* con la presencia de bandas de amplificación de 502 y 173, respectivamente.

En el caso de las cepas fenotípicamente sensibles a la ampicilina, ninguna de ellas contenía en su genotipo el gen bla_{SHV}, pero, 7 (22,58%) contenían el gen bla_{TEM} y 2 (6,45%) mostraban el gen bla_{CMY-2}, lo cual contrasta con el resultado obtenido para este gen en los aislamientos resistentes. Teniendo en cuenta esta información, se puede afirmar que el 29% de las cepas sensibles presentaban el gen bla_{TEM} o bla_{CMY-2}, este resultado es similar al obtenido en estudios previos para estas cepas, ya que Jiang *et al.*, (2011) detectaron que más del 25% de las cepas sensibles presentaban el gen bla_{TEM} o bla_{SHV}. Sin embargo, en el 70,97% de las cepas sensibles (22), no se ha encontrado ningún gen de resistencia a la ampicilina analizado.

TABLA 8. Resultados del análisis de la presencia de 5 genes de resistencia en cepas de *E. coli* sensibles.

Antimicrobianos	Cepas analizadas	Gen probado	Cepas <i>E. coli</i> fenotípicamente sensibles	
			Número de cepas	%
Ampicilina	31	<i>bla_{SHV}</i>	0	0
		<i>bla_{TEM}</i>	7	22,58
		<i>bla_{CMY-2}</i>	2	6,45
		Todos negativos	22	70,97
		Todos positivos	0	0
Tetraciclina	28	<i>tet (A)</i>	7	25
		<i>tet (B)</i>	1	3,57
		Todos negativos	20	71,43
		Todos positivos	0	0

Por lo que respecta a la tetraciclina, 7 cepas (25%) mostraban el gen *tet (A)* y solo 1 (3,57%) el gen *tet (B)*. La presencia del gen *tet (A)* en cepas sensibles puede ser debida a la acción de la proteína transportadora codificada por este mismo gen, la cual depende de la acción de una proteína reguladora, que es codificada por *tet (R)*, es decir, la presencia del gen *tet (A)* en este tipo de aislamientos puede deberse a la no presencia del gen *tet (R)* o por una mutación de este (Martí *et al.*, 2006). Por otro lado, de los 28 aislamientos sensibles, el 71,43% (20) fueron negativos, es decir, no contenían ningún gen de resistencia a la tetraciclina analizado.

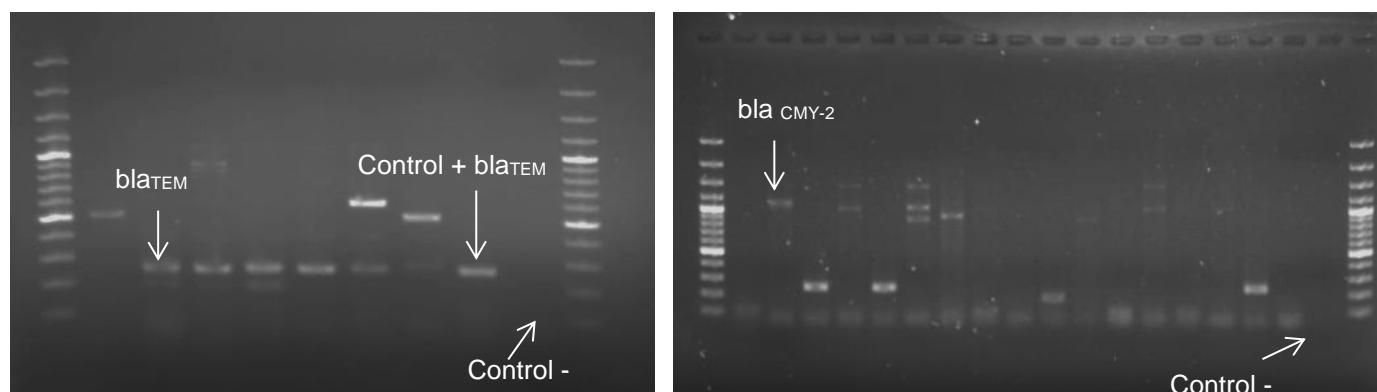


FIGURA 5. Amplificación de los genes de resistencia *bla_{TEM}* y *bla_{CMY-2}* en *E. coli* con la presencia de bandas de amplificación de 247 y 1000, respectivamente.

Cabe destacar, que la presencia de un gen en un microorganismo, no implica que este sea fenotípicamente resistente al antimicrobiano. La expresión de genes depende del promotor (si se da una variación en esta secuencia, variará la expresión de los genes) y del silenciamiento genético reversible (Enne *et al.*, 2006).

5. DISCUSIÓN

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, y a modo de síntesis, se puede afirmar que, de las muestras adquiridas en comercios minoristas, únicamente un 23,34% no presentaba *E. coli*. Sin embargo, el resto de las muestras mostraban distintos patrones de resistencia, debido a la mayor acumulación de residuos de antimicrobianos en ciertas partes de las aves, es decir, los microorganismos que se encuentran en estas partes adquieren mayor resistencia contra los medicamentos usados en el sector avícola. Los estudios de Mund *et al.*, (2017), en concordancia con este trabajo, afirman que se detectaron mayores porcentajes de *E. coli* en las carcasas de pollo. Asimismo, se ha detectado que, de los 114 aislamientos estudiados a nivel fenotípico, únicamente el 17,54% no ha presentado ninguna resistencia frente a los ocho antibióticos empleados, este valor muestra la gravedad del problema de diseminación de bacterias en la industria alimentaria.

Por lo que respecta a los ratios de resistencia, se ha podido observar que hay una gran variedad dependiendo del tipo de antibiótico estudiado, esto se debe en gran medida al uso extremo que se ha dado a algunos de estos antibióticos para prácticas veterinarias o higiénicas o como factor de crecimiento. Los antimicrobianos más usados a lo largo de las décadas en el sector avícola han sido el ácido nalidíxico, la ampicilina y la tetraciclina (Yassin *et al.*, 2017), estos tres antimicrobianos son los que han presentado mayor porcentaje de resistencia en este estudio. Otros antibióticos de segunda y tercera generación (ciprofloxacino, cefotaxima y ceftriaxona) han mostrado menor tasa de prevalencia debido a que su empleo comenzó a partir de la década de los 70 o incluso más tarde, para sustituir a los antimicrobianos que se habían extendido de forma masiva. Generalmente, los países en vías de desarrollo son los que tienen mayores cifras de resistencia a antibióticos, llegando a obtener elevados porcentajes de cepas multirresistentes. Este estado se ha dado por dos premisas: (a) incremento de los ingresos y (b) menor regulación del control sanitario debido a vacío legal que favorece las malas prácticas veterinarias, lo cual puede haber contribuido a la aparición y diseminación de variantes de *E. coli*.

Por último, destacar que a nivel genotípico, tanto en las cepas que muestran resistencia a los antimicrobianos como en las cepas sensibles, los principales genes de resistencia encontrados son el bla_{TEM} en el caso de la ampicilina (β -lactámico) y el tet (A) en el caso de la tetraciclina, este resultado se repite en otros análisis (Mosquito *et al.*, 2011; Paridah *et al.*, 2016). Asimismo, cabe la posibilidad de que las cepas que han resultado ser fenotípicamente resistentes contengan en su genoma otros genes no estudiados que les proporcionen otro tipo de resistencias a estos medicamentos.

6. CONCLUSIONES

En la actualidad, las aves de corral pertenecen a una de las industrias alimentarias más extensas en todo el mundo. Concretamente, el pollo es una de las carnes más demandadas debido a que, su precio es uno de los más económicos en el consumo de productos cárnicos. Sin embargo, los resultados de múltiples estudios realizados alrededor del mundo, muestran que este producto es una de las principales fuentes de diseminación de cepas multirresistentes de *E. coli*, estas cepas pueden aparecer en la cadena alimentaria y provocar graves problemas de salud pública. Las conclusiones obtenidas en el presente estudio realizado con muestras de pollo destinadas al consumo humano son:

- ❖ La detección de *E. coli* en las muestras es independiente del tipo de comercio donde se compran, sin embargo se han observado variaciones significativas dependiendo del tipo de muestra, puesto que se han detectado cepas de *E. coli* con mayor frecuencia en las carcasas.
- ❖ Los antibióticos que tuvieron las tasas más elevadas de resistencia en *E. coli* fueron el ácido nalidíxico y la tetraciclina, respectivamente. Mientras que, las cefalosporinas de tercera generación, cefotaxima y ceftriaxona, han presentado ratios de resistencia muy bajos.
- ❖ El 27,19% de las cepas estudiadas, mostraron un perfil fenotípico de multirresistencia a tres o cuatro familias de antimicrobianos. Sin embargo, ninguna cepa aislada ha mostrado un patrón de resistencia superior, cabe destacar que solo se han empleado ocho antimicrobianos en el presente trabajo.
- ❖ Se ha comprobado que *E. coli* es un gran reservorio de genes que ofrecen resistencia frente a antibióticos como la tetraciclina o la ampicilina (β -lactámico), de los cuales los genes que se han detectado con mayores porcentajes han sido el tet (A), el tet (B) y el bla_{TEM}.
- ❖ Los resultados adquiridos en el presente estudio en referencia a las resistencias fenotípicas y a la detección de genes concuerdan bastante bien con los datos publicados en los últimos artículos científicos.
- ❖ Si no se reduce el consumo de antimicrobianos en todo el mundo, los microorganismos adquirirán mayores ratios de resistencia y la circunstancia en la que nos encontramos actualmente empeorará, lo que nos puede llevar a que en el futuro los antibióticos no serán efectivos.

7. REFERENCIAS

- ABBASSI, M. (2017). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolates from Healthy Poultry, Bovine and Ovine in Tunisia: A Real Animal and Human Health Threat. *Journal of Clinical Microbiology and Biochemical Technology*, (April), 019–023. <https://doi.org/10.17352/jcmbt.000021>.
- ABD-ELTAWAB, A. A., AMMAR, A. M., SOAD, A. N., y REDA, R. M. (2015). Antibacterial Resistance and Resistance Gene Detriments of E. Coli Isolated from Chicken. *Benha Veterinary Medical Journal*, 28(2), 231-240.
- ALEKSHUN, M.N. y LEVY, S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128, 1037-1050.
- BEZERRA, W. G. A., SILVA, I. N. G. da, VASCONCELOS, R. H., MACHADO, D. N., LOPES, E. D. S., LIMA, S. V. G., MACIEL, W. C. (2018). Isolation and Antimicrobial Resistance of Escherichia coli and Salmonella enterica subsp. enterica (O:6,8) in Broiler Chickens. *Acta Scientiae Veterinariae*, 44(1), 7. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80957>.
- BURRUS, V., PAVLOVIC, G., DECARIS, B. y GUEDON, G. (2002). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46, 601-610.
- CLEWELL, D.B., FLANNAGAN, S.E. y JAWORSKI, D.D. (1995). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* 3, 229-236.
- CANTÓN, R. (2009). Antibiotic resistance genes from the environment: A perspective through newly identified antibiotic resistance mechanisms in the clinical setting. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (SUPPL.1), 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x>.
- COLOM, K., PÉREZ, J., ALONSO, R., FERNÁNDEZ-ARANGUIZ, A., LARIÑO, E., y CISTERNA, R. (2003). Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 147–151. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00306-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00306-9).
- DOUCET-POPULAIRE, F., TRIEU-CUOT, P., DOSBAA, I., ANDREMONT, A. y COURVALIN, P. (1991). Inducible transfer of conjugative transposon Tn1545 from Enterococcus faecalis to Listeria monocytogenes in the digestive tracts of gnotobiotic mice. *Antimicrob Agents Chemother* 35, 185-187.
- ENNE, V. I., DELSOL, A. A., ROE, J. M., & BENNETT, P. M. (2006). Evidence of antibiotic resistance gene silencing in Escherichia coli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(9), 3003–3010. <https://doi.org/10.1128/AAC.00137-06>.
- FRANCIA, M.V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M.P., Latorre, A., Drainas, C. y DE LA CRUZ, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev* 28, 79-100.
- GEKENIDIS, M. T., QI, W., HUMMERJOHANN, J., ZBINDEN, R., WALSH, F., y DRISSNER, D. (2018). Antibiotic-resistant indicator bacteria in irrigation water: High prevalence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli. *PLoS ONE*, 13(11), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207857>.
- GOUVÊA, R., DOS SANTOS, F. F., y DE AQUINO, M. H. C. (2015). Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17(1), 1-10.
- HICKMAN, A. B. y DYDA, F. (2015). Mechanisms of DNA Transposition. *Mobile DNA III*, 531–553. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0034-2014>.

- HINERFELD, D. y CHURCHWARD, G. (2001). Specific binding of integrase to the origin of transfer (oriT) of the conjugative transposon Tn916. *J Bacteriol* 183, 2947-2951.
- HONG, H., JUNG, J. y PARK, W. (2014). Plasmid-Encoded Tetracycline Efflux Pump Protein Alters Bacterial Stress Responses and Ecological Fitness of *Acinetobacter oleivorans*. *PLoS ONE*, 9(9), e107716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107716>.
- HUSSAIN, A., SHAIK, S., RANJAN, A., NANDANWAR, N., TIWARI, S. K., MAJID, M. y AHMED, N. (2017). Risk of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from commercial broiler and free-range retail chicken in India. *Frontiers in Microbiology*, 8(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02120>.
- JIANG, H. X., LÜ, D. H., CHEN, Z. L., WANG, X. M., CHEN, J. R., LIU, Y. H. y ZENG, Z. L. (2011). High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *The veterinary journal*, 187(1), 99-103.
- KASPERSEN, H., URDAHL, A. M., SIMM, R., SLETTEMEÅS, J. S., LAGESEN, K. y NORSTRÖM, M. (2018). Occurrence of quinolone resistant *E. coli* originating from different animal species in Norway. *Veterinary Microbiology*, 217(October 2017), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.02.022>.
- KLEIN, E. Y., VAN BOECKEL, T. P., MARTINEZ, E. M., PANT, S., GANDRA, S., LEVIN, S. A. y LAXMINARAYAN, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(15), E3463–E3470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717295115>.
- KOZAK, G. K., BOERLIN, P., JANECKO, N., REID-SMITH, R. J. y JARDINE, C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from Swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), 559–566. <https://doi.org/10.1128/AEM.01821-08>.
- LEI, T., TIAN, W., HE, L., HUANG, X. H., SUN, Y. X., DENG, Y. T. y SHEN, J. Z. (2010). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary microbiology*, 146(1-2), 85-89.
- MARTÍ, S., FERNÁNDEZ-CUENCA, F., PASCUAL, Á., RIBERA, A., RODRÍGUEZ-BAÑO, J., BOU, G. y VILA, J. (2006). Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(2), 77–80.
- MCEWEN, S. A. y FEDORKA-CRAY, P. J. (2002). Antimicrobial Use and Resistance in Animals. *Clinical Infectious Diseases*, 34(Suppl 3), 93–106.
- MELLA M., S., SEPÚLVEDA A., M., GONZÁLEZ R., G., BELLOT., H., DOMÍNGUEZ Y., M., ZEMELMAN Z., R. y RAMÍREZ G., C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4), 330–338. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>.
- MILLMAN, J. M., WAITS, K., GRANDE, H., MARKS, A. R., MARKS, J. C., PRICE, L. B. y HUNGATE, B. A. (2013). Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in retail chicken: comparing conventional, organic, kosher, and raised without antibiotics. *F1000Research*, 2, 155. <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-155.v2>.
- MOSQUITO, S., RUIZ, J., BAUER, J. L. y OCHOA, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656.

- MUND, M. D., KHAN, U. H., TAHIR, U., MUSTAFA, B. E. y FAYYAZ, A. (2017). Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(7), 1433–1446. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1212874>.
- OROMÍ, J. (2014). Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina Integral*, 36(10), 367–370. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-10022180>.
- PARIDAH, M., MORADBAK, A., MOHAMED, A., OWOLABI, F., ASNIZA, M. y ABDUL KHALID, S. H. . (2016). We are *IntechOpen* , the world 's leading publisher of Open Access books Built by scientists, for scientists TOP 1 %. *Intech, i(tourism)*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>.
- ROBERTS, A.P., CHANDLER, M., COURVALIN, P., GUEDON, G., MULLANY, P., PEMBROKE, T., ROOD, J.I., SMITH, C.J., SUMMERS, A.O., TSUDA, M. y BERG, D.E. (2008). Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* 60, 167-173.
- ROCA, I., AKOVA, M., BAQUERO, F., CARLET, J., CAVALERI, M., COENEN, S. y VILA, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes and New Infections*,6(1),22–29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>.
- ROTH, N., KÄSBOHRER, A., MAYRHOFER, S., ZITZ, U., HOFACRE, C. y DOMIG, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in Escherichia coli: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1791–1804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>.
- SABATÉ, M. y PRATS, G. (2013). Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 20(7), 341–345. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72813-9).
- SÁENZ, Y., ZARAZAGA, M., BRIÑAS, L., LANTERO, M., RUIZ-LARREA, F. y TORRES, C. (2001). Antibiotic resistance in Escherichia coli isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International journal of antimicrobial agents*, 18(4), 353-358.
- SCHWARZ, S., LOEFFLER, A. y KADLEC, K. (2017). Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 82-e19. <https://doi.org/10.1111/vde.12362>.
- SCIENTI, E. M. A. J. (2017). *ECDC , EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals*. 2017(September). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5017>.
- SENASA. (2010). *Plan De Estrategia Sanitaria* (pp. 1–32). pp. 1–32.
- TAFUR, D. y VILLEGAS, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226.
- THORSTEINSDOTTIR, T. R., HARALDSSON, G. , FRIDRIKSDOTTIR, V. , KRISTINSSON, K. G. y GUNNARSSON, E. (2010). Prevalence and Genetic Relatedness of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli Isolated From Animals, Foods and Humans in Iceland. *Zoonoses and Public Health*, 57: 189-196 . [doi:10.1111/j.1863](https://doi.org/10.1111/j.1863).
- TORREÓN, U. (2011). *Universidad Autónoma de Coahuila Facultad de Medicina*. (January), 1–36.
- TYSON, G. H., KABERA, C., LAM, C., MCDERMOTT, P. F., TATE, H., NYIRABAHIZI, E. y CRAREY, E. (2017). Prevalence and Antimicrobial Resistance of Enterococci Isolated from Retail Meats in the United States, 2002 to 2014. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/aem.01902-17>.
- VIGNOLI, R. y SEIJA, V. (n.d.). *Principales mecanismos de resistencia antibiotica.pdf*. 649–662.

- VITAS, A. I., NAIK, D., PÉREZ-ETAYO, L. y GONZÁLEZ, D. (2018). Increased exposure to extended-spectrum β -lactamase-producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae through the consumption of chicken and sushi products. *International journal of food microbiology*, 269, 80-86.
- VUTHY, Y., LAY, K. S., SEIHA, H., KERLEGUER, A. y AIDARA-KANE, A. (2017). Antibiotic susceptibility and molecular characterization of resistance genes among *Escherichia coli* and among *Salmonella* subsp. in chicken food chains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 670–674. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.07.002>.
- WANG, Y., YI, L., WANG, Y., WANG, Y., CAI, Y., ZHAO, W. y DING, C. (2016). Isolation, phylogenetic group, drug resistance, biofilm formation, and adherence genes of *Escherichia coli* from poultry in central China. *Poultry science*, 95(12), 2895-2901.
- WASYL, D., HOSZOWSKI, A., ZAJĄC, M. y SZULOWSKI, K. (2013). Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Frontiers in Microbiology*, 4(8), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00221>.
- YASSIN, A. K., GONG, J., KELLY, P., LU, G., GUARDABASSI, L., WEI, L. y WANG, C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLoS ONE*, 12(9), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185326>.
- ZHANG, P., SHEN, Z., ZHANG, C., SONG, L., WANG, B., SHANG, J. y ZHENG, Y. (2017). Surveillance of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* from chicken and swine, China, 2008– 2015. *Veterinary microbiology*, 203, 49-55.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Detalles de las muestras analizadas donde se indica el número de la muestra, el tipo, comercio, la fecha de compra y la de análisis.

Número de muestra	Tipo de muestra	Comercio	Fecha de compra	Fecha del análisis
1	Hígado	1	24/09/2018	16/10/2018
2	Hígado	2	01/10/2018	23/10/2018
3	Hígado	3	26/09/2018	23/10/2018
4	Molleja	3	26/09/2018	06/11/2018
5	Hígado	4	03/10/2018	06/11/2018
6	Hígado	5	12/11/2018	13/11/2018
7	Carcasa	6	12/11/2018	13/11/2018
8	Carcasa	7	19/11/2018	20/11/2018
9	Hígado	7	19/11/2018	20/11/2018
10	Hígado	6	14/11/2018	27/11/2018
11	Carcasa	8	14/11/2018	27/11/2018
12	Hígado	9	26/11/2018	27/11/2018
13	Carcasa	9	26/11/2018	27/11/2018
14	Hígado	6	14/11/2018	27/11/2018
15	Hígado	10	28/11/2018	15/01/2019
16	Hígado	13	10/12/2018	15/01/2019
17	Molleja	13	10/12/2018	15/01/2019
18	Carcasa	3	26/09/2018	15/01/2019
19	Carcasa	1	24/09/2018	15/01/2019
20	Carcasa	4	03/11/2018	15/01/2019
21	Carcasa	10	28/11/2018	15/01/2019
22	Carcasa	11	21/11/2018	15/01/2019
23	Carcasa	4	03/10/2018	15/01/2019
24	Carcasa	2	01/10/2018	15/01/2019
25	Hígado	12	12/12/2018	15/01/2019
26	Hígado	13	10/12/2018	15/01/2019
27	Hígado	11	21/11/2018	15/01/2019
28	Molleja	13	10/12/2018	15/01/2019
29	Molleja	4	03/10/2018	15/01/2019
30	Carcasa	13	10/12/2018	15/01/2019

ANEXO 2. Resultados de la medición de los halos de resistencia.

nº de cepa	Gentamicina 10	Cloranfenicol 30	Ampicilina 10	Tetraciclina 30	Ceftriaxona 30	Cefotaxima 30	Ciprofloxacino 5	Ácido nalidíxico 30
1-1-1	2,2	3	R	2,8	3,5	4	3,4	R
1-1-2	2	2,5	2,2	R	3,5	3,4	2	R
1-1-3	1,8	2,4	1,9	2,4	2,9	3,5	3,8	2,8
1-1-4	2	2,5	2,1	2,5	3	3,3	1,8	R
1-2-5	2	2,5	2,1	2,5	3	3,5	1,9	R
1-2-6	2	2,9	2,3	R	3,4	3,3	2,9	R
2-1-1	1,9	3	R	2,7	3,3	3,2	2	R
2-1-2	1,7	2,9	2,1	2,4	3,4	3,2	3,1	1,4
2-1-3	1,7	2,7	2,2	2,3	3,1	3,2	3,1	1,4
2-1-4	2	3,2	2,1	2,4	3,4	3,5	4	3
2-1-5	1,7	2,9	2,2	2,3	3,2	3,2	3	R
2-1-6	1,9	2,5	2,3	2,4	3,2	3,5	3	R
2-1-7	1,6	3,1	2,5	2,5	3,1	3,2	3,1	1,4
2-1-8	1,7	2,9	2,1	2,4	3,1	3,2	3	1,5
2-1-9	1,9	3	2,2	2,4	3,2	3,5	2,9	R
2-2-10	1,9	2,8	2	R	3	3	1,7	R
2-2-11	1,7	2,9	2,3	2,2	3,2	2,6	2,5	R
2-2-12	1,7	2,7	2,1	2,4	2,9	2,5	4	2,4
2-3-13	1,8	2,9	2,2	2,5	3,1	3	4,6	2,6
3-2-1	1,7	2,5	2	2,4	3,1	2,9	3,6	2,6
4-1-1	1,7	2,5	2	2,3	3	2,8	1,7	R
5-1-1	R	3	R	R	2,8	3	1,6	R
6-2-1	1,5	2,7	2	2,4	3,3	3,3	3,6	2
6-2-2	2	2,5	2,1	2	3,1	3,1	2,5	R
6-2-3	2	2,6	R	2,4	2,8	2,8	2,9	R
6-2-4	1,6	1,8	R	R	3,2	3,5	3	R
6-2-5	1,8	1,7	R	R	2,8	3,1	3	R
6-3-6	2	2,7	R	2,5	3	3,2	2,9	R

6-3-7	1,7	2,4	2	R	3,3	3,2	2,9	R
6-3-8	2,1	2,9	R	2,5	3	3,5	2,9	R
6-3-9	R	2,8	R	R	3,2	3,4	3,5	3
7-1-1	2	2,9	2,2	2,5	3,5	3,4	2	R
8-1-1	2	R	R	R	3,2	3	2,5	R
8-2-2	R	3,1	2,1	2,6	3,2	3,1	R	R
10-1-1	1,8	3,2	R	R	3,2	3,3	1,8	R
10-1-2	2,1	3,1	2,1	2,5	2,8	3	3,5	R
10-1-3	1,3	2,9	R	R	3	2,8	R	R
10-1-4	2	2,9	2,1	2,7	2,9	3,2	3,1	R
10-1-5	1,9	2,7	2,2	2,4	3	3	2,6	1,9
10-1-6	2,1	3,5	R	R	3	3,6	3,2	R
10-1-7	2,1	R	R	R	1,8	2	R	R
10-1-8	1,7	2,6	2,1	2,3	3	2,9	3,4	2,7
10-1-9	R	2,9	R	R	3,1	3,2	4	3,1
10-1-10	1,9	2,9	2,2	2,5	3,4	3	3,2	1,6
12-2-1	R	2,6	R	R	3	3,1	R	R
12-2-2	2	2,4	R	R	2,8	2,9	2	R
13-1-1	1,8	2,5	2	2,2	2,9	3,1	2	R
13-1-2	1,8	2,5	2,1	R	3,4	3	1,7	R
13-1-3	1,7	2,4	2	2,2	3,3	3,3	R	R
13-1-4	1,6	2,8	2,1	2,4	3	3,2	1,6	R
13-1-5	2,1	2,9	2,3	R	3,7	3,2	1,9	R
13-1-6	2,4	2,9	2,2	R	3,3	3,5	2,1	R
13-1-7	1,9	2,5	2,2	2,9	3,4	3,2	2,1	R
13-1-8	2	R	2,2	R	3,3	3,2	1,7	R
13-1-9	1,8	3	2,6	2,9	3,2	3	2,1	R
13-2-10	2	2,3	2,1	2,5	3,2	3,3	2,1	R
14-1-1	2,2	2,7	1,9	2,4	3,2	3	3,1	R
14-1-2	2	2,8	2,4	2,5	3,6	3,5	3,3	1,4
16-1-1	1,8	2,8	2,1	R	3,1	3	2,7	R
16-2-1	1,5	3	R	3	3	3,4	3,7	1,6
16-VB-1	1,7	2,7	2,1	R	3,3	3	3,1	R

19·VB·1	1,8	3	2,2	R	2,8	3	2,6	R
20·VB·1	R	2,5	R	R	3,3	3,1	3,9	2,7
21·VB·1	2	3	R	R	2,6	2,9	2,5	R
22·1·1	2,4	R	R	R	3,1	3	R	R
22·1·2	2,1	3,2	2,5	2,6	3,5	3,7	3,6	2,1
22·VB·1	2	2,4	2	R	2,9	3	R	R
23·1·1	2	2,8	R	R	2,9	3,2	3,8	2,6
23·1·2	2,3	3	R	R	3,5	3,4	1,7	R
23·1·3	2,5	2,7	2,1	2,5	3,1	3,3	1,6	R
23·1·4	1,8	2,8	2	2,3	2,6	2,7	R	R
23·1·5	R	2,5	R	R	3	3,3	2,8	R
23·1·6	1,9	2,6	2,1	2,3	2,7	3	R	R
23·1·7	1,6	2,5	R	R	3,3	2,9	3	2,8
23·1·8	2,1	3,1	2,2	2,7	3,1	3,2	3,1	R
23·1·9	1,7	2,5	1,9	2,4	3	3	R	R
23·1·10	1,9	2,5	R	R	3,4	3,7	1,7	R
23·1·11	2	2,8	1,8	2,2	2,9	3	3,5	2,5
23·1·12	1,9	2,9	R	R	3	3,3	3,5	2,8
23·1·13	2,2	3,4	2,3	2,6	3,2	3,4	3,1	R
23·1·14	1,9	3	R	R	3	3,1	1,7	R
23·1·15	R	2,4	1,9	R	3,3	3,2	1,6	R
23·1·16	1,9	2,6	2	2,5	3,2	3,2	1,6	R
23·1·17	2,4	3,4	2,5	3,1	3,3	3,6	3,5	R
23·1·18	2,1	3,1	R	R	3,3	3,6	1,7	R
23·1·19	2	3	2,2	2,6	3,4	3,5	1,8	R
23·1·20	2	2,9	R	R	3,2	3,5	1,8	R
23·1·21	2,3	3,3	2,5	2,9	3,4	3,3	3,2	R
23·2·1	2	2,8	2,2	2,7	3,2	3,4	3,5	R
23·2·2	2,2	3,1	2,3	3	3	3,3	1,8	R
23·2·3	1,9	3	2,2	2,9	3	3,8	3,5	1,5
23·2·4	1,7	2,4	1,9	2,3	2,8	2,9	2,7	R
23·2·5	2,5	3,2	R	R	3	3,1	1,9	R
23·2·6	2,3	3,2	2,3	3	1,9	1,4	3,2	R

23-2-7	2,1	3	R	R	3	3,1	1,6	R
23-2-8	1,9	2,7	2,2	2,6	2,9	2,8	1,7	R
23-2-9	2	2,6	R	R	2,4	2,8	1,7	R
23-2-10	2	3	2,4	2,7	3,1	3,5	3,4	R
23-2-11	2,3	2,9	2,3	2,7	3	3,6	1,7	R
23-3-1	2,1	2,7	2,3	2,6	3	3,2	1,7	R
23-VB-1	1,8	2,8	2,2	R	3,4	3	2,8	R
24-1-1	2,1	2,7	R	2,7	2,8	3,1	3,5	2,5
25-1-1	1,9	2,9	R	R	3,4	3,3	R	R
25-VB-1	1,9	2,6	R	R	2,9	3,2	4	3
26-2-1	2,1	3,1	R	3	3,1	3,3	4	2,9
26-2-2	R	2	R	R	3,3	3,4	1,7	R
26-2-3	2,3	2,7	2,3	2,5	3,4	3,5	4,3	3
26-2-4	2	2,6	R	R	3	3,5	1,6	R
26-2-5	1,9	2,5	2,1	2,5	3,1	3,5	3	R
26-3-1	1,3	3,4	R	R	R	R	1,7	R
26-VB-1	2,1	3,1	2,7	2,8	3,8	3,6	3,3	2,2
28-1-1	2,1	2,7	R	R	3,1	3,2	R	R
30-2-1	2	2,7	2	2,6	3,1	3,5	4	3
30-VB-1	2	3	R	2,6	3	3,2	3,4	2,1

La interpretación de los resultados se realizó según los límites recomendados por el CLSI, por lo que las celdas evaluadas como R (resistencia) indican que la medida obtenida para el halo ha sido mayor del valor considerado como intermedio.

ANEXO 3. Resultados de los análisis de resistencia fenotípica de todas las cepas de *E. coli* y agrupación por patrones de resistencia.

nº de cepa	Gentamicina 10	Cloranfenicol 30	Ampicilina 10	Tetraciclina 30	Ceftriaxona 30	Cefotaxima 30	Ciprofloxacino 5	Ácido nalidíxico 30
1-1-1	S	S	R	S	S	S	S	R
2-1-1	S	S	R	S	S	S	S	R
6-2-3	S	S	R	S	S	S	S	R
6-3-6	S	S	R	S	S	S	S	R
6-3-8	S	S	R	S	S	S	S	R
1-1-2	S	S	S	R	S	S	S	R
1-2-6	S	S	S	R	S	S	S	R
2-2-10	S	S	S	R	S	S	S	R
6-3-7	S	S	S	R	S	S	S	R
13-1-2	S	S	S	R	S	S	S	R
13-1-5	S	S	S	R	S	S	S	R
13-1-6	S	S	S	R	S	S	S	R
16-1-1	S	S	S	R	S	S	S	R
16-VB-1	S	S	S	R	S	S	S	R
19-VB-1	S	S	S	R	S	S	S	R
23-VB-1	S	S	S	R	S	S	S	R
1-1-4	S	S	S	S	S	S	S	R
1-2-5	S	S	S	S	S	S	S	R
2-1-5	S	S	S	S	S	S	S	R
2-1-6	S	S	S	S	S	S	S	R
2-1-9	S	S	S	S	S	S	S	R
2-2-11	S	S	S	S	S	S	S	R
4-1-1	S	S	S	S	S	S	S	R
6-2-2	S	S	S	S	S	S	S	R
7-1-1	S	S	S	S	S	S	S	R
10-1-2	S	S	S	S	S	S	S	R
10-1-4	S	S	S	S	S	S	S	R
13-1-1	S	S	S	S	S	S	S	R
13-1-4	S	S	S	S	S	S	S	R

13-1-7	S	S	S	S	S	S	S	R
13-1-9	S	S	S	S	S	S	S	R
13-2-10	S	S	S	S	S	S	S	R
14-1-1	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-3	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-8	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-13	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-16	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-17	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-19	S	S	S	S	S	S	S	R
23-1-21	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-1	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-2	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-4	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-6	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-8	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-10	S	S	S	S	S	S	S	R
23-2-11	S	S	S	S	S	S	S	R
23-3-1	S	S	S	S	S	S	S	R
26-2-5	S	S	S	S	S	S	S	R
5-1-1	R	S	R	R	S	S	S	R
23-1-5	R	S	R	R	S	S	S	R
26-2-2	R	S	R	R	S	S	S	R
6-2-4	S	S	R	R	S	S	S	R
6-2-5	S	S	R	R	S	S	S	R
10-1-1	S	S	R	R	S	S	S	R
10-1-6	S	S	R	R	S	S	S	R
12-2-2	S	S	R	R	S	S	S	R
21-VB-1	S	S	R	R	S	S	S	R
23-1-2	S	S	R	R	S	S	S	R
23-1-10	S	S	R	R	S	S	S	R
23-1-14	S	S	R	R	S	S	S	R

23-1-18	S	S	R	R	S	S	S	R
23-1-20	S	S	R	R	S	S	S	R
23-2-5	S	S	R	R	S	S	S	R
23-2-7	S	S	R	R	S	S	S	R
23-2-9	S	S	R	R	S	S	S	R
26-2-4	S	S	R	R	S	S	S	R
6-3-9	R	S	R	R	S	S	S	S
10-1-9	R	S	R	R	S	S	S	S
20-VB-1	R	S	R	R	S	S	S	S
12-2-1	R	S	R	R	S	S	R	R
13-1-3	S	S	S	S	S	S	R	R
23-1-4	S	S	S	S	S	S	R	R
23-1-6	S	S	S	S	S	S	R	R
23-1-9	S	S	S	S	S	S	R	R
13-1-8	S	R	S	R	S	S	S	R
16-2-1	S	S	R	S	S	S	S	S
24-1-1	S	S	R	S	S	S	S	S
26-2-1	S	S	R	S	S	S	S	S
30-VB-1	S	S	R	S	S	S	S	S
10-1-7	S	R	R	R	S	S	R	R
22-1-1	S	R	R	R	S	S	R	R
22-VB-1	S	S	S	R	S	S	R	R
23-1-1	S	S	R	R	S	S	S	S
23-1-7	S	S	R	R	S	S	S	S
23-1-12	S	S	R	R	S	S	S	S
25-VB-1	S	S	R	R	S	S	S	S
23-1-15	R	S	S	R	S	S	S	R
10-1-3	S	S	R	R	S	S	R	R
25-1-1	S	S	R	R	S	S	R	R
28-1-1	S	S	R	R	S	S	R	R
26-3-1	S	S	R	R	R	R	S	R

8-2-2	R	S	S	S	S	S	R	R
8-1-1	S	R	R	R	S	S	S	R
1-1-3	S	S	S	S	S	S	S	S
2-1-2	S	S	S	S	S	S	S	S
2-1-3	S	S	S	S	S	S	S	S
2-1-4	S	S	S	S	S	S	S	S
2-1-7	S	S	S	S	S	S	S	S
2-1-8	S	S	S	S	S	S	S	S
2-2-12	S	S	S	S	S	S	S	S
2-3-13	S	S	S	S	S	S	S	S
3-2-1	S	S	S	S	S	S	S	S
6-2-1	S	S	S	S	S	S	S	S
10-1-5	S	S	S	S	S	S	S	S
10-1-8	S	S	S	S	S	S	S	S
10-1-10	S	S	S	S	S	S	S	S
14-1-2	S	S	S	S	S	S	S	S
22-1-2	S	S	S	S	S	S	S	S
23-1-11	S	S	S	S	S	S	S	S
23-2-3	S	S	S	S	S	S	S	S
26-2-3	S	S	S	S	S	S	S	S
26-VB-1	S	S	S	S	S	S	S	S
30-2-1	S	S	S	S	S	S	S	S

En amarillo se resaltan las resistencias que las colonias han presentado durante el análisis. Las cepas coloreadas de morado fueron seleccionadas por su perfil de resistencia-susceptibilidad para detectar los genes de resistencia mediante PCR.

ANEXO 4. Resultados de los análisis de resistencia genotípica de las cepas seleccionadas de *E. coli* para Ampicilina y Tetraciclina.

nº de cepa	AMP 10	bla*			TE 30	tet	
		SHV (393)	TEM (247)	CMY-2 (1000)		A (502)	B (173)
1·1·1	R	-	+	-	S	-	-
2·1·1	R	-	+	-	S	+	-
6·3·6	R	-	+	-	S	-	-
1·2·6	S	-	-	-	R	+	-
2·2·10	S	-	+	-	R	+	-
6·3·7	S	-	-	-	R	+	-
13·1·5	S	-	+	-	R	+	-
16·1·1	S	-	-	-	R	+	-
19·VB·1	S	-	+	-	R	+	-
23·VB·1	S	-	-	-	R	+	-
1·2·5	S	-	+	-	S	+	-
2·2·11	S	-	-	-	S	+	-
4·1·1	S	-	-	-	S	+	-
7·1·1	S	-	-	-	S	+	-
10·1·2	S	-	-	-	S	+	-
13·1·4	S	-	-	-	S	-	-
14·1·1	S	-	+	-	S	-	+
23·2·6	S	-	-	-	S	-	-
26·2·5	S	-	-	-	S	-	-
5·1·1	R	-	+	-	R	+	-
23·1·5	R	-	+	-	R	+	-
6·2·4	R	-	+	-	R	-	+
10·1·1	R	-	+	-	R	+	-
12·2·2	R	-	+	-	R	-	+
21·VB·1	R	-	+	-	R	+	-
23·1·18	R	-	+	-	R	-	+
26·2·4	R	-	+	-	R	+	+
6·3·9	R	-	+	-	R	-	+
10·1·9	R	-	+	-	R	-	+

20·VB·1	R	-	+	-	R	+	-
12·2·1	R	-	+	-	R	-	+
13·1·3	S	-	-	-	S	-	-
13·1·8	S	-	+	-	R	+	-
16·2·1	R	-	+	-	S	-	-
24·1·1	R	-	+	-	S	+	-
26·2·1	R	-	+	-	S	-	-
30·VB·1	R	-	+	-	S	-	-
10·1·7	R	-	+	-	R	+	-
22·1·1	R	-	+	-	R	+	+
22·VB·1	S	-	-	+	R	+	-
25·VB·1	R	-	+	-	R	+	-
23·1·15	S	-	+	-	R	+	-
10·1·3	R	-	+	-	R	+	-
25·1·1	R	-	+	-	R	+	-
28·1·1	R	-	+	-	R	+	-
26·3·1	R	-	+	-	R	+	+
8·1·1	R	-	+	-	R	+	-
8·2·2	S	-	-	+	S	-	-
1·1·3	S	-	-	-	S	-	-
2·1·8	S	-	-	-	S	-	-
3·2·1	S	-	-	-	S	-	-
6·2·1	S	-	-	-	S	-	-
10·1·5	S	-	-	-	S	-	-
14·1·2	S	-	-	-	S	-	-
22·1·2	S	-	-	-	S	-	-
23·2·3	S	-	-	-	S	-	-
26·2·3	S	-	-	-	S	-	-
30·2·1	S	-	-	-	S	-	-

Los positivos indican que la cepa estudiada contenía dicho gen de resistencia.