



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS EN CAMPYLOBACTER TERMÓFILOS AISLADOS EN PRODUCCIÓN AVÍCOLA

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y LA CALIDAD ALIMENTARIA

ROSA LONJEDO BARCELÓ

ANA ISABEL JIMENEZ BELENGUER (TUTORA)

PABLO CATALÁ GREGORI (COTUTOR)

ALEJANDRO FENOLLAR PENADÉS (DIRECTOR EXPERIMENTAL)

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, 10 de julio de 2017

ESTUDIO DE LAS RESISTENCIAS ANTIMICROBIANAS EN CAMPILOBACTER TERMÓFILOS AISLADOS EN PRODUCCIÓN AVÍCOLA.

Rosa Lonjedo Barceló¹, Alejandro Fenollar Penedés¹, Pablo Catalá Gregori², Ana Isabel Jiménez Belenguer¹.

RESUMEN

La Campilobacteriosis es una enfermedad gastrointestinal causada por especies de *Campylobacter*. Su tratamiento requiere del uso de antimicrobianos en algunos casos concretos, por lo que las resistencias del microorganismo a dichos antimicrobianos suponen un problema epidemiológico y para la salud pública. Este estudio analiza las resistencias a ocho antimicrobianos de uso en clínica en unas cepas de *Campylobacter* aisladas en explotaciones avícolas de la Comunidad Valenciana en estudios anteriores. Dicho análisis se ha realizado tanto a nivel fenotípico, mediante la realización de antibiogramas, como a nivel molecular, mediante el análisis por PCR de genes frente β -lactámicos, tetraciclinas, eritromicina y quinolonas. La resistencia antimicrobiana ha resultado ser del 100%, encontrándose en todas las muestras resistencias a al menos uno de los antibióticos estudiados. El 80% de las cepas estudiadas han resultado ser multirresistentes, siendo el patrón más representativo CIP-NA (35,7%) para *C. coli* y para *C. jejuni* fueron AMC-AMP-CIP-NA-TE (27,5%) seguido de AMP-CIP-NA-TE (20%). El estudio molecular de los genes de resistencia mostró que el 80% de las cepas resultaron ser resistentes a más de una familia de antimicrobianos. El patrón más representado (33,3%) fue β -lactámicos-quinolonas-tetraciclinas.

RESUM

La campilobacteriosi es una malaltia gastrointestinal causada per espècies de *Campylobacter*. El seu tractament requereix de l'ús d'antimicrobians en alguns casos concrets, pel que les resistències del microorganisme a aquests antimicrobians suposa un problema epidemiològic i per a la salut pública. Aquest estudi analitza les resistències a vuit antimicrobians d'unes soques de *Campylobacter* aïllades en explotacions de la Comunitat Valenciana en estudis anteriors. Aquest anàlisi s'ha realitzat tant a nivell fenotípic, mitjançant la realització d'antibiogrames, com a nivell molecular, mitjançant l'anàlisi per PCR de gens front a β -lactàmics, tetraciclins, eritromicina i quinolones. La resistència antimicrobiana ha resultat ser del 100%, treballant-se en totes les mostres a almenys un dels antibiòtics estudiats. El 80% de les soques estudiades han resultat ser multirresistents, essent el patró més representatiu CIP-NA (35,7%) per a *C. coli* i per a *C. jejuni* van ser AMC-AMP-CIP-NA-TE (27,5%) seguit d'AMP-CIP-NA-TE (20%). L'estudi molecular dels gens de resistència, va mostrar que el 80% de les soques eren resistentes a més d'una família d'antimicrobians. El patró més representat (33,3%) va ser β -lactàmics-quinolones-tetraciclins.

ABSTRACT

Campylobacteriosis is a gastrointestinal disease caused by *Campylobacter* species. Its treatment requires the use of antimicrobials in some specific cases, so the resistance of the microorganism to antimicrobials is an epidemiological and public health hazard. This study analyzes the resistance to eight antimicrobials of *Campylobacter* strains isolated from farms in the Valencian Community in previous studies. This analysis was carried out both at the phenotypic level, through the performance of antibiograms, and at the molecular level, by PCR analysis of genes for β -lactamase, tetracycline, erythromycin and quinolones. Antibiotic resistance was 100%, showed in all samples resistance at least to one of the testing antibiotics. 80% of the strains were multiresistant, being the most representative pattern CIP-NA (35,7%) for *C. coli* and AMC-AMP-CIP-NA-TE (27,5%) for *C. jejuni* towards AMP-CIP-NA-TE (20%). Molecular study of the resistance genes showed that 80% of the strains showed to be resistant to more than one antimicrobial family. The most represented pattern (33.3%) was β -lactam-quinolones-tetracyclines.

¹Departamento de Biotecnología, Universitat Politècnica de Valencia

²Centro de Calidad Avícola y alimentación animal de la Comunidad Valenciana (CECAV)

PALABRAS CLAVE: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, resistencias a antimicrobianos, broilers, gallinas reproductoras.

INTRODUCCIÓN

La campilobacteriosis es una enfermedad gastrointestinal causada por varias especies del género *Campylobacter*, compuesto en la actualidad por 16 especies y 8 subespecies (Garrity et al., 2004) siendo las que ocasionan enfermedad con mayor frecuencia las especies termófilas, especialmente *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* (Sharp et al., 2016). Se trata de una zoonosis de origen alimentario que cada año se declara con mayor frecuencia, llegando a ser en la actualidad la enfermedad gastrointestinal más declarada. Según la EFSA y ECDC en Europa se declararon 229.213 casos en 2015, (EFSA, 2015). En España, se notificaron 9562 casos confirmados en 2015 (Sistema de información microbiológica, 2016).

Según un informe de la EFSA el coste de la campilobacteriosis para los sistemas de salud pública en la unión europea se ha estimado en unos 2,4 billones al año (EFSA, 2014).

El principal reservorio de esta bacteria son las aves, en especial las aves de corral, ya que *Campylobacter* forma parte de su microbiota intestinal, es por este motivo que la fuente de infección más común es por consumo de carne de ave de corral poco cocinada (EFSA, 2014), sin embargo también podemos encontrarlo en otros productos de origen animal, como leche cruda o inadecuadamente pasteurizada (Gölz et al., 2014), carne de cerdo, vacuno, comidas preparadas o por contaminación cruzada con alguno de estos elementos (EFSA, 2014). También deben considerarse otras fuentes de infección ambientales como el contacto con animales o el consumo de agua contaminada (Sharp et al., 2016).

El inicio de los síntomas de la enfermedad ocurre generalmente de 2 a 5 días después de la infección, pero puede extenderse de 1 a 10 días.

Los síntomas clínicos más comunes incluyen diarrea (con frecuencia sanguinolenta), dolor abdominal, fiebre, dolor de cabeza, náuseas y / o vómitos. Los síntomas suelen durar de 3 a 6 días.

La muerte por campilobacteriosis es rara y generalmente se limita a niños muy pequeños o pacientes ancianos, así como a aquellas personas que ya sufren de otra enfermedad grave, especialmente personas inmunocomprometidas.

Se han registrado complicaciones como bacteriemia, meningitis, hepatitis, pancreatitis, aborto espontáneo, osteomielitis e infección urinaria con varios grados de frecuencia. Las secuelas posteriores a la infección pueden incluir artritis reactiva y trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré, una forma de parálisis similar a la poliomielitis que puede resultar en disfunción neurológica respiratoria y grave en un pequeño número de casos o el síndrome de Miller-Fisher. También se ha relacionado con el linfoma MALT del intestino delgado (Mensa et al., 2014; WHO, 2011).

Por norma general el tratamiento de esta enfermedad en humanos se basa en una terapia de rehidratación, pero en algunas ocasiones, como en casos invasivos o cuando se quiere eliminar el estado de portador, es necesario el uso de antimicrobianos para poder hacerle frente. (WHO, 2011)

Desde la ECDC subrayan la grave amenaza que representa para la salud pública y animal el aumento de cepas bacterianas resistentes a los varios grupos antimicrobianos en toda Europa, esto provoca un aumento en los costos de atención médica y el fracaso en el tratamiento de los pacientes. En su informe en 2009, estimaron que las infecciones causadas por bacterias resistentes son responsables de alrededor de 25 000 muertes anuales en Europa. Además de estas muertes evitables, los costes sanitarios y las pérdidas de productividad se han estimado en al menos 1.500 millones de euros (ECDC, 2017).

Los principales factores que determinan la aparición y propagación de los microorganismos resistentes a antimicrobianos son el uso de agentes antimicrobianos (que ejerce presión ecológica sobre las bacterias y contribuye a la aparición y selección de las cepas resistentes) y la transmisión de microorganismos resistentes (favorecido por malas prácticas de prevención y control de infecciones e inadecuadas condiciones sanitarias). Esta transmisión puede darse tanto entre seres humanos como entre animales y entre animales y seres humanos (ECDC, 2017).

En el caso concreto de *Campylobacter* en humanos, se observan unos niveles de resistencia a ciprofloxacino extremadamente altos en casi todo el territorio europeo, también son elevados los niveles de resistencias a tetraciclinas y ácido nalidíxico, mientras que la resistencia a eritromicina es de moderada a baja (EFSA/ECDC, 2017).

En el caso de los animales de producción los datos obtenidos muestran unos niveles globales de resistencia a la estreptomina, tetraciclinas, ácido nalidíxico y ciprofloxacino de altos a extremadamente altos. Los niveles de resistencia a la eritromicina son altamente variables y los de gentamicina son bajos o ausentes (EFSA/ECDC, 2017).

Es por todo ello que consideramos importante el estudio de las resistencias a antimicrobianos de *Campylobacter* en los animales de producción, así como su homogeneidad en la población, ya que son estas cepas las que pueden transmitirse al hombre produciendo enfermedad, o expandirse horizontalmente transfiriendo estas resistencias a otros microorganismos.

El objetivo de este estudio es obtener los perfiles de resistencias a antimicrobianos de importancia en clínica, así como el estudio molecular de la presencia de genes de resistencia a antibióticos, en cepas de *Campylobacter* obtenidas de explotaciones de producción avícola en estudios anteriores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las muestras.

Las muestras de *Campylobacter* utilizadas para el presente estudio se obtuvieron de un muestreo realizado de enero de 2012 a agosto de 2013 en el seno de un estudio sobre el ciclo de producción avícola en la región de Valencia, realizado por la Universidad CEU Cardenal Herrera, en el cual se recogieron muestras de heces de aves reproductoras y de su descendencia,

desde el momento antes de llevarlos a las explotaciones de engorde (1 día), hasta su sacrificio (Ingresa-Capaccioni et al., 2015).

De dicho muestreo, se seleccionaron 4 lotes de reproductoras, y 3 lotes de su descendencia por lote de reproductoras. Se tomaron 5 cepas de cada uno de los lotes. Por tanto se obtuvo un total de 80 cepas para la realización del presente estudio.

Cepas de estudio.

Las cepas aisladas de dicho estudio se hallaban congeladas a -80°C en el Centro de Calidad Avícola y Alimentación Animal de la Comunidad Valenciana (CECAV), donde se realizó la descongelación y revivificación de las mismas.

Una vez descongeladas las cepas de campilobacterias, se efectuaron un mínimo de dos pases en Agar Sangre Columbia (Oxoid Ltd., England, UK) con el fin de obtener cultivo puro y en óptimas condiciones fisiológicas. En la realización de estos pases se comprobó mediante la observación de la movilidad en microscopio de campo oscuro, que se trataba efectivamente de cepas de *Campylobacter* spp.

Las placas se incubaron a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $44\pm 4\text{h}$ en atmósfera micro-aeróbica (84% N_2 , 10% CO_2 y 6% O_2) (CampyGen, Oxoid Ltd., England, UK).

Estudio de la resistencia a antimicrobianos.

La determinación de las resistencias antimicrobianas se efectuó mediante el método de difusión de disco en placa en medio Müller-Hinton Agar (Muller-Hinton Broth, Scharlau, Barcelona, Spain;) enriquecidas con sangre defibrinada de caballo (Oxoid Ltd., England, UK).

Se realizó un inóculo de cada cepa en una solución salina al 0,9% (Scharlau, Barcelona Spain) y se ajustó a una concentración 2 en la escala de McFarland, ya que se observó muy poco crecimiento a la concentración recomendada por EUCAST y CLSI de 0,5 McFarland. Las condiciones de incubación también se ajustaron a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 ± 4 horas, al tratarse de *Campylobacter* termófilos. Se incubaron en atmósfera micro-aeróbica (84% N_2 , 10% CO_2 y 6% O_2) (CampyGen, Oxoid Ltd., England, UK).

Se testó un panel de ocho antimicrobianos pertenecientes a cinco familias de antimicrobianos de uso habitual en clínica para el tratamiento de la Campilobacteriosis (Mensa et al., 2014; EFSA/ECDC, 2017). Estos fueron: Ácido nalidíxico (NA, 30 μg), Amoxicilina-Ácido clavulánico (AMC, 3 μg), Ampicilina (AMP, 10 μg), Ciprofloxacino (CIP, 5 μg), Eritromicina (E, 15 μg), Estreptomina (S, 10 μg), Gentamicina (CN 10 μg) y Tetraciclina (TE, 30 μg) (OXOID antimicrobial susceptibility testing disc dispenser; Antimicrobial Susceptibility Test Disc, OXOID Ltd., England, UK)

La medición de los halos se realizó según las recomendaciones de EUCAST, quitando la tapa, realizando la medición por el frontal de la placa con una regla milimetrada y con la luz adecuada.

La interpretación de los resultados se realizó siguiendo las directrices de EUCAST (ECDC, 2016).

Extracción del ADN.

Parte del cultivo puro obtenido tras la revivificación se congeló a -20°C en medio Tris-EDTA, para la posterior extracción del ADN.

La extracción se realizó mediante el Kit GenElute™ Bacterial Genomic (Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras se mantuvieron posteriormente conservadas a -20°C hasta la realización de la PCR.

Confirmación de género y especie mediante PCR.

Dado que en el estudio previo la confirmación de la especie se había realizado exclusivamente mediante la prueba del hipurato, se consideró conveniente realizar la confirmación molecular.

Todas las muestras se analizaron para determinar, a nivel molecular, la pertenencia al género *Campylobacter*, así como la especie a la que pertenecían: *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, u otra especie de *Campylobacter* diferente de estas dos.

Para ello se realizó una PCR multiplex con los primers dirigidos a los siguientes loci: una parte del gen aspartokinasa (asp) característico de *C. coli* (Linton et al, 1997), el gen hipuricasa (hipO) característico de *C. jejuni*, y una secuencia universal 16S rDNA común a todas las especies de *Campylobacter* (Persson et al., 2005). Las secuencias de los primers se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Listado de primers, secuencias y tamaño del producto en PCR de identificación.

Primer	Secuencia	producto	Referencias
asp	CC18F 5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG CC519R 5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG	500 pb	Linton et al. (1997)
hipO	F 5'-GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT R 5'-GCTATAACTATCCGAAGAAGCCATCA	344 pb	Persson et al. (2005)
16S	Campy F 5'-GGAGGCAGCAGTAGGGAATA Campy R 5'-TGACGGGCGGTGAGTACAAG	1062 pb	Persson et al. (2005)

La PCR se realizó en un volumen de reacción total de 25 μl (22,5 μl de mix y 2,5 μl de DNA). Las concentraciones de los reactivos utilizados para hacer el mix fueron: 10x NH_4 tampón de reacción, 1,5 mM MgCl_2 , 0,5 mM de cada uno de los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP) y 0,05 U Taq Polimerasa. Las concentraciones de primers utilizadas fueron 0,4 μM de los primers asp CC18F y CC519R, 0,2 μM de los primers hipO-F e hipO-R y 0,05 μM de los primers 16S-F y 16S-R (Persson et al., 2005).

La reacción se llevó a cabo en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) en las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 94°C durante 6 min, seguido de 35 ciclos de 94° durante

50 s, 57°C durante 40 s y 72° durante 50 s, y finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 3 minutos.

Se incluyó un control negativo en el que se utilizó agua mQ estéril en el lugar del ADN y un control positivo tanto para *Campylobacter coli* como para *Campylobacter jejuni*, para lo que se utilizaron las cepas DSM-4689 y DSM-4688 respectivamente.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (agarosa, Pronadisa) en tampón TAE 1x con RedSafe (iNtRON biotechnology) al 5% para poder visualizar el ADN. Los geles se dejaron correr en una cubeta de electroforesis a 100V durante 60 min y se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV.

El tamaño de los productos se confirmó mediante comparación con el marcador molecular GenRuler 100-bp DNA Ladder.

DetECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.

Se detectaron los genes de resistencia frente β -lactámicos, tetraciclinas, eritromicina y quinolonas, mediante cuatro PCR diferentes.

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA FRENTE A β -LACTÁMICOS.

Los genes β -lactamasa analizados fueron *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CMY-2}. Los primers y condiciones utilizados para ello son los descritos por Kozak et al. (2009); los primers y tamaño del producto obtenido se especifican en la Tabla 2.

La PCR se realizó de igual modo a la anteriormente descrita, con un volumen de reacción de 25 μ l, con las mismas concentraciones de reactivos. En este caso, las concentraciones de primers utilizadas fueron 0,2 μ M de los primers TEM, 0,4 μ M de los primers SHV y 0,2 μ M de los primers CMY.

La reacción se realizó en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) en las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización de 5 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 min a 55°C y un minuto a 72°C y finalmente un ciclo extensión de 10 minutos a 72°C (Kozak et al., 2009).

TABLA 2. Listado de primers, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de genes de resistencia frente a β -lactámicos.

Primer	Secuencia	producto	Referencias
GKTEM	F TTAAGTGGCGAACTACTTAC R GTCTATTTGTTTCATCCATA	247 pb	Kozak et al. (2009)
SHV	F AGGATTGACTGCCTTTTTG R ATTTGCTGATTTGCTCG	393 pb	Colom et al. (2003)
CMY	F GACAGCCTCTTTCTCCACA R TGGACACGAAGGCTACGTA	1000 pb	Kozak et al. (2009)

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA FRENTE A TETRACICLINAS.

Los genes analizados fueron TET(A), TET(B) y TET(C). Los primers y condiciones utilizados se especifican en la Tabla 3.

La PCR se realizó con las mismas concentraciones de reactivos que las anteriores, en este caso las concentraciones de los primers fueron 0,1 μM de TET(A), 0,2 μM de TET (B) y 0,5 μM de TET(C).

La reacción se realizó en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) en las siguientes condiciones: Un ciclo de desnaturalización de 15 min a 94°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 63°C y 1 min a 72°C, finalmente un ciclo de extensión de 10 min a 72°C (Kozak et al., 2009).

TABLA 3. Listado de primers, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de genes de resistencia frente a tetraciclinas.

Primer	Secuencia	producto	Referencias
TET(A)	L GGCGGTCTTCTTCATCATGC R CGGCAGGCAGAGCAAGTAGA	502 pb	Lanz et al. (2003)
TET(B)	F CGCCCAGTGCTGTTGTTGTC R CGCGTTGAGAAGCTGAGGTG	173 pb	Goswami et al. (2008)
TET(C)	L GCTGTAGGCATAGGCTTGTT R GCCGGAAGCGAGAAGAATCA	888 pb	Lanz et al. (2003)

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA FRENTE A ERITROMICINA.

En este caso se analizó un único gen (ermB), siguiendo las indicaciones descritas por Chen et al. (2007). Los primers utilizados están descritos en la tabla 4, así como el tamaño del producto resultante.

La reacción se realizó en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) y las condiciones fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización de 3 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C, 20 s a 58°C y 1 min a 72°C, finalmente un ciclo de extensión de 1 min a 72°C.

TABLA 4. Listado de primers, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de genes de resistencia frente a eritromicina.

Primer	Secuencia	Producto	Referencias
Erm(B)-2	F GAT ACC GTT TAC GAA ATT GG R GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC	364 pb	Chen et al. (2007)

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA FRENTE A QUINOLONAS.

Para el análisis de resistencias frente a las quinolonas se valoró un único gen (qnrS) descrito por Marti, & Balcázar (2013). Las secuencias del primer utilizado y el tamaño del producto están descritos en la tabla 5.

La PCR se realizó en un termociclador modelo PTC-100 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) en las siguientes condiciones: Un primer ciclo de desnaturalización de 3 min a 95°, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°, 20 s a 62°C y 1 min a 72°C, y finalmente un ciclo de extensión de 1 min a 72°C.

TABLA 5. Listado de primers, secuencias y tamaño del producto en PCR de detección de genes de resistencia frente a quinolonas.

Primer	Secuencia	Producto	Referencias
qnrS	F GACGTGCTAACTTGCGTGAT R TGGCATTGTTGGAACTTG	120 pb	Marti & Balcázar (2013).

En todas las PCR descritas se incluyó un control negativo en el que se utilizó agua mQ estéril en el lugar del ADN y como control positivo ADN de cepas del laboratorio que ya habían dado positivo en dichas PCR previamente.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,2% (agarosa, Pronadisa) en tampón TAE 1x con RedSafe (iNtRON biotechnology) al 5% para poder visualizar el ADN. Los geles se dejaron correr en una cubeta de electroforesis a 100V durante 60 min y se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat (09 200272) con luz UV.

El tamaño de los productos se confirmó mediante comparación con el marcador molecular GenRuler 100-bp DNA Ladder.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cepas de estudio.

De las 80 cepas seleccionadas para la realización del estudio, 15 tuvieron que ser descartadas o bien porque no estaban disponibles o por que fue imposible su revivificación. Al final del proceso de revivificación se disponía de 65 cepas en condiciones óptimas para su análisis.

Estudio de la resistencia a antimicrobianos.

En los resultados obtenidos todas las cepas mostraron resistencia al menos a uno de los antimicrobianos testados, hecho que concuerda con los estudios de seguimiento realizados por la ECDC, que sitúan a España como el primer país, en el caso de *C. coli*, con menor porcentaje de cepas totalmente sensibles (un 0%) y el segundo país, en el caso de *C. jejuni* (EFSA/ECDC, 2016).

Como puede verse en la figura 1, se obtuvieron niveles extremadamente altos de resistencia a las quinolonas, un 95% y un 91,67% de las cepas estudiadas mostraron resistencias frente al ciprofloxacino y al ácido nalidixico respectivamente. También se observaron unos niveles elevados de resistencia (63,3%) frente a las tetracicinas. En el caso de los β -lactámicos,

se aprecian unos niveles más elevados en el caso de la ampicilina (61,7%), que para la combinación amoxicilina-ácido clavulánico (31,67%), pero debe notarse el elevado porcentaje de estas cepas que presentaron resistencia intermedia, considerando esto solo un 25% y un 18% de las cepas estudiadas fueron realmente sensibles a la ampicilina y amoxicilina-ácido clavulánico, respectivamente. Para los macrólidos y aminoglucósidos, se han observado unos niveles de resistencia más bajos en estas cepas. Para realizar la comparación con otros estudios se ha considerado conveniente separar los resultados según las especie.

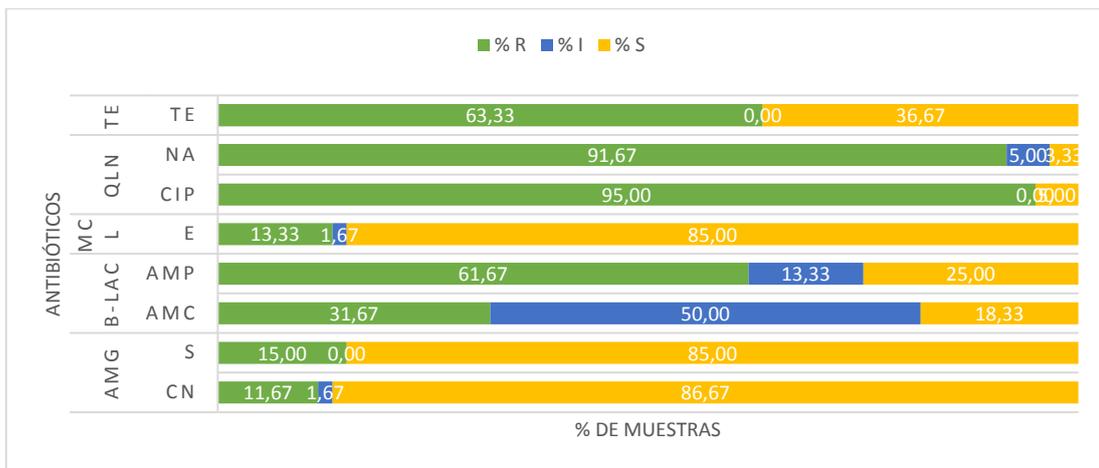


FIGURA 1. Gráfica de resistencias antimicrobianas de todas las cepas evaluadas, donde se observa el porcentaje de muestras resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (S) para los 8 antimicrobianos evaluados. AMG (aminoglucósidos): CN (gentamicina), S (estreptomicina); B-LAC (β -lactámicos): AMC (amoxicilina-ácido clavulánico), AMP (ampicilina); MCL (macrólidos): E (eritromicina); QNL (quinolonas): CIP (ciprofloxacino), NA (ácido nalidíxico); TE (tetraciclinas).

Si separamos los valores obtenidos según la especie (figuras 2 y 3), podemos observar que ambas especies presentan niveles de resistencia muy elevados frente a las quinolonas (85-95%) y moderadamente elevados (57-60%) frente a las tetraciclinas, estos resultados coinciden con los registrados en España en 2014 para ambas especies en lo que respecta a las quinolonas y son algo más bajos en el caso de las tetraciclinas, situándose más cerca de la media europea, que se situaba ese año en un 54% para *C. jejuni* y un 59% para *C. coli* (EFSA/ECDC, 2016). En cuanto a las resistencias frente a los β -lactámicos, se apreciaron niveles muy superiores en *C. jejuni* que en *C. coli*, especialmente en el caso de la ampicilina. En estudios recientes se ha encontrado ratios mayores de resistencia a ampicilina en *C. coli* (Bardoñ et al., 2011). Otra diferencia evidente entre las dos especies la encontramos en relación a los aminoglucósidos y macrólidos, ya que el 100% de las cepas de *C. jejuni* estudiadas, son sensibles a estos antibióticos, no siendo así para *C. coli* que presenta, aunque bajo, cierto nivel de resistencia. Estos datos coinciden con los obtenidos por la ECDC en España en 2014, en los que se refleja una sensibilidad del 100% para gentamicina y eritromicina y un nivel muy bajo de resistencia (3%) para la estreptomicina en *C. jejuni*, y niveles más

elevados de resistencias en el caso de *C. coli* aunque para esta especie, los valores obtenidos en nuestro estudio son más similares a la media europea que a los niveles de resistencia de España de ese año (EFSA/ECDC, 2016). En la figura 4 se han agrupado los resultados de aquellas cepas que, como se explicará más adelante en el apartado de confirmación de género y especie mediante PCR, han resultado ser especies distintas a *C. jejuni* y *C. coli*. Estas cepas, han mostrado unos niveles de resistencias extremadamente altos para todos los antimicrobianos evaluados, llegando al 100% en la mayoría de los casos, exceptuando la combinación amoxicilina-ácido clavulánico, para la que todas estas cepas han mostrado una resistencia intermedia. Por la temperatura de incubación a la que se ha sometido estas cepas la sospecha es que se trate de otros *Campylobacter* termófilos, como son *C. lari* o *C. upsaliensis*, pero los estudios sobre resistencias encontrados sobre estas especies no coinciden con los resultados de nuestro estudio (Jaime et al., 2002, Moore et al., 2006)

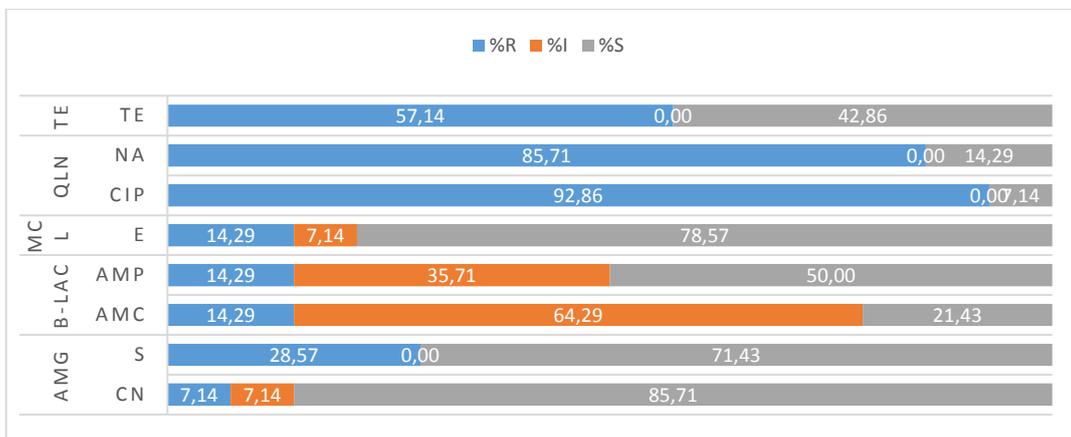


FIGURA 2. Gráfica de resistencias antimicrobianas, donde se observa el porcentaje de muestras de *C. coli* resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (S) para los 8 antimicrobianos evaluados. AMG (aminoglucósidos): CN (gentamicina), S (estreptomocina); B-LAC (β -lactámicos): AMC (amoxicilina-ácido clavulánico), AMP (ampicilina); MCL (macrólidos): E (eritromicina); QNL (quinolonas): CIP (ciprofloxacino), NA (ácido nalidíxico); TE (tetraciclinas).

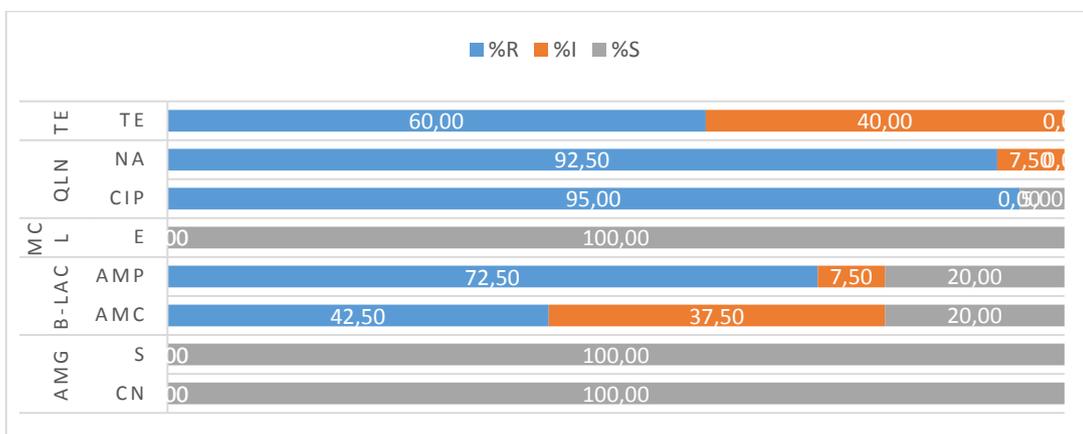


FIGURA 3. Gráfica de resistencias a antimicrobianos, donde se observa el porcentaje de muestras de *C. jejuni* resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (S) para los 8 antimicrobianos evaluados. AMG (aminoglucósidos): CN (gentamicina), S (estreptomomicina); B-LAC (β -lactámicos): AMC (amoxicilina-ácido clavulánico), AMP (ampicilina); MCL (macrólidos): E (eritromicina); QNL (quinolonas): CIP (ciprofloxacino), NA (ácido nalidíxico); TE (tetraciclinas).



FIGURA 4. Gráfica de resistencias a antimicrobianos, donde se observa el porcentaje de muestras de *Campylobacter spp* resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (S) para los 8 antimicrobianos evaluados. AMG (aminoglucósidos): CN (gentamicina), S (estreptomomicina); B-LAC (β -lactámicos): AMC (amoxicilina-ácido clavulánico), AMP (ampicilina); MCL (macrólidos): E (eritromicina); QNL (quinolonas): CIP (ciprofloxacino), NA (ácido nalidíxico); TE (tetraciclinas).

Se ha intentado observar si existe alguna semejanza entre los perfiles de resistencias de las reproductoras, con los perfiles obtenidos de su descendencia (figura 5). Como se observa, dependiendo del antimicrobiano que se considere, se aprecian más o menos diferencias entre madres e hijos. Se observa que según el lote de reproductoras las resistencias que se encuentran en los distintos lotes de broilers son muy parejas. De todos modos sería necesario un análisis estadístico para saber si estas diferencias son o no significativas, no parece que este sea un buen método para valorar la posible transmisión vertical de *Campylobacter* de madre a hijos, ya que como se podrá observar más adelante, estas resistencias pueden ser el resultado de un gran variedad de genes, y su expresión fenotípica depende de otros muchos factores.

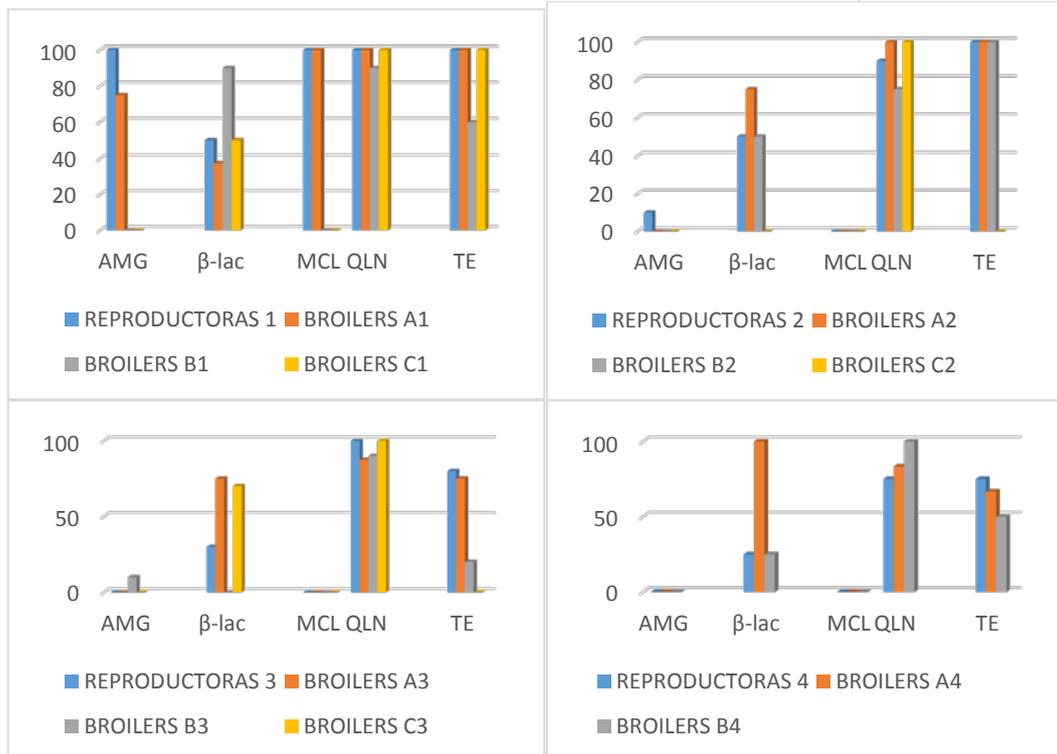


FIGURA 5. Gráficos en los que se observan los porcentajes de cepas que han resultado resistentes para cada uno de los antimicrobianos evaluados, agrupando cada lote de reproductoras con los tres lotes de su descendencia (solo dos en el último caso).

En la tabla 6 pueden observarse los patrones de resistencia a antimicrobianos separados según la especie. Se observaron 19 patrones diferentes, podemos observar que para el caso de *C. coli* el patrón más representado fueron CIP-NA (35,7%) y los más presentados por *C. jejuni* fueron AMC-AMP-CIP-NA-TE (27,5%) seguido de AMP-CIP-NA-TE (20%).

Seis de las muestras que no se pudieron identificar como *C. coli*, ni *C. jejuni* mostraron resistencias a todos los antimicrobianos testados menos para la combinación amoxicilina-ácido clavulánico, para la que mostraron resistencia intermedia.

TABLA 6. Patrones de resistencia a antimicrobianos por especie de *Campylobacter* estudiada.

Nº muestras	Patrones								
	Aminoglucósidos		B-lactámicos		Macrólidos	Quinolonas		Tetraciclinas	
<i>Campylobacter coli</i>	1	CN	S		AMP	E	CIP	NA	TE
	1		S			E	CIP	NA	TE
	2						CIP	NA	TE
	1		S	AMC			CIP	NA	TE
	1						CIP		TE
	5						CIP	NA	
	1		S				CIP	NA	TE
	1			AMC	AMP		CIP	NA	
	1								TE
<i>Campylobacter jejuni</i>	11			AMC	AMP		CIP	NA	TE
	3			AMC	AMP		CIP	NA	
	8				AMP		CIP	NA	TE
	2			AMC	AMP		CIP		
	1				AMP		CIP		TE
	4						CIP	NA	TE
	1			AMC			CIP	NA	
	1				AMP			NA	
	5						CIP	NA	
	1							NA	
	3				AMP		CIP	NA	
<i>C. spp</i>	5	CN	S		AMP	E	CIP	NA	TE
	1	CN			AMP	E	CIP	NA	TE

Con respecto a los patrones de multirresistencia, se han considerado multirresistentes aquellas cepas que presentaron resistencia a más de una familia o grupo antimicrobiano, teniendo este hecho relevancia clínica (suponiendo una dificultad para el tratamiento) y epidemiológica (existe posibilidad de transmisión de dicha resistencia) (López Pueyo et al., 2010, EFSA/ECDC, 2016). Se han considerado resistentes a una familia de antimicrobianos aquellas cepas que presentaban resistencia al menos a uno de los compuestos incluidos en cada grupo.

En la tabla 7 puede observarse que el 80% de las cepas son resistentes a más de una familia de antimicrobianos. El patrón más representado (33,3%) es el que muestra resistencia para β -lactámicos-quinolonas-tetraciclinas, seguido por β -lactámicos-quinolonas (18%) y por un 11,6% que son resistentes a todos los grupos antimicrobianos evaluados.

Separando las cepas según su especie se observa que en el caso *C. coli*, presentaron multirresistencia un 57% de las cepas, siendo el patrón más

habitual (37,5%) de quinolonas-tetraciclinas. Estos datos contrastan con los últimos estudios de la ECDC en broilers en los que registran para España un 33,3% de cepas multirresistentes para *C. coli*, siendo ésta la más alta notificada de todos los estados miembros, el patrón más habitual en ese caso, fue quinolona-eritromicina-tetraciclina en un 26,7% de las cepas estudiadas.

En el caso de *C. jejuni*, en el presente estudio presentaron multirresistencia un 85% de las cepas, en este caso el patrón más representado (58,8%) fue β -lactámicos-quinolonas-tetraciclinas. Este valor es mucho más elevado que los registrados por la ECDC, con valores de media mucho más bajos.

Las cepas identificadas como no-*C. coli* o no-*C. jejuni*, resultaron ser resistentes a todos los grupos antimicrobianos evaluados.

TABLA 7. Tabla de multirresistencias obtenidas por especie de *Campylobacter*.

Nº muestras		Patrones				
<i>Campylobacter coli</i>	1	Aminoglucósidos	B-lactámicos	Macrólidos	Quinolonas	Tetraciclinas
	1	Aminoglucósidos	B-lactámicos		Quinolonas	Tetraciclinas
	1	Aminoglucósidos		Macrólidos	Quinolonas	Tetraciclinas
	3				Quinolonas	Tetraciclinas
	1	Aminoglucósidos			Quinolonas	Tetraciclinas
<i>C. jejuni</i>	1		B-lactámicos		Quinolonas	
	20		B-lactámicos		Quinolonas	Tetraciclinas
	10		B-lactámicos		Quinolonas	
<i>C. spp</i>	4				Quinolonas	Tetraciclinas
	6	Aminoglucósidos	B-lactámicos	Macrólidos	Quinolonas	Tetraciclinas

Confirmación de género y especie mediante PCR.

En el 100% de las muestras analizadas se ha observado la banda de 1062 pb correspondiente a la secuencia universal 16S rDNA común a todas las especies de *Campylobacter*, lo que indica que todas pertenecen a dicho género.

Seis de las 65 muestras analizadas (9,3%), mostraron únicamente la banda de 1062 pb, lo que indica que pertenecen al género *Campylobacter* pero a ninguna de las dos especies evaluadas (*Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni*). Considerando las condiciones de incubación a las que se han sometido para su revivificación, cabría pensar que pueden tratarse de otros *Campylobacter* termófilos como son *C. upsaliensis* o *C. lari*. No pudiéndose confirmar dicha hipótesis sin estudios moleculares específicos. Es raro encontrar *C. lari* en explotaciones avícolas, siendo más habitual encontrarlo en aves silvestres (Adzitey et al., 2012).

Asimismo, otras cinco muestras (7,7%) mostraron la banda correspondiente al género, y las dos bandas correspondientes a los genes asp e hipO, pertenecientes a las especies *Campylobacter coli* y *Campylobacter jejuni* respectivamente, lo que indica que coexistían ambas especies, bien por una contaminación o porque en el cultivo de origen se encontraban las dos. Estas muestras se excluyeron a la hora del cálculo de resultados.

De las cepas restantes, 14 han resultado ser *Campylobacter coli* (21,5%) y 40 de ellas *Campylobacter jejuni* (61,5%).

En comparación con los resultados obtenidos en el estudio de origen de las cepas, se observa que la prueba del hipurato ha tenido una elevada sensibilidad, ya que aquellos resultados positivos para la prueba han resultado ser realmente *Campylobacter jejuni* en un 98% de los casos. La especificidad de esta prueba, en cambio, se muestra algo más baja, ya que solo un 70% de los negativos para esta prueba, han resultado ser verdaderamente *Campylobacter coli*. Destacar además, que dicha prueba no nos permite distinguir los casos en que no se trata de ninguna de estas dos especies, o aquellos casos en el que el cultivo no es puro y se encuentran las dos. Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en los que se comparan los resultados de la prueba bioquímica con los de la PCR de identificación (Rautelin, 1999).

DetECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.

Los resultados obtenidos en las distintas PCR para la detección de genes de resistencia son los mostrados en la tabla 8. En ella puede observarse que un reducido número de muestras dieron resultados positivos para los genes estudiados.

TABLA 8. Genes de resistencia

Grupo antimicrobiano	Nº muestras	gen
B lactámicos	8	TEM
	1	CMY
Tetraciclinas	3	TET(C)
Eritromicina	2	ermB
Quinolonas	17	qnrS

Para los genes TEM, todos los positivos se concentran en uno de los lotes de reproductoras y uno de los grupos de broilers de su descendencia. Los 3 casos de TET(C) se agrupan en un lote de broilers. Los dos positivos para ermB también pertenecen al mismo lote de broilers. Los positivos de qnrS, en cambio, se encuentran uniformemente repartidos entre todos los lotes tanto de reproductoras como de broilers.

Los genes de resistencia a antibióticos estudiados se han detectado en un número reducido de cepas, siendo el gen que se ha detectado con mayor frecuencia ha sido qnrS (28%) relacionado con la resistencia a las quinolonas, a pesar de que en los antibiogramas se ha detectado en más de un 90% de los casos. Esta diferencia puede ser atribuible a que la expresión fenotípica de la resistencia a un antimicrobiano no depende únicamente de un gen, probablemente el resto de las cepas resistentes responden a genes distintos al que hemos buscado en nuestra PCR como podrían ser qnrA, qnrB o muchos otros (Marti & Balcázar, 2013; Calvo et al., 2011).

Como puede observarse no existe coincidencia entre la detección de los genes de resistencia con la manifestación fenotípica de dicha resistencia, todas las cepas mostraron resultados en los antibiogramas que no se han visto respaldados por el resultado del análisis molecular. Esto puede ser debido a que dichas resistencias no dependen de un solo gen, sino que pueden haber varios genes implicados (Calvo et al., 2011). Esto nos lleva a la necesidad de utilizar ambos métodos de estudio para poder obtener una información más completa y así poder ofrecer una visión global sobre la presencia de resistencias antibióticas sobre campilobacterias.

CONCLUSIONES.

La prevalencia de resistencia antimicrobiana en aves de producción de las explotaciones estudiadas ha resultado del 100% encontrándose en todas las muestras resistencias a al menos uno de los antibióticos estudiados.

El grupo antimicrobiano que mayor porcentaje de resistencia ha mostrado han sido las quinolonas con más de un 90% de las cepas resistentes, seguido de las tetraciclinas con un 65%, siendo el 11,6% de las cepas resistentes a todos los grupos antimicrobianos evaluados.

El 80% de las cepas estudiadas han resultado ser multirresistentes, es decir, resistentes a más de un grupo o familia de antimicrobianos, siendo los patrones de resistencias más representados β -lactámicos-quinolonas-tetraciclinas, antimicrobianos comúnmente usados en clínica para el tratamiento de personas con campilobacteriosis, esto dificulta enormemente el tratamiento de la enfermedad y supone un riesgo desde el punto de vista epidemiológico por la posible transmisión horizontal de estas resistencias.

En los niveles de resistencias obtenidos de los lotes de broilers con respecto a sus madres se observan algunas diferencias observándose similares resistencias antibióticas entre lotes de reproductoras y broilers, sobretodo en quinolonas y tetraciclinas. Sin embargo, las diferencias observadas entre los genes de resistencia presentes y la expresión fenotípica de dichas resistencias hace difícil pensar que esta comparación pueda ser utilizada como indicativo de una posible transmisión del microorganismo de madres a hijos.

La identificación molecular basada en 16s rDNA y los primers asp para *C.coli* e hipO para *C. jejuni* ha resultado ser más específica y sensible que la identificación basada en la prueba bioquímica del hipurato, permitiendo discriminar ambas especies estudiadas, con una tasa baja en cepas no clasificables (9,3%) y además, ofrece la posibilidad de identificar cultivos en los que se encuentra más de una especie, que podrían alterar los resultados obtenidos.

No se ha encontrado similitud entre los genes de resistencia estudiados y el resultado de los antibiogramas, esto puede ser debido a que, en la mayoría de los casos, la expresión fenotípica de una resistencia no depende únicamente de un gen, por lo que es necesario el estudio combinado de ambos métodos, fenotípico y molecular, para establecer el nivel de resistencia

a antimicrobianos en campilobacterias así como la búsqueda de otros genes que estén relacionados.

REFERENCIAS

- Adzitey, F., Rusul, G., Huda, N., Cogan, T., & Corry, J. (2012). Prevalence, antibiotic resistance and RAPD typing of *Campylobacter* species isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *International journal of food microbiology*, 154(3), 197-205.
- Bardoň, J., Kolář, M., Karpíšková, R., & Hricová, K. (2011). Prevalence of thermotolerant *Campylobacter* spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. *Food Control*, 22(2), 328-332.
- Calvo, J., Cantón, R., Fernández, F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos. *Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38.
- Chen, J., Yu, Z., Michel, F. C., Wittum, T., & Morrison, M. (2007). Development and application of real-time PCR assays for quantification of *erm* genes conferring resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B in livestock manure and manure management systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4407-4416.
- Colom, K., Pérez, J., Alonso, R., Fernández-Aranguiz, A., Lariño, E., & Cisterna, R. (2003). Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of *bla* TEM, *bla* SHV and *bla* OXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS microbiology letters*, 223(2), 147-151
- European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. *Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. Stockholm: ECDC; 2017.
- European Centre for Disease Prevention and Control. *EU protocol for harmonised monitoring of antimicrobial resistance in human Salmonella and Campylobacter isolates*. June 2016. Stockholm: ECDC; 2016.
- European Food Safety Authority. 2014. "EFSA explains zoonotic diseases. *Campylobacter*." [en línea]. Dirección URL: <www.efsa.europa.eu>. [Consulta 10 de Junio 2017]
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;13(12):4329
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2016;14(12):4634, 231
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2016. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal* 2016;14(2):4380
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal* 2017;15(2):4694
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes.

Bergey's manual of systematic bacteriology. *Springer, New York, Berlin, Heidelberg.*

- Gölz, G., Rosner, B., Hofreuter, D., Josenhans, C., Kreienbrock, L., Löwenstein, A., & Alter, T. (2014). Relevance of *Campylobacter* to public health—the need for a One Health approach. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(7), 817-823.
- Goswami, P. S., Gyles, C. L., Friendship, R. M., Poppe, C., Kozak, G. K., & Boerlin, P. (2008). Effect of plasmid pTENT2 on severity of porcine post-weaning diarrhoea induced by an O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, 131(3), 400-405.
- Jaime, A. L., Joan, S., Lee, B., Nancy, S., Sydney, M. H., Eleanor, L., ... & Laurene, M. (2002). *Campylobacter upsaliensis*: another pathogen for consideration in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 34(11), e59-e60.
- Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., & Jardine, C. (2009). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada. *Applied and environmental microbiology*, 75(3), 559-566.
- Lanz, R., Kuhnert, P., & Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*, 91(1), 73-84.
- López-Pueyo, M. J., Barcenilla-Gaite, F., Amaya-Villar, R., & Garnacho-Montero, J. (2011). Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. *Medicina Intensiva*, 35(1), 41-53.
- Marti, E., & Balcázar, J. L. (2013). Real-time PCR assays for quantification of *qnr* genes in environmental water samples and chicken feces. *Applied and environmental microbiology*, 79(5), 1743-1745.
- Mensa, J., Gatell, J. M., García Sanchez, J. E., Letang, E., & Lopez-Suiñé, E. (2014). F. Marco. Tratamiento de las Infecciones Producidas por Microorganismos específicos. *Guía Terapéutica Antimicrobiana*.
- Moore, J. E., Barton, M. D., Blair, I. S., Corcoran, D., Dooley, J. S., Fanning, S., & McDowell, D. A. (2006). The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. *Microbes and infection*, 8(7), 1955-1966.
- Rautelin, H., Jusufovic, J., & Hänninen, M. L. (1999). Identification of hippurate-negative thermophilic *campylobacters*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 35(1), 9-12.
- Sifré, E., Salha, B. A., Ducournau, A., Floch, P., Chardon, H., Mégraud, F., & Lehours, P. (2015). EUCAST recommendations for antimicrobial susceptibility testing applied to the three main *Campylobacter* species isolated in humans. *Journal of microbiological methods*, 119, 206-213.
- Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2015*. Madrid, 2016.
- Skarp, C. P. A., Hänninen, M. L., & Rautelin, H. I. K. (2016). *Campylobacteriosis*: the role of poultry meat. *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 103-109
- WHO, 2011." *Campylobacter*". *Fact Sheet, No. 255* [en línea]. Dirección URL: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/. [Consulta 6 de Junio2017].