



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS EN CARNE DE POLLO

Alumno/a: Ruiz Díaz, Enrique

Tutora: Prof. D^a. María José Grande Burgos
Tutor: Prof. D. Rubén Pérez Pulido

Dpto: Ciencias de la Salud

Octubre, 2019

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Aspectos particulares del proceso de producción de las carnes.....	5
1.1.1. <i>Fuentes de contaminación primarias de las carnes.....</i>	<i>5</i>
1.1.2. <i>Microbiota de las carnes.....</i>	<i>7</i>
1.1.3. <i>Sucesos bioquímicos que desencadenan el rigor mortis.....</i>	<i>8</i>
1.2. Incidencia de los microorganismos en los procesos de producción de carne de ave ...	9
1.2.1. <i>Microbiota de la carne de pollo.....</i>	<i>10</i>
1.3. Calidad microbiológica de la carne de pollo en España	11
1.4. Resistencia a antimicrobianos: el papel de la industria alimentaria	13
1.4.1. <i>Mecanismos bacterianos de resistencia</i>	<i>14</i>
1.4.2. <i>Resistencia a antimicrobianos de la microbiota de la carne de pollo.....</i>	<i>16</i>
2. OBJETIVOS	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
3.1. Procedencia de las muestras.....	18
3.2. Preparación de los medios de cultivo	19
3.3. Recuento de microorganismos totales y de microorganismos resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán.....	21
3.4. Aislado de cepas resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán.....	24
3.5. Ensayos de sensibilidad a antibióticos.....	24
3.5.1. <i>Criterios para el análisis de datos de sensibilidad a antibióticos</i>	<i>25</i>
3.6. Ensayos de sensibilidad a biocidas.....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
4.1. Estudio de la carga microbiana total, resistente a ampicilina y tolerante a triclosán	28
4.1.1. <i>Porcentaje de cepas resistentes a ampicilina con respecto a la carga microbiana total de cada muestra</i>	<i>29</i>
4.1.2. <i>Porcentaje de cepas tolerantes a triclosán con respecto a la carga microbiana total de cada muestra.....</i>	<i>29</i>
4.2. Análisis de resistencia a antibióticos	30
4.2.1. <i>Porcentaje total de cepas sensibles, intermedias y resistentes a cada antibiótico</i>	<i>30</i>
4.2.2. <i>Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos según el punto de venta</i>	<i>31</i>
4.2.3. <i>Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos según el procesado de la carne</i>	<i>32</i>
4.3. Análisis de tolerancia a biocidas	33

4.3.1. Porcentaje total de cepas tolerantes a cetrimida según su concentración	33
4.3.2. Porcentaje total de cepas tolerantes a cloruro de benzalconio según su concentración	33
4.3.3. Porcentaje total de cepas tolerantes a clorhexidina digluconato según su concentración	34
4.3.4. Porcentaje de cepas tolerantes a biocidas según el punto de venta	34
4.3.5. Porcentaje de cepas tolerantes a biocidas según el procesado de la carne	35
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	36

RESUMEN

En este trabajo se ha llevado a cabo una metodología para analizar la susceptibilidad a diversos antibióticos (tetraciclina, gentamicina, eritromicina, amoxicilina/ácido clavulánico (2:1), kanamicina y cefotaxima) y biocidas (cetrimida, cloruro de benzalconio y clorhexidina digluconato) de aislados bacterianos obtenidos a partir de 8 muestras de carne de pollo, picada y no picada, de diferentes supermercados y pequeñas carnicerías de la provincia de Jaén (España). Además, se ha realizado un estudio de la carga microbiana total de estas muestras para estimar su calidad microbiológica y del porcentaje de cepas resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán, con respecto a dicha carga microbiana total. Los resultados de estos ensayos se han analizado y han permitido establecer relaciones entre los aislados bacterianos según el procesado o no de la carne y según el punto de venta de la misma.

Palabras clave: resistencia a antibióticos, tolerancia a biocidas, carga microbiana total y carne de pollo.

ABSTRACT

In this work a methodology has been carried out to analyze the susceptibility to various antibiotics (tetracycline, gentamicin, erythromycin, amoxicillin / clavulanic acid (2: 1), kanamycin and cefotaxime) and biocides (cetrimide, benzalkonium chloride and chlorhexidine digluconate) of bacterial isolates obtained from 8 samples of chicken meat, minced and not minced, from different supermarkets and small butchers in the province of Jaén (Spain). In addition, a study of the total microbial load of these samples has been carried out to estimate their microbiological quality and of the percentage of ampicillin-resistant and triclosan-tolerant strains, with respect to the total microbial load. The results of these tests have been analyzed, and have allowed us to establish relationships between the bacterial isolates according to the processing or not of the meat and according to the point of sale.

Keywords: antibiotic resistance, biocide tolerance, total microbial load and chicken meat.

1. INTRODUCCIÓN

El hombre desde su origen, hace un millón de años, se ha dedicado a cazar y a recolectar alimentos para su ingesta, sin embargo, no fue hasta hace 8000 años cuando comenzó a producirlos (Jay, Loessner y Golden, 2009). Fue, en este preciso momento, cuando comenzó a advertir los primeros problemas de alteración e intoxicación a través del consumo de alimentos (Jay *et al.*, 2009).

Tuvieron que pasar muchos años, concretamente hasta 1837, para que alguien fuera capaz de apreciar y comprender la presencia y el papel de los microorganismos en los alimentos (Jay *et al.*, 2009). Así pues, fue Pasteur, en esa fecha, quién demostró que el proceso de acidificación de la leche era consecuencia del crecimiento de microorganismos y el que utilizó calor por primera vez, en 1860, para destruir los microorganismos no deseables del vino y la cerveza, dando nombre al proceso que hoy conocemos como pasteurización (Jay *et al.*, 2009).

En la actualidad, el Codex Alimentarius (1969) recoge que “todas las personas tienen derecho a esperar que los alimentos que comen sean inocuos y aptos para el consumo” (p.3). Las enfermedades de transmisión alimentaria no solo pueden tener consecuencias fatales para las personas, sino que, además, influyen negativamente en el comercio y la confianza de los consumidores, lo que se traduce en importantes pérdidas económicas (Codex Alimentarius, 1969).

El proceso de globalización actual facilita también la propagación de enfermedades transmitidas por los alimentos en el mundo. El comercio internacional de productos alimenticios, los desplazamientos a otros países del mundo y el cambio en los hábitos de consumo de alimentos, han impulsado el desarrollo de nuevas técnicas de producción, preparación y distribución de alimentos (Codex Alimentarius, 1969).

Es por ello que todos los agentes que interfieren en el proceso de producción de un alimento o producto alimenticio son responsables de garantizar la inocuidad del mismo (Codex Alimentarius, 1969). Este objetivo debe cumplirse mediante la aplicación de la legislación vigente en la materia, en todos sus niveles de concreción, así como el adecuado diseño, implantación y control de los propios planes de calidad e higiene de cada empresa.

En conclusión, “la riqueza y abundancia de la microbiota presente en los productos alimenticios, especialmente en las carnes, juegan un papel importante en la vida útil de los productos, su seguridad microbiana y, por lo tanto, la salud del consumidor” (Rouger, Moriceau, Prévost, Remenant y Zagorec, 2017, p.7).

1.1. Aspectos particulares del proceso de producción de las carnes

Actualmente, la carne, bien sea fresca o elaborada, constituye una parte importante de los productos alimenticios que se comercializan a escala internacional (ICMSF, 2016).

Tradicionalmente, las carnes se han considerado vehículo de una importante cantidad de enfermedades humanas transmitidas por los alimentos (Codex Alimentarius, 2005). La presencia de patógenos como salmonelas, *Campylobacter* spp. termófilos, *E. coli* O157:H7 toxigénica y otras cepas de *E. coli* enterohemorrágica y *Yersinia enterocolitica* hacen de la carne cruda una importante fuente de enfermedades entéricas (ICMSF, 2016).

Generalmente, las enfermedades alimentarias causadas por estos patógenos se deben a una deficiencia en los procesos de cocción o a un procesado insuficiente, así como a procesos de contaminación cruzada entre las carnes frescas y los alimentos listos para el consumo (ICMSF, 2016).

En consecuencia, para garantizar la adecuada calidad microbiológica de las carnes, es necesario tener en cuenta aspectos determinados de su proceso de producción como: las fuentes de contaminación primarias de la carne o la microbiota presente en ella, entre otros.

1.1.1. Fuentes de contaminación primarias de las carnes

Si asumimos que “las zonas internas de los tejidos de los animales sanos no deben contener bacterias en el momento de su sacrificio en el matadero” (Jay *et al.*, 2009, p.59), ¿cómo se produce la contaminación microbiológica de la carne? La respuesta la encontramos en las fuentes de contaminación primaria que se producen durante el sacrificio de los animales y el posterior manejo de las canales. Según Jay *et al.* (2009), estas fuentes de contaminación primaria son:

- Cuchillo de degüello. Este cuchillo se utiliza para seccionar la vena yugular de los animales, una vez aturdidos y, por tanto, es fundamental que esté en perfectas condiciones de higiene para evitar que los microorganismos puedan acceder al torrente circulatorio y desde ahí alcanzar cualquier punto de la canal.
- Piel del animal. Las condiciones de higiene y limpieza con las que llegan los animales al matadero pueden ser determinantes para reducir las contaminaciones producidas por los microorganismos presentes en su piel. Estos pueden introducirse en la canal empujados por el cuchillo del matarife, además pueden pasar al aire del matadero y contaminar superficies y otras canales ya preparadas.
- Tracto gastrointestinal. La rotura del tracto gastrointestinal por incisiones o punciones y el consiguiente vertido del contenido intestinal sobre la canal, provocan la automática contaminación de la misma.
- Manos de los manipuladores. Esta contaminación se produce en animales recién sacrificados y no es posible impedirla ni con el uso de guantes que, además, actúan como vehículo de los microorganismos para contaminar otras canales.
- Contenedores. Son la principal fuente de contaminación primaria de las carnes, que, al ser depositadas en estos contenedores no estériles, se contaminan con los microorganismos presentes en ellos.
- Manejo y entorno de las cámaras de almacenamiento. La superficie de las canales se contaminan por el aire circulante en las instalaciones.
- Nódulos linfáticos. En determinados tipos de carne, los nódulos linfáticos están inmersos en el tejido graso. Si se produce su corte o mezcla con otras piezas para hacer carne picada, esta estará contaminada con los microorganismos contenidos en los nódulos.

Estas formas de contaminación, por lo general, provocan la normalización de una microbiota determinada en la superficie externa de las canales y que es fiel

reflejo del entorno y de los procesos de sacrificio y carnización a los que han sido sometidos los animales (Jay *et al.*, 2009).

1.1.2. Microbiota de las carnes

Como consecuencia de las fuentes de contaminación primaria, dentro de la microbiota que frecuentemente está presente en las carnes podemos encontrar bacterias, mohos y levaduras (Jay *et al.*, 2009).

De forma general, entre las bacterias predominan las Gram negativas, pudiéndose destacar los siguientes géneros por su mayor incidencia: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Arcobacter*, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Hafnia*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shewanella* y *Yersinia* (Jay *et al.*, 2009).

En cuanto a las Gram positivas destacan los géneros: *Bacillus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Caseobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Kocuria*, *Kurthia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Paenibacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Jay *et al.*, 2009).

Además de este amplio número de bacterias, en las carnes también se encuentran diversos géneros de mohos y levaduras, debido a los entornos donde se procesan los alimentos (Jay *et al.*, 2009).

Entre los mohos destacan los géneros: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Monascus*, *Monilia*, *Mucor*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum* y *Thamnidium* (Jay *et al.*, 2009).

En cuanto a las levaduras, los géneros más detectados son: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Trichosporon* y *Yarrowia* (Jay *et al.*, 2009).

La mayoría de los microorganismos que se encuentran en las carnes no son patógenos, sin embargo, es importante detectarlos todos y conocer su incidencia sobre las mismas, máxime cuando se trata de microorganismos alterantes cuyo desarrollo provoca el rápido perecimiento del producto final.

1.1.3. Sucesos bioquímicos que desencadenan el rigor mortis

Uno de los procesos de mayor importancia para la calidad sensorial de las carnes es el *rigor mortis*. Este proceso consiste en una sucesión de acontecimientos bioquímicos que llevan a transformar el tejido muscular en carne. Para que se produzca de forma correcta, es fundamental que los animales que van a ser sacrificados no hayan sido sometidos a un considerable estrés (Jay *et al.*, 2009).

Los sucesos bioquímicos, que desencadenan el *rigor mortis* tras el sacrificio del animal, descritos por Lawrie (1966) y sintetizados en Jay *et al.* (2009) son:

- Cese de la circulación y consecuente pérdida de la capacidad para resintetizar ATP.
- La falta de ATP hace que la actina y la miosina se unan para formar actomiosina, que endurece los músculos.
- Reducción del potencial redox como consecuencia del descenso del aporte de oxígeno.
- Comienza a desarrollarse el enranciamiento por la falta de vitaminas y antioxidantes.
- La temperatura del animal comienza a disminuir y su grasa empieza a solidificarse.
- Se produce el cese de la respiración y la síntesis de ATP.
- Se inicia la glicolisis. El glucógeno se transforma en ácido láctico provocando un descenso del pH hasta un valor de 5,6. Esto desencadena la liberación y activación de las catepsinas que desnaturalizan las proteínas, completando el *rigor mortis*. Este proceso se acompaña de un intercambio de cationes divalentes y monovalentes entre las proteínas musculares y de la acumulación de diversos metabolitos.
- Finalmente, el sistema retículo-endotelial cesa en sus funciones y los microorganismos pueden crecer sin control alguno.

Este proceso ocurre durante las 24-36 horas siguientes al sacrificio. En este momento, es fundamental que tanto la superficie como el interior de las canales alcancen la temperatura de la cámara de refrigeración, de 2° a 5° C, ya que la microbiota procedente de las fuentes de contaminación primarias ya está instalada en ellas y puede comenzar a desarrollarse (Jay *et al.*, 2009).

1.2. Incidencia de los microorganismos en los procesos de producción de carne de ave

En función del país, las compañías especializadas en producir carne de ave pueden ir desde granjas familiares a grandes complejos avícolas muy especializados (ICMSF, 2016).

El ICMSF (2016) afirma que “*Campylobacter* y *Salmonella* son los microorganismos presentes en las aves vivas de las granjas y en la recepción en los mataderos” (p.119). Asimismo, “la presencia de salmonelas y de especies termófilas de *Campylobacter* son las principales fuentes de enfermedades en el hombre por consumo de productos derivados de aves tanto frescos como congelados” (ICMSF, 2016, p.117).

En consecuencia, reducir la prevalencia de estos patógenos en las granjas de aves así como minimizar su paso a las canales durante y después del sacrificio de los animales, sería un importante avance en la consecución de una adecuada calidad microbiológica de las carnes frescas de ave y sus derivados.

Existen, efectivamente, en algunos países, programas nacionales de control para reducir los patógenos que afectan al hombre y a las propias aves en las granjas (ICMSF, 2016). Este es el caso de Dinamarca, donde estos programas han llevado a reducir la prevalencia de *Salmonella* a un 3% en el año 2000, con una disminución del 59% desde 1993 (ICMSF, 2016).

La contaminación de las canales durante las distintas etapas de la cadena de producción siempre ha sido uno de los principales problemas para la calidad microbiológica de la carne de ave. Así, May (1962) estudió la evolución de la carga microbiana superficial de las canales durante su paso por la cadena de procesado. Para ello, May (1962) analizó las canales de pollo de seis cadenas de producción y observó que la carga superficial de las canales aumenta desde 3,30/cm² en el inicio hasta

3,81/cm² tras el troceado y alcanzando los 4,08/cm² tras el envasado, siempre en términos de log₁₀ UFC. Es por ello que “para mantener bajos niveles de bacterias alterantes deben limpiarse y desinfectarse a intervalos tanto los equipos como el entorno del procesado” (ICMSF, 2016, p.119)

Existen, además, otros factores que influyen en la velocidad de crecimiento de los microorganismos y en el tipo de alteración de la carne cruda de aves: el pH de la carne de las aves, la temperatura de almacenamiento y el tipo de envasado (ICMSF, 2016).

El pH de los tejidos no es un factor que pueda ser modificado para controlarlo pero es importante conocerlo por su influencia en la vida útil de los productos avícolas crudos (ICMSF, 2016).

La temperatura de almacenamiento, sin embargo, si es un factor controlable. Su reducción hasta prácticamente el punto de congelación puede prolongar al máximo la vida útil de las carnes de aves (ICMSF, 2016). Otra opción es la congelación, de esta forma la carne de ave no experimenta alteración microbiana (ICMSF, 2016).

Por otro lado, el tipo de envasado también influye en el desarrollo de la microbiota de la carne de ave (ICMSF, 2016). El envasado al vacío o la atmósfera protectora con dióxido de carbono aumenta la vida útil de las carnes de ave (ICMSF, 2016).

En definitiva, la higiene de los animales antes del sacrificio, la limpieza de los equipos y entornos del matadero durante la manipulación de las canales, así como la temperatura de almacenamiento de las mismas o el tipo de envasado del producto final, son factores que es necesario optimizar a la hora de maximizar la vida útil de las carnes de ave.

1.2.1. Microbiota de la carne de pollo

A pesar de las medidas que se toman para impedir la contaminación microbiológica de las canales durante el sacrificio y su posterior manipulación en la cadena de producción, es inevitable que en los recuentos aparezca una microbiota característica. En esta ocasión, se va a describir la microbiota que se puede encontrar

frecuentemente en carne de pollo. Esta microbiota está formada por un amplio número de géneros de bacterias, además de levaduras y algunos mohos.

En cuanto a los géneros bacterianos hay que destacar la frecuencia con la que se detectan los siguientes: *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Vagococcus* (Jay *et al.*, 2009). Además de los mencionados, otros géneros que se detectan en los análisis microbiológicos realizados a carne de pollo son: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brochothrix*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Erysipelothrix*, *Flavobacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Moraxella*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Proteus*, *Psychrobacter*, *Serratia* y *Staphylococcus* (Jay *et al.*, 2009).

Por otro lado, los géneros de levaduras más detectados son: *Candida*, *Debaryomyces*, *Rhodotorula* y *Yarrowia* (Jay *et al.*, 2009). Mientras que otros géneros como *Cryptococcus*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* o *Trichosporon* tienen una menor prevalencia en este tipo de carne (Jay *et al.*, 2009).

En cuanto a los mohos, algunos de los géneros que revelan los análisis microbiológicos son: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* (Jay *et al.*, 2009).

1.3. Calidad microbiológica de la carne de pollo en España

Muchas personas en todo el mundo, consumen diariamente carne de pollo como fuente de proteína animal (Hamada *et al.*, 2018). En España, el consumo de carne de pollo constituye una parte sustancial de la dieta (Álvarez-Astorga, Capita, Alonso-Calleja, Moreno y García-Fernández, 2002). Tanto es así que su consumo ha superado al de la carne de res (Capita, Alonso-Calleja, García-Fernández y Moreno, 2001).

Este aumento en el consumo de carne de pollo en las últimas décadas está justificado por tres motivos: su bajo precio, su bajo contenido en grasas y su corto tiempo de cocinado (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002). Sin embargo, la presencia de microorganismos patógenos y alterantes en las canales de pollo y productos derivados es un hecho que preocupa a proveedores, consumidores y organismos de salud pública (Capita *et al.*, 2001; Álvarez-Astorga *et al.*, 2002)

Como hemos visto anteriormente, y tal y como suscriben El-Leithy y Rashad (1989), “la contaminación bacteriana de estos alimentos es indeseable pero inevitable, y depende del nivel bacteriano de las canales, las medidas higiénicas durante la manipulación y el tiempo y la temperatura de almacenamiento” (citado en Álvarez-Astorga *et al.*, 2002, p.45).

El estudio de microorganismos mesófilos, psicrotrofos como *Pseudomonas* spp., coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se emplea para evaluar la calidad microbiológica y las condiciones sanitarias durante el procesado y almacenamiento de la carne de pollo (Álvarez-Astorga, 2002).

Numerosos investigadores han llevado a cabo estudios sobre la calidad microbiológica de las canales de pollo así como sus derivados en puntos de venta de España.

Capita *et al.* (2001) llevó a cabo el análisis de 40 canales de pollo de diferentes supermercados y pollerías. Se realizaron recuentos medios ($\log_{10}$ UFC/g) de psicrotrofos (4,84), pseudomonas (4,11), pseudomonas fluorescentes (3,32), enterococos (2,72), *Micrococcaceae* (3,80), *Staphylococcus aureus* (3,67) y levaduras y mohos (2,99) (Capita *et al.*, 2001). Los niveles de psicrotrofos, pseudomonas, pseudomonas fluorescentes, levaduras y mohos fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en supermercados que en pollerías, debido posiblemente al mayor tiempo que pasan las canales en los supermercados (entre 1 y 2 días) que en las pollerías (entre 4 y 16 horas) (Capita *et al.*, 2001). Por otra parte, el almacenamiento a una temperatura mayor podría ser el motivo por el cual los recuentos de enterococos, *Micrococcaceae* y *S. aureus* fueron significativamente mayores ($P < 0,05$) en las pollerías que en los supermercados (Capita *et al.*, 2001). Además, aunque fueron los únicos, los recuentos de *S. aureus* excedían los límites establecidos en los criterios microbiológicos consultados para carne de pollo (Capita *et al.*, 2001).

Otro estudio realizado en España por Álvarez-Astorga *et al.* (2002), evaluó la calidad microbiológica de derivados del pollo como muslos, alas y mollejas, y productos procesados de pollo como hamburguesas y salchichas. También se llevaron a cabo conteos medios ($\log_{10}$ UFC/g) en mesófilos, psicrotrofos, coliformes, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, que fueron desde 5,56 a 7,28, 5,96 a 7,87, 3,49 a 5,42, 2,60 a

4,33 y 2,47 a 3,48, respectivamente (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002). Teniendo en cuenta los estándares microbiológicos españoles, los recuentos obtenidos para psicrotrofos, *E. coli* y *S. aureus* fueron, en general, inaceptables para los derivados del pollo (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002). Mientras que el 80% de las muestras de hamburguesas y salchichas también muestran una calidad microbiológica inaceptable, en este caso, por los excesivos recuentos de mesófilos (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002).

En vista de estos estudios, podemos concluir que, en España, las canales de pollo evisceradas y refrigeradas presentan una buena calidad microbiológica (Capita *et al.*, 2001). Las partes derivadas del pollo, sin embargo, y los productos procesados pueden representar un riesgo para la salud de las personas (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002).

1.4. Resistencia a antimicrobianos: el papel de la industria alimentaria

El desarrollo y la propagación de las resistencias bacterianas a agentes antimicrobianos han cobrado especial interés en las últimas décadas. La resistencia bacteriana a los antibióticos se describió por primera vez en 1940, sin embargo, el descubrimiento de nuevos antibióticos a un ritmo constante hizo que las consecuencias de este hallazgo fueran más difíciles de apreciar (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

En la actualidad, la ralentización en el descubrimiento de nuevos antimicrobianos, sumado a la presión selectiva ejercida por el uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en todo el mundo han derivado en una crisis sanitaria a nivel global (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Tal es la magnitud de la situación que, el 21 de septiembre de 2016, por cuarta vez en su historia, se discutió en la Asamblea General de las Naciones Unidas un tema relacionado con la salud, la resistencia a los antimicrobianos (The PLOS Medicine Editors, 2016). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (2016) señala que “la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en una de las mayores amenazas para la salud mundial y pone en peligro otras importantes prioridades, como el desarrollo humano”.

El papel de la industria alimentaria en este problema está siendo discutido a nivel nacional e internacional y es que la presión selectiva ejercida por los antibióticos, en las etapas de producción primaria, y por los biocidas (desinfectantes, conservantes de alimentos y piensos, descontaminantes, etc.) ha sido señalada como el principal factor

en la aparición, selección y propagación de la resistencia a los antimicrobianos en toda la cadena alimentaria (Capita y Alonso-Calleja, 2013) (Figura 1). Otros factores que también preocupan son los cultivos genéticamente modificados con marcadores de resistencia a antibióticos, los microorganismos añadidos de forma intencionada a los alimentos con genes de resistencia a los antimicrobianos potencialmente transferibles y las tecnologías de procesamiento de alimentos utilizadas a dosis sub-letales como tratamientos alternativos no térmicos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

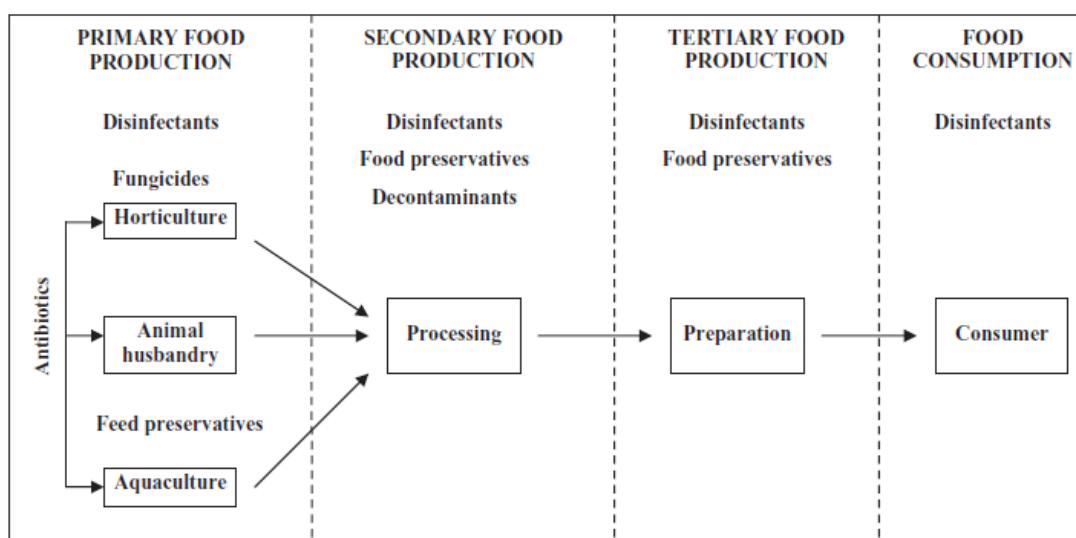


Figura 1. Principales antimicrobianos usados en las distintas etapas de producción de alimentos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

La preocupación por esta problemática ha generado un crecimiento exponencial de la producción científica en este ámbito en los últimos años. Así, numerosos investigadores llevan a cabo estudios que tratan de ampliar el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia bacteriana, su generación y difusión, así como las posibles rutas para la aparición de resistencia en la cadena alimentaria o el papel de los alimentos como vehículo para la resistencia a antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

1.4.1. Mecanismos bacterianos de resistencia

Los mecanismos más comunes que usan los antimicrobianos para destruir las bacterias son: “daño o inhibición de la síntesis de la pared celular (penicilinas), modificaciones de su ADN o ARN (quinolonas), proteínas (tetraciclinas) o rutas metabólicas (sulfonamidas)” (Rosenblatt-Farrell, 2009, citado en Capita y Alonso-Calleja, 2013, p.17).

En cuanto a las estrategias que usan las bacterias para resistir los efectos de los antimicrobianos, Capita y Alonso-Calleja (2013) destacan:

- La formación de biopelículas o *biofilms*. Muchas bacterias se asocian con superficies naturales o abióticas donde forman estructuras comunales mediante exopolímeros y enzimas extracelulares que les confieren propiedades como una mayor resistencia a antibióticos o biocidas.
- Los cambios en la permeabilidad de su membrana. Ya sea de manera natural o mediante mecanismos de resistencia adquiridos, las bacterias son capaces de modificar la permeabilidad de su membrana y limitar de esta forma la concentración antimicrobiana en su interior.
- Eflujo o transporte activo mediado por proteínas. A través de bombas proteicas, las bacterias son capaces de eliminar activamente los antimicrobianos que penetran en su interior.
- Inactivación enzimática del compuesto antes de alcanzar su diana. Algunas bacterias son capaces de producir enzimas que modifican o degradan los antimicrobianos. Estas enzimas son bastante específicas para algún antimicrobiano o clase de antimicrobianos en particular.
- Modificación o sobreproducción de las dianas. Las bacterias son capaces de modificar los receptores intracelulares de los antimicrobianos, a través de la mutación del ARN ribosómico o de otros elementos clave, evitando así la unión con el antimicrobiano y, por tanto, eludiendo su efecto.
- Adquisición de rutas metabólicas alternativas. Algunos antibióticos actúan sobre determinados enzimas de las rutas metabólicas, sin embargo, las bacterias resistentes pueden desarrollar una vía metabólica alternativa que evite el efecto del antimicrobiano.

Los biocidas, a diferencia de los antibióticos, actúan atacando múltiples dianas de la bacteria (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Por ello, la susceptibilidad a estos suele estar causada por una disminución de la concentración intracelular del biocida mediada por mecanismos no específicos (eflujo o cambios en la permeabilidad de

membrana), siendo poco probable que su causa sea la modificación de las dianas o la anulación de un proceso metabólico (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Además, se conoce que numerosas bacterias ya se han vuelto resistentes a múltiples tipos de antimicrobianos no relacionados entre sí. Este tipo de bacterias son las llamadas bacterias multirresistentes y su principal mecanismo de resistencia consiste en la expulsión de los antimicrobianos mediante transporte activo con bombas proteicas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

1.4.2. Resistencia a antimicrobianos de la microbiota de la carne de pollo

Solo en España, multitud de investigaciones sobre diversos aspectos relacionados con las resistencias a antimicrobianos de los patógenos presentes en la carne de pollo se han desarrollado desde que se tiene constancia de este problema.

Alonso-Hernando, Prieto, García-Fernández, Alonso-Calleja y Capita (2012) analizaron aislados obtenidos de 202 muestras de carne de pollo en España para determinar y comparar los perfiles de resistencia a antibióticos de *Listeria monocytogenes* entre 1993 y 2006. Los resultados de estos ensayos, realizados sobre 15 fármacos de uso común en veterinaria y terapias humanas, revelaron el incremento de las resistencias a antibióticos desde 1993 a 2006 (Alonso-Hernando *et al.*, 2012). Estos resultados junto con la alta prevalencia de *L. monocytogenes* en la carne de pollo indican el rol crucial que desempeñan los manipuladores de alimentos para prevenir la listeriosis en los consumidores (Alonso-Hernando *et al.*, 2012).

Un estudio similar de Álvarez-Fernández, Alonso-Calleja, García-Fernández y Capita (2012) sobre varios serotipos de *Salmonella* señaló también un aumento de la resistencia a antibióticos en el intervalo transcurrido desde 1993 hasta 2006 en España. Por otro lado, el análisis de la prevalencia de *Salmonella* en el mismo período de tiempo reveló una disminución de la misma (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012). Disminución que estaría relacionada con las medidas introducidas en la Unión Europea en las últimas décadas para reducir la incidencia de *Salmonella* en aves de corral (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012).

Otro estudio, este sobre la resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli* a 12 antimicrobianos, comparó muestras de pollo de granjas convencionales con las de

granjas orgánicas (Álvarez-Fernández, Cancelo, Díaz-Vega, Capita y Alonso-Calleja, 2013). Tras aislar *E. coli* en todas las muestras, más del 90% de los aislados resultaron ser multirresistentes (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013). Además, los productos de granjas convencionales mostraron un mayor porcentaje de cepas resistentes que los productos de las granjas orgánicas (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013). Lo que podría implicar una correlación entre el uso de agentes antimicrobianos en las granjas convencionales y la selección de bacterias resistentes (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013).

Por otro lado, el estudio de 512 muestras de pollo fresco, mitad envasado y mitad sin envasar, reveló un 39,4% de positivos por *Campylobacter* spp. (García-Sánchez, Melero, Díez, Jaime y Rovira, 2018) Además, los productos empaquetados presentaban un menor porcentaje de contaminación que los no empaquetados, y la especie *C. coli* mostró una mayor resistencia a antibióticos que *C. jejuni* o *C. lari* (García-Sánchez *et al.*, 2018).

Un último estudio reveló que el 66,7% de los productos procesados derivados de la carne de pollo (carne picada, hamburguesas, *nuggets*, salchichas blancas y rojas, escalopes y rollitos) analizados albergaban *Staphylococcus aureus* (Buzón-Durán, Capita y Alonso-Calleja, 2017). Todos los aislados obtenidos a partir de estos productos eran multirresistentes a al menos 3 antibióticos diferentes, lo cual convierte a este tipo de productos procesados en un importante reservorio de cepas de *S. aureus* resistentes (Buzón-Durán *et al.*, 2017).

En conclusión, todas las investigaciones anteriores, independientemente del microorganismo objeto de estudio, refieren incrementos o una elevada prevalencia de las resistencias a diversos agentes antimicrobianos. Esto muestra la importancia de hacer un uso responsable de los antibióticos, biocidas y demás antimicrobianos en todas las fases de producción de las aves de corral, así como la imperiosa necesidad de descubrir nuevas formas de acabar con los microorganismos multiresistentes.

2.OBJETIVOS

En vista de todo lo expuesto anteriormente, el objetivo principal de este trabajo será estimar la calidad microbiológica y la susceptibilidad a diversos antibióticos y biocidas de diferentes aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de carne de pollo

picadas y sin picar de supermercados y pequeñas carnicerías de la provincia de Jaén (España).

Este objetivo principal puede desglosarse en los siguientes objetivos concretos:

- Determinar la carga bacteriana total de cada muestra.
- Estimar el porcentaje de bacterias resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán en relación a la carga bacteriana total de cada muestra.
- Relacionar los resultados obtenidos en los ensayos de sensibilidad a antibióticos y biocidas, estableciendo diferencias entre el tipo de procesado y el tipo de comercio de procedencia de las muestras.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se van a describir los principales materiales y métodos empleados en el laboratorio durante la realización de este trabajo.

3.1. Procedencia de las muestras

Para la realización de este experimento se han utilizado 8 muestras de carne de pollo de distintos supermercados y pequeñas carnicerías de la provincia de Jaén. Todas las muestras son de pechuga de pollo aunque algunas difieren en el tipo de procesado que les ha sido realizado en el propio comercio:

- Muestra A: Pechuga de pollo entera, comprada en la carnicería de un supermercado.
- Muestra B: Pechuga de pollo picada en la carnicería de un supermercado.
- Muestra C: Pechuga de pollo entera, comprada en una pequeña carnicería.
- Muestra D: Pechuga de pollo entera, comprada en la carnicería de un supermercado.
- Muestra E: Pechuga de pollo picada en una pequeña carnicería.
- Muestra F: Pechuga de pollo entera, comprada en una pequeña carnicería.
- Muestra G: Pechuga de pollo picada en la carnicería de un supermercado.

- Muestra H: Pechuga de pollo entera, comprada en la carnicería de un supermercado.

3.2. Preparación de los medios de cultivo

En función de los métodos que se van a llevar a cabo en este ensayo se va a preparar una serie de medios o caldos de cultivo. En concreto, vamos a preparar los medios sólidos, *Tryptone Soy Agar* (TSA) y *Mueller-Hinton Agar* (MH), y el medio líquido, *Tryptone Soy Broth* (TSB) (Figura 2).

Estos medios se preparan a partir de reactivos comerciales deshidratados siguiendo la proporción indicada en la etiqueta, pesando para ello la cantidad necesaria en la balanza de precisión, añadiéndola a un matraz Erlenmeyer y completando con agua destilada hasta alcanzar la cantidad deseada.



Figura 2. Reactivos comerciales para preparación de medios y caldos de cultivo.

El medio TSA es un medio general que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. Está compuesto por peptona de caseína (15 g/l), peptona de soja (5 g/l), cloruro sódico (5 g/l) y agar (15 g/l). Concretamente, en este trabajo se va a utilizar el medio TSA para hacer el recuento de microorganismos totales de las muestras. Para ello, se preparará en matraces Erlenmeyer la cantidad necesaria, siguiendo la proporción de 40 g por litro que se indica en el reactivo comercial.

Por otro lado, el medio MH es un medio de cultivo con agar (17 g/l), peptona (17,5 g/l), sólidos de infusión de carne (2 g/l) y almidón (1,5 g/l) que se utiliza, habitualmente, para realizar pruebas de sensibilidad a antibióticos. En este caso, este medio se va a emplear para el recuento de microorganismos resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán y para hacer ensayos de sensibilidad a antibióticos. Para preparar el MH se pesa la cantidad de reactivo necesaria siguiendo la proporción de 38 g por litro que estipula el fabricante.

El medio TSB, por su parte, es un medio de cultivo líquido, compuesto por peptona de caseína (17 g/l), peptona de soja (3 g/l), cloruro sódico (5 g/l), fosfato dipotásico (2,5 g/l) y dextrosa (2,5 g/l), que se usa para el cultivo de todo tipo de microorganismos. En nuestro caso, se va a emplear para obtener aislados bacterianos inoculados a partir de cepas resistentes a ampicilina o tolerantes a triclosán, y para la realización de ensayos de determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en biocidas. Para ello, una vez tengamos preparada la cantidad deseada de medio, siguiendo la proporción de 30g por litro que marca la etiqueta, se va a repartir todo el contenido del matraz en tubos de vidrio con tapón, a razón de 2 ml por tubo.

Además de los mencionados medios, también se va a preparar solución salina (NaCl) al 0,85%. En este caso, vamos a preparar un volumen de 400 ml, para lo que pesamos 3,4 gramos de NaCl y lo añadimos a un matraz junto con 400 ml de agua destilada. Y por otro lado, vamos a preparar, de la misma forma, un matraz con 250 ml (2,125 g de NaCl + 250 ml de agua destilada) que se va a usar para hacer alícuotas de 0,9 ml en tubos Eppendorf.

A continuación, todo el material preparado se lleva al autoclave durante 20 minutos a 121° C. Para ello, los matraces de los distintos medios y de solución salina se tapan con algodón hidrofóbico y papel de aluminio, y los tubos con medios TSB, así como los tubos Eppendorf de solución salina se colocan en gradillas y se envuelven en papel de aluminio.

Una vez finalizado el autoclave, el matraz con solución salina y las gradillas con los tubos Eppendorf y los tubos con medio TSB se dejan atemperar a temperatura

ambiente para almacenarlos posteriormente en cámara fría a 4° C, mientras que los matraces con los medios TSA y MH se atemperan en el baño a 50° C (Figura 3).



Figura 3. Medios TSA y MH atemperándose en el baño a 50° C.

Una vez atemperados, a uno de los matraces de MH se le adiciona ampicilina, en proporción 32 µg/ml, y al otro, triclosán al 0,025%.

A continuación, y en presencia de un mechero Bunsen para mantener las condiciones de esterilidad, el contenido de cada matraz se vierte sobre placas de Petri, las cuales se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, las placas se recogen y se almacenan en la cámara fría a 4° C hasta que se vayan a usar.

3.3. Recuento de microorganismos totales y de microorganismos resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán

El estudio de la carga microbiana total de las distintas muestras de carne de pollo, mediante el recuento en TSA de los microorganismos totales y la obtención del número de unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml), nos va a dar una idea de la calidad sanitaria del alimento, las condiciones higiénicas, la elaboración y la manipulación del mismo.

Asimismo, se va a realizar el recuento de microorganismos resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán. Posteriormente, se van a aislar algunas de estas cepas resistentes y, para terminar, se van a realizar ensayos de sensibilidad a diversos antibióticos y biocidas.

Para ello, lo primero que debemos hacer es pesar en la balanza 5 gramos de cada una de las muestras de carne de pollo. A continuación, estos 5 gramos se introducen en una bolsa estéril y se le añaden 45 ml de solución salina (Figura 4).



Figura 4. Una de las muestras de carne de pollo (muestra G) antes de introducirla en el *Stomacher*.

Una vez hecho esto, cada una de las bolsas con alimento y solución salina se van a introducir en el *Stomacher* a velocidad alta durante 2 minutos. El *Stomacher* es un aparato de laboratorio con 2 palas metálicas que ejercen presión y disgregan el alimento contenido en la bolsa (Figura 5).

Seguidamente, partiendo del contenido de las bolsas o soluciones madre, que ya presentan una dilución 1:10 (dilución 10^{-1}), se va a preparar una serie de diluciones decimales para cada una de las muestras. Para ello, se toman 100 μ l con la micropipeta que se pipetea en un tubo Eppendorf con 0,9 ml de solución salina, obteniendo así una dilución 1:100 (dilución 10^{-2}). De esta forma, tomando 100 μ l de la dilución 10^{-2} y pipeteándolos en un nuevo Eppendorf con 0,9 ml de solución salina, obtendríamos una

dilución 1:1000 (dilución 10^{-3}) y, así, repetiríamos el proceso dos veces más hasta llegar a la dilución 1:100000 (dilución 10^{-5}).

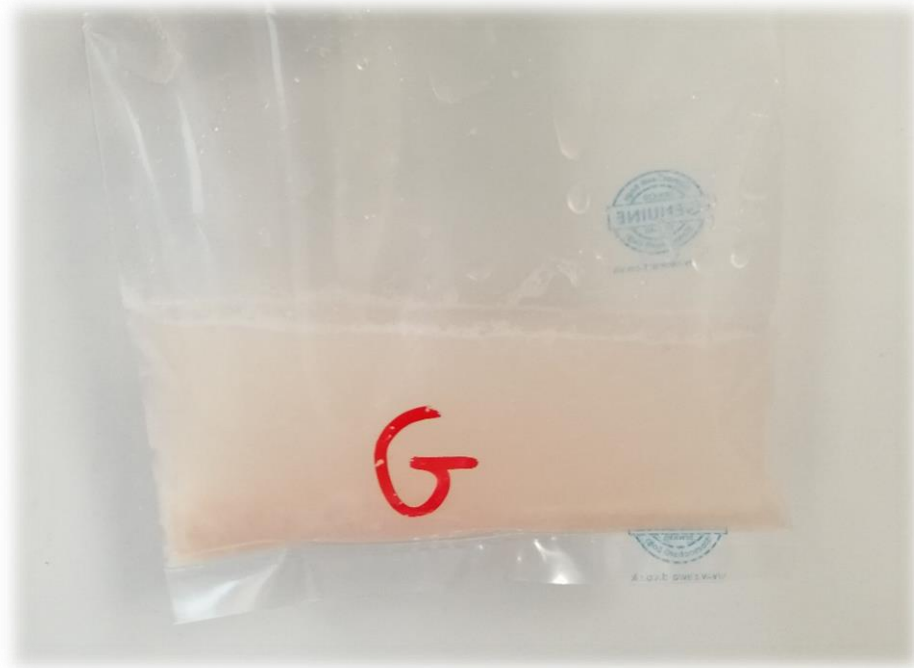


Figura 5. Solución madre de la muestra G (misma muestra de la Figura 4) después del Stomacher.

Posteriormente, a partir de las diluciones preparadas para cada muestra, se siembran las placas TSA para el recuento de microorganismos totales y las placas MH con ampicilina o triclosán para el recuento de cepas resistentes. Cada placa se siembra pipeteando 100 μ l de la dilución deseada sobre el centro de la misma y agregando varias bolitas de vidrio estériles que se hacen rodar por toda la placa para que la siembra sea homogénea.

De esta forma, para el recuento de microorganismos totales en medio TSA se han sembrado, por duplicado y para todas las muestras, las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , obteniendo un total de 8 placas por muestra. Mientras que para el aislamiento de cepas resistentes se han sembrado las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} de cada muestra, en 3 placas de MH con ampicilina y en 3 placas de MH con triclosán. Todo este proceso debe realizarse cerca del mechero Bunsen para evitar contaminaciones. Finalmente, las placas sembradas se llevan a la estufa a 37° C durante 24 horas.

Transcurrido este tiempo, se observan las placas y se seleccionan aquellas que tengan entre 30 y 330 colonias que, por lo general, son aquellas placas donde las

colonias se encuentran bien separadas unas de otras, desechando el resto de placas. De esta forma, para cada muestra vamos a tener 2 placas TSA de la misma dilución, una placa MH ampicilina y otra de MH triclosán. A continuación, en cada una de las placas seleccionadas se cuenta el número total de colonias con la ayuda de un rotulador. Finalmente, los datos obtenidos en los recuentos se utilizan para determinar las UFC/ml de cada muestra de alimento.

3.4. Aislado de cepas resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán

Para la realización de los ensayos de sensibilidad a antibióticos y la determinación de la CMI en biocidas se van a aislar algunas colonias de las placas que se han seleccionado anteriormente para hacer los recuentos de resistentes. De esta forma, por cada muestra se van a seleccionar un máximo de 3 colonias resistentes a ampicilina y otras 3 tolerantes a triclosán.

Así pues, en dichas placas se seleccionan las colonias que parezcan fenotípicamente diferentes y, una vez seleccionadas, bajo la llama del mechero Bunsen para mantener las condiciones de esterilidad, se arrastra la colonia deseada con la punta estéril de una micropipeta y, acto seguido, se introduce en un tubo con 2 ml de TSB estéril. Por último, todos los aislados se incuban en la estufa a 37° C durante 24 horas. Tiempo tras el cual, se guardan en cámara fría a 4° C.

De esta forma, se ha obtenido un total de 35 aislados, de los cuales 15 proceden de cepas resistentes a la ampicilina y 19 de cepas tolerantes al triclosán, que van a ser utilizados en los distintos ensayos de sensibilidad antimicrobiana.

3.5. Ensayos de sensibilidad a antibióticos

Como ya hemos mencionado, los aislados obtenidos se van a utilizar para estimar su grado de sensibilidad a distintos antibióticos. Para ello se va a hacer un antibiograma con discos de difusión en medio MH utilizando una técnica que nos va a permitir optimizar el proceso, minimizando el consumo de discos antibióticos y de placas de medio. Esta técnica consiste en colocar el disco antibiótico en el centro de la placa y sembrar con asa de platino hasta 6 cepas diferentes, trazando una línea desde el borde exterior de la placa hasta el centro sin llegar a tocar el disco. Los antibióticos que se han seleccionado para realizar el ensayo y sus concentraciones por disco son los siguientes:

- **Tetraciclina (TE)**, 30 µg/disco (OXOID)
- **Gentamicina (CN)**, 30 µg/disco (OXOID)
- **Eritromicina (E)**, 15 µg/disco (OXOID)
- **Amoxicilina/ Ácido clavulánico (2:1) (AMC)**, 30 µg/disco (OXOID)
- **Kanamicina (K)**, 30 µg/disco (OXOID)
- **Cefotaxima (CTX)**, 30 µg/disco (OXOID)

Una vez terminado el proceso, todas las placas se llevan a la estufa a 37° C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, con la ayuda de una regla se mide la zona de inhibición del crecimiento inducida por el antibiótico en cada cepa bacteriana y se anotan los datos en una plantilla (Figura 6).

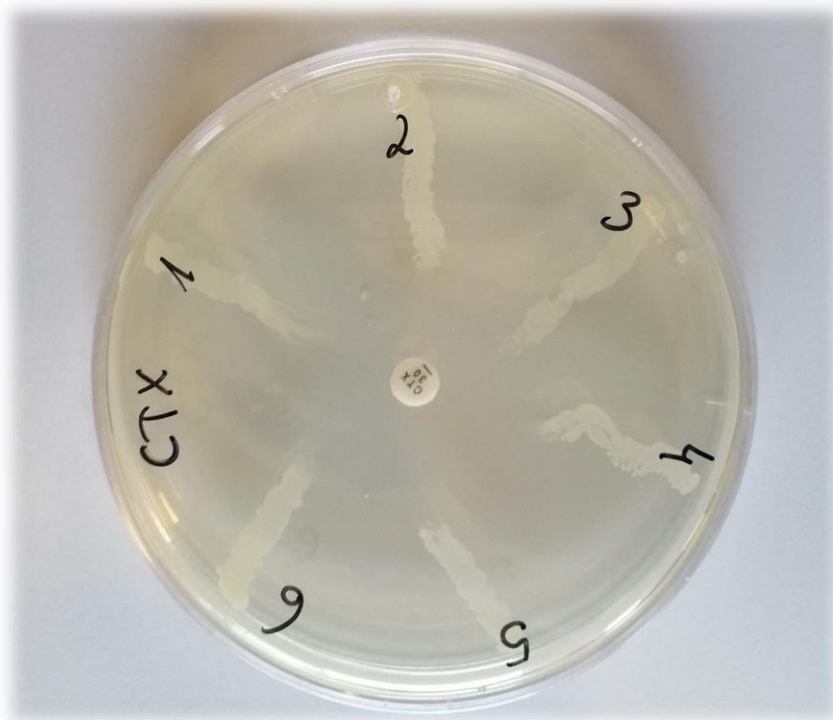


Figura 6. Placa correspondiente al ensayo de susceptibilidad a cefotaxima (CTX) de los aislados 1 a 6. Alrededor del disco de CTX se puede apreciar la variación en la inhibición del crecimiento de las distintas cepas bacterianas.

Finalmente, estos datos serán analizados para determinar la sensibilidad de todas las cepas aisladas a cada uno de los antibióticos empleados.

3.5.1. Criterios para el análisis de datos de sensibilidad a antibióticos

Habitualmente, el análisis de datos de sensibilidad a antibióticos se lleva a cabo mediante los criterios establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) y el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). Para la aplicación de estos estándares internacionales es necesario haber identificado al microorganismo en cuestión, sin embargo, dado el carácter preliminar de este trabajo, la identificación de las distintas cepas bacterianas no se ha llevado a cabo. En consecuencia, en este trabajo se han establecido de forma arbitraria unos criterios para el análisis de los datos de sensibilidad a antibióticos (Tabla 1). Estos criterios clasifican las distintas cepas bacterianas en resistentes (R), intermedias (I) y sensibles (S) según el diámetro en milímetros de sus halos de inhibición:

	Resistentes (diámetro, mm)	Intermedias (diámetro, mm)	Sensibles (diámetro, mm)
Tetraciclina	< 10	10-20	> 20
Gentamicina	< 10	10-20	> 20
Eritromicina	≤ 2	3-6	> 6
Amoxicilina/ Ac. clavulánico (2:1)	≤ 2	3-6	> 6
Kanamicina	< 10	10-20	> 20
Cefotaxima	< 10	10-20	> 20

Tabla 1. Criterios de clasificación de cepas bacterianas según su sensibilidad a antibióticos.

3.6. Ensayos de sensibilidad a biocidas

Para este estudio también se van a utilizar los 35 aislados empleados en el ensayo de sensibilidad a antibióticos. Se va a determinar la CMI para diferentes biocidas, es decir, la concentración mínima de un biocida a la que se inhibe el crecimiento de una cepa bacteriana determinada.

Los biocidas seleccionados para el ensayo han sido:

- **Cetrimida**, soluble en agua al 10% (Sigma Aldrich, Co.)
- **Cloruro de benzalconio**, 50% en agua (Sigma Aldrich, Co.)
- **Clorhexidina digluconato**, 20% en agua (Sigma Aldrich, Co.)

Lo primero que hay que hacer es realizar diluciones 1/10 de las cepas que se van a usar en tubos Eppendorf con 900 µl de solución salina, añadiendo 100 µl de cada cepa.

A continuación hay que preparar las 8 diluciones que necesitamos de cada biocida, cuyas concentraciones, de mayor a menor, van a ser: 256 mg/l (Ci), 128 mg/l (C2), 64 mg/l (C3), 32 mg/l (C4), 16 mg/l (C5), 8 mg/l (C6), 4 mg/l (C7) y 2 mg/l (C8). Para ello, bajo la llama del mechero Bunsen y partiendo de la solución madre del biocida de concentración 256 mg/l (concentración inicial, Ci), se toman 25 ml que se mezclan en un tubo Falcon con 25 ml de TSB, obteniéndose así 50 ml de dilución 2 de concentración 128 mg/l (C2). De la misma forma, se toman 25 ml de la dilución 2 que se mezclan con 25 ml de TSB en otro tubo Falcon, obteniendo la dilución 3 de concentración 64 mg/l (C3) y, así, continuamos hasta alcanzar la dilución 8 de concentración 2 mg/l (C8).

A continuación, con el mechero Bunsen encendido para mantener las condiciones de esterilidad, en placas de microtitulación de 96 pocillos, se van a cargar las siguientes muestras para cada cepa bacteriana:

- 1 control + de la cepa: 1 pocillo con 180 µl de TSB + 20 µl de la cepa diluida 1/100.
- 7 muestras problema (de la C2 a la C8 del biocida): 7 pocillos con 180 µl de la concentración X del biocida + 20 µl de la cepa bacteriana diluida 1/100 por pocillo.

Este proceso se va a repetir 3 veces por cepa, una por cada biocida empleado. Además, también en placa de microtitulación de 96 pocillos, se van a ensayar los controles negativos para el TSB y las concentraciones empleadas de cada biocida (C2 a C8) (200 µl/pocillo). Tras 24 horas de incubación a 37° C en la estufa, las placas se agitan de forma automática en un agitador y se leen en el lector de microplacas a una longitud de onda de 595 nm.

Finalmente, el análisis de las variaciones obtenidas en los valores de absorbancia nos va a permitir determinar la CMI de las distintas cepas a los tres biocidas empleados. De esta forma, valores de absorbancia de las muestras problema (concentración X del biocida + bacteria) que sean iguales o superiores a 0,5 van a indicar tolerancia de la bacteria al biocida.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Estudio de la carga microbiana total, resistente a ampicilina y tolerante a triclosán

Los valores obtenidos en los recuentos totales (UFC/ml) de las muestras oscilaron desde un mínimo de $3,75 \times 10^4$ de la muestra F hasta un máximo de $3,22 \times 10^7$ de la muestra B. El resto de valores obtenidos fueron $2,85 \times 10^5$, $1,03 \times 10^7$, $3,45 \times 10^5$, $3,05 \times 10^5$, $2,96 \times 10^5$ y $3,32 \times 10^5$ para las muestras A, C, D, E, G, H, respectivamente.

En cuanto a los recuentos de microorganismos resistentes a ampicilina los valores en UFC/ml que se han obtenido son $1,41 \times 10^5$, $7,5 \times 10^5$, $1,14 \times 10^6$, $3,7 \times 10^4$, $4,1 \times 10^3$, $1,1 \times 10^4$ y $9,4 \times 10^3$, para las muestras A, B, C, D, E, G y H, respectivamente. Mientras que, por otro lado, los recuentos de microorganismos tolerantes a triclosán en UFC/ml han sido de $2,47 \times 10^4$, $2,1 \times 10^5$, $4,8 \times 10^5$, $6,9 \times 10^4$, 1×10^2 , $9,4 \times 10^3$ y $5,1 \times 10^3$ para las muestras A, B, C, D, E, G y H, respectivamente. Como se puede observar en la Figura 7, para la muestra F no se han obtenido microorganismos resistentes a ampicilina ni tolerantes a triclosán.

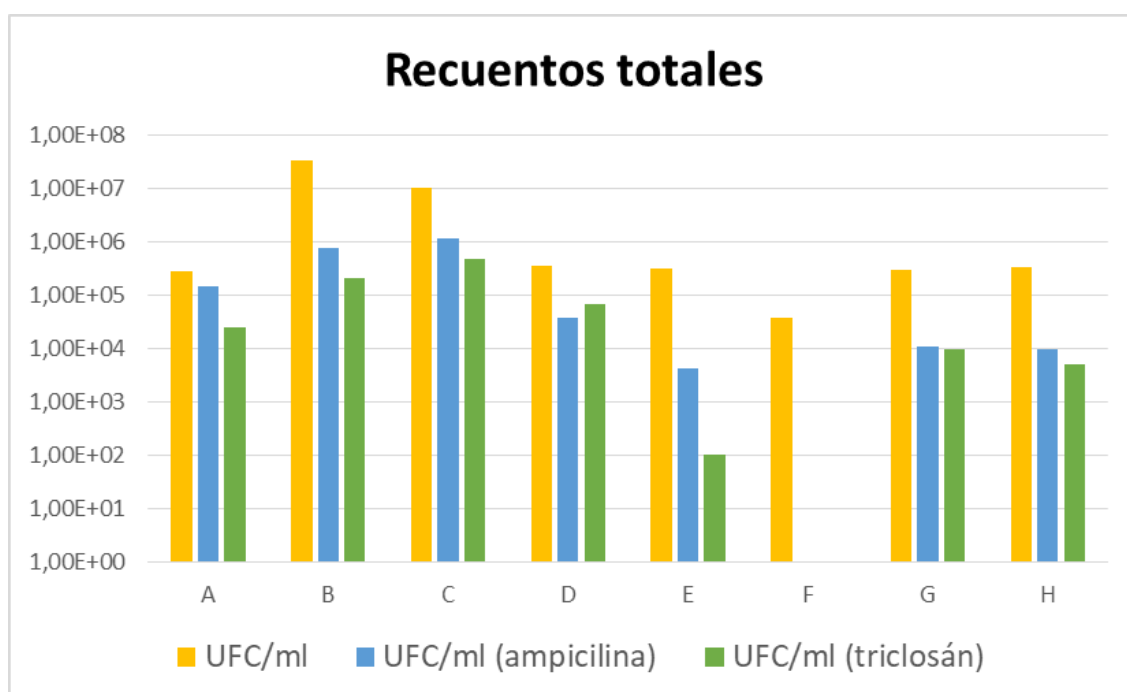


Figura 7. Valores obtenidos en UFC/ml en los recuentos totales de microorganismos y los recuentos de microorganismos resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán de todas las muestras.

4.1.1. Porcentaje de cepas resistentes a ampicilina con respecto a la carga microbiana total de cada muestra

A partir de los valores obtenidos en los recuentos de microorganismos resistentes a ampicilina se ha calculado el porcentaje de cepas resistentes a este antibiótico, con respecto a la carga microbiana total de cada muestra. De esta forma, como se aprecia en la Figura 8, se han obtenido los siguientes porcentajes para las muestras A, B, C, D, E, G y H, respectivamente: 49,47%, 2,33%, 11,07%, 10,72%, 1,34%, 3,72% y 2,83%.

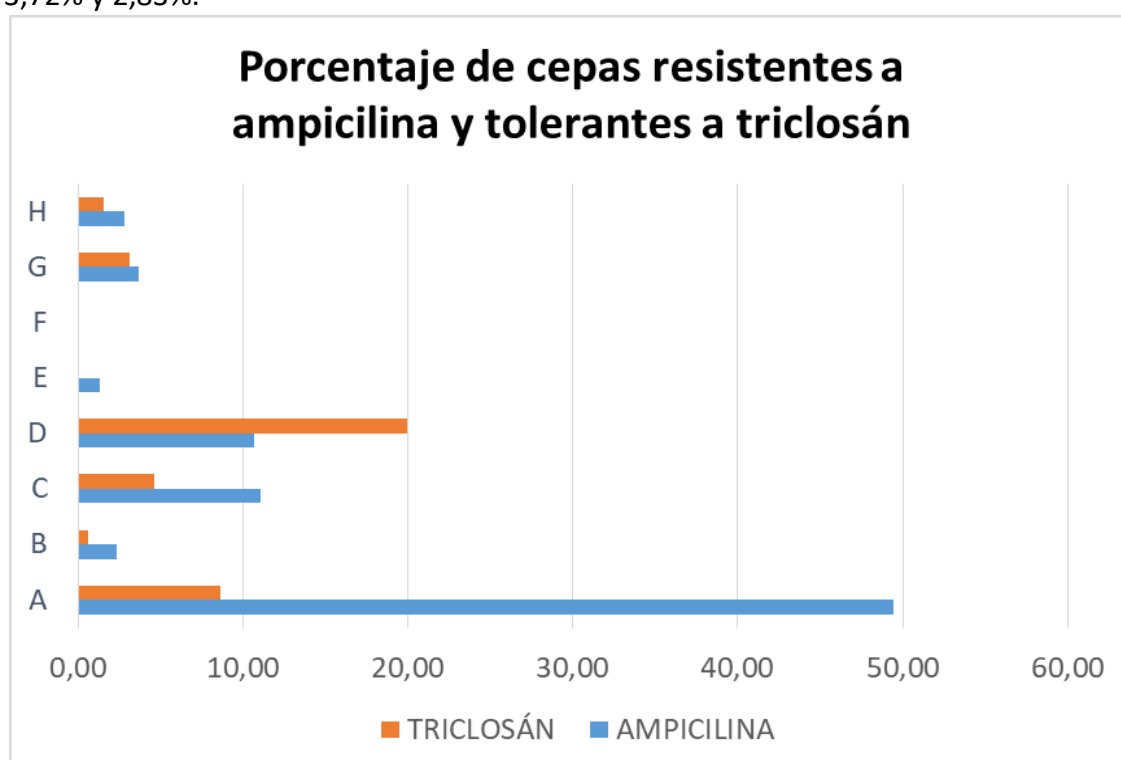


Figura 8. Porcentajes del total de cepas resistentes a ampicilina y tolerantes a triclosán en todas las muestras de carne de pollo.

4.1.2. Porcentaje de cepas tolerantes a triclosán con respecto a la carga microbiana total de cada muestra

Del mismo modo que en el apartado anterior, a partir de los valores obtenidos en los recuentos de microorganismos tolerantes a triclosán se ha calculado el porcentaje de cepas tolerantes a este biocida, con respecto a la carga microbiana total de cada muestra. De esta forma, como se aprecia en la Figura 8, se han obtenido los siguientes porcentajes para las muestras A, B, C, D, E, G y H, respectivamente: 8,67%, 0,65%, 4,66%, 20%, 0,03%, 3,18% y 1,54%.

4.2. Análisis de resistencia a antibióticos

Para determinar el grado de resistencia a antibióticos de las 35 cepas aisladas se ha seguido el criterio establecido en el apartado 3.5.1. Así se han obtenido las siguientes tablas (Tabla 2 y Tabla 3) en las que se muestra el grado de sensibilidad (resistente, intermedia y sensible) mostrado por cada cepa a los distintos antibióticos (tetraciclina, gentamicina, eritromicina, amoxicilina/ácido clavulánico (2:1), kanamicina y cefotaxima).

Número de aislado	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TE	I	I	S	S	S	I	S	I	I	I	I	I	R	R	R	I	I	I	S	S
CN	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	I	S	I	I	I	I	S	I	S	S
E	S	I	S	S	I	I	S	S	I	S	I	I	I	R	R	R	S	S	I	S
AMC	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	R	R	R	S	R	S	S
K	I	S	S	R	I	R	I	S	I	S	I	S	I	I	I	I	I	I	S	S
CTX	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	R	R	I	I	S	S	S

Tabla 2. Grado de sensibilidad (resistente, R, intermedia, I, y sensible, S) de las cepas 1 a la 20 a tetraciclina (TE), gentamicina (CN), eritromicina (E), amoxicilina/ácido clavulánico (2:1) (AMC), kanamicina (K) y cefotaxima (CTX).

Número de aislado	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
TE	I	I	R	S	I	S	S	I	I	S	I	S	S	S	S
CN	I	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S
E	R	R	R	I	I	R	I	I	I	I	I	S	I	I	I
AMC	S	S	R	S	I	R	S	I	S	S	R	R	I	I	R
K	I	I	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	R	S	S
CTX	I	S	S	S	I	R	I	S	S	S	S	I	R	I	R

Tabla 3. Grado de sensibilidad (resistente, R, intermedia, I, y sensible, S) de las cepas 21 a la 35 a tetraciclina (TE), gentamicina (CN), eritromicina (E), amoxicilina/ácido clavulánico (2:1) (AMC), kanamicina (K) y cefotaxima (CTX).

4.2.1. Porcentaje total de cepas sensibles, intermedias y resistentes a cada antibiótico

A partir de los datos recogidos en las tablas anteriores se ha establecido el porcentaje total de cepas sensibles, intermedias y resistentes a cada uno de los antibióticos ensayados (Figura 9).

Así, el antibiótico al que más cepas han sido sensibles ha sido la CN con el 68,57%, mientras que, en el lado opuesto, solo el 28,57% de las cepas han sido sensibles a la E. Para el resto de los antibióticos los porcentajes de cepas sensibles han sido: 40% (TE), 45,71% (K), 51,43% (AMC) y 57,14% (CTX).

Por otro lado, los porcentajes de cepas con sensibilidad intermedia han sido: 20% (AMC), 28,57% (CTX), 31,43% (CN), 45,71% (K), 48,57% (TE) y 51,43% (E).

Por último, no se han encontrado cepas resistentes a la CN, mientras que, el 28,57% de las cepas ha mostrado resistencia al AMC, siendo el antibiótico al que más cepas han sido resistentes. Para el resto de antibióticos, los porcentajes de cepas resistentes, en orden ascendente, han sido: 8,57% (K), 11,43% (TE), 14,29% (CTX) y 20% (E).

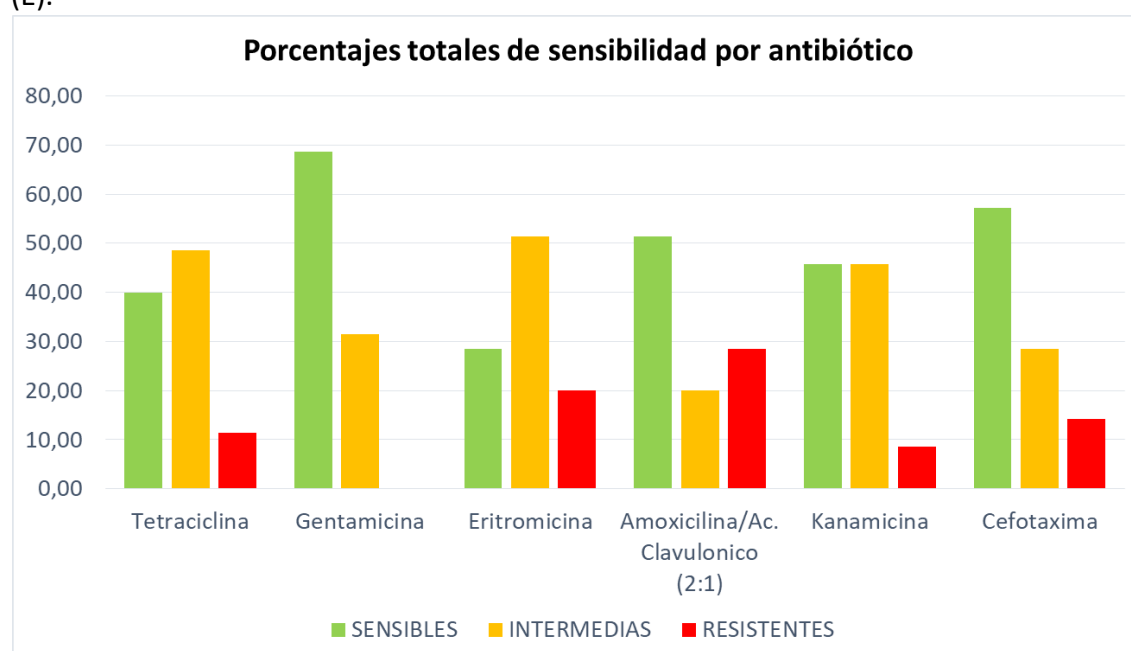


Figura 9. Porcentajes totales de cepas sensibles, intermedias y resistentes a cada antibiótico.

4.2.2. Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos según el punto de venta

Los datos obtenidos en los ensayos de sensibilidad a antibióticos han permitido calcular el porcentaje de cepas resistentes en función del punto de venta donde se obtuvieron las muestras de carne (Figura 10). El porcentaje de cepas resistentes encontrado en las muestras de carne obtenidas en supermercados ha sido del 38%, mientras que en las muestras adquiridas en pequeños comercios han presentado un 62% de resistencias a antibióticos.

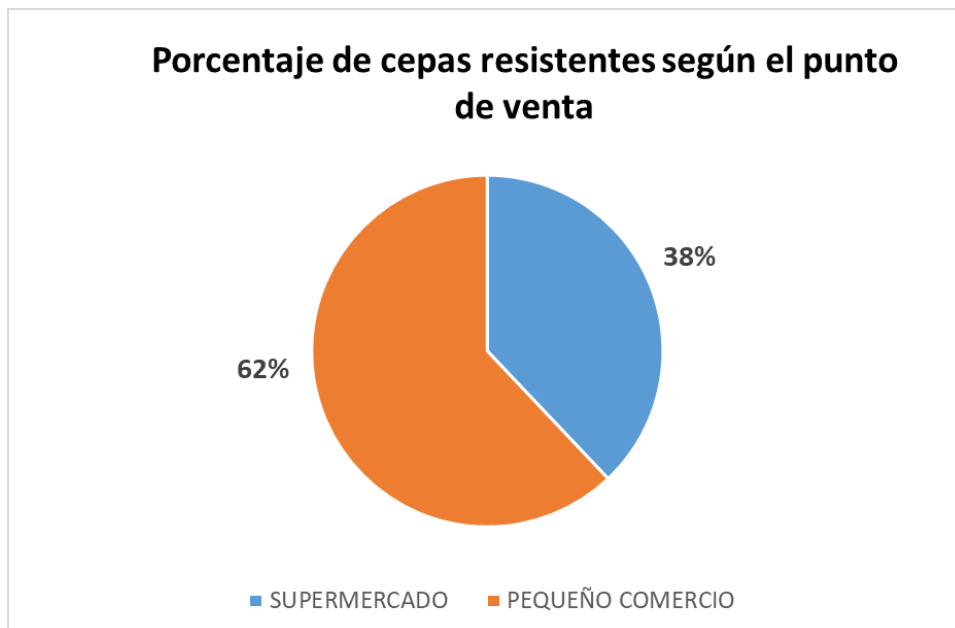


Figura 10. Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos según el punto de venta donde se obtuvieron las muestras de carne de pollo analizadas.

4.2.3. Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos según el procesado de la carne

El porcentaje total de cepas resistentes también se ha presentado en función del tipo de procesado que se le ha realizado a la carne (Figura 11). De esta forma, el 21% de las cepas resistentes a antibióticos ha aparecido en carnes picadas mientras que en las carnes no picadas el porcentaje asciende al 79%.

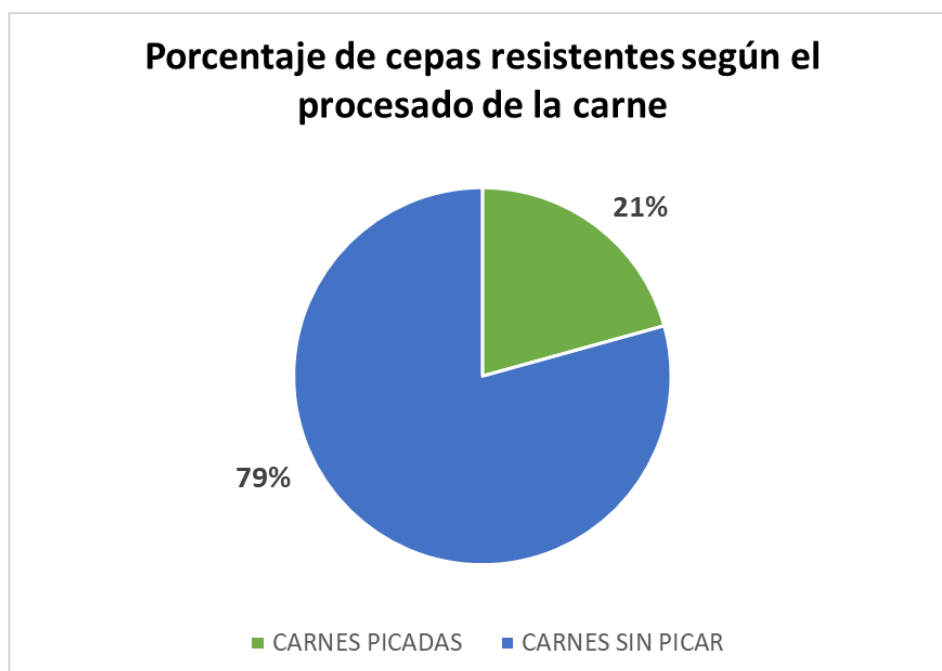


Figura 11. Porcentaje de cepas resistentes a antibióticos según el procesado de la carne.

4.3. Análisis de tolerancia a biocidas

En la realización del ensayo de sensibilidad a biocidas los controles positivos de varias cepas (6 cepas en cetrimida, 15 cepas en cloruro de benzalconio y 5 cepas en clorhexidina digluconato) no han alcanzado el crecimiento esperado por lo que no se han incluido en el análisis de datos. El bajo desarrollo de estas cepas puede deberse a la naturaleza salvaje de las mismas, al empleo de un medio de cultivo inadecuado, a un tiempo de crecimiento insuficiente o a errores cometidos durante la manipulación de dichas cepas.

En base a los resultados obtenidos en este ensayo, se han calculado los porcentajes de cepas tolerantes a cada concentración de los tres biocidas ensayados. Para ello, las muestras problema con valores de absorbancia iguales o superiores a 0,5 han sido consideradas como tolerantes a los distintos biocidas.

4.3.1. Porcentaje total de cepas tolerantes a cetrimida según su concentración

En primer lugar, se ha calculado el porcentaje total de cepas tolerantes para cada concentración de cetrimida ensayada. Como se puede observar en la Figura 12, el 51,72% de las cepas bacterianas aisladas son tolerantes a la concentración más baja de cetrimida (2 mg/l). Sin embargo, solo el 3,45% de las cepas han tolerado concentraciones de 4 mg/l de cetrimida. Para mayores concentraciones de este biocida no se han hallado cepas tolerantes.

4.3.2. Porcentaje total de cepas tolerantes a cloruro de benzalconio según su concentración

En segundo lugar, se ha calculado el porcentaje total de cepas tolerantes para cada concentración de cloruro de benzalconio ensayada. Observando la Figura 12, podemos comprobar que el 65% de las cepas ensayadas han resultado tolerantes a la concentración más baja de cloruro de benzalconio (2 mg/l). Sin embargo, para el resto de concentraciones de este biocida no se han hallado cepas tolerantes.

4.3.3. Porcentaje total de cepas tolerantes a clorhexidina digluconato según su concentración

Por último, se ha calculado el porcentaje total de cepas tolerantes para cada concentración ensayada de clorhexidina digluconato. En la Figura 12, se observa que el 40% de las cepas han sido tolerantes a la concentración más baja del biocida (2 mg/l), mientras que el 3,33% de las cepas han tolerado concentraciones de 4 y 8 mg/l de clorhexidina digluconato, respectivamente. A mayores concentraciones del biocida no se han hallado cepas tolerantes.

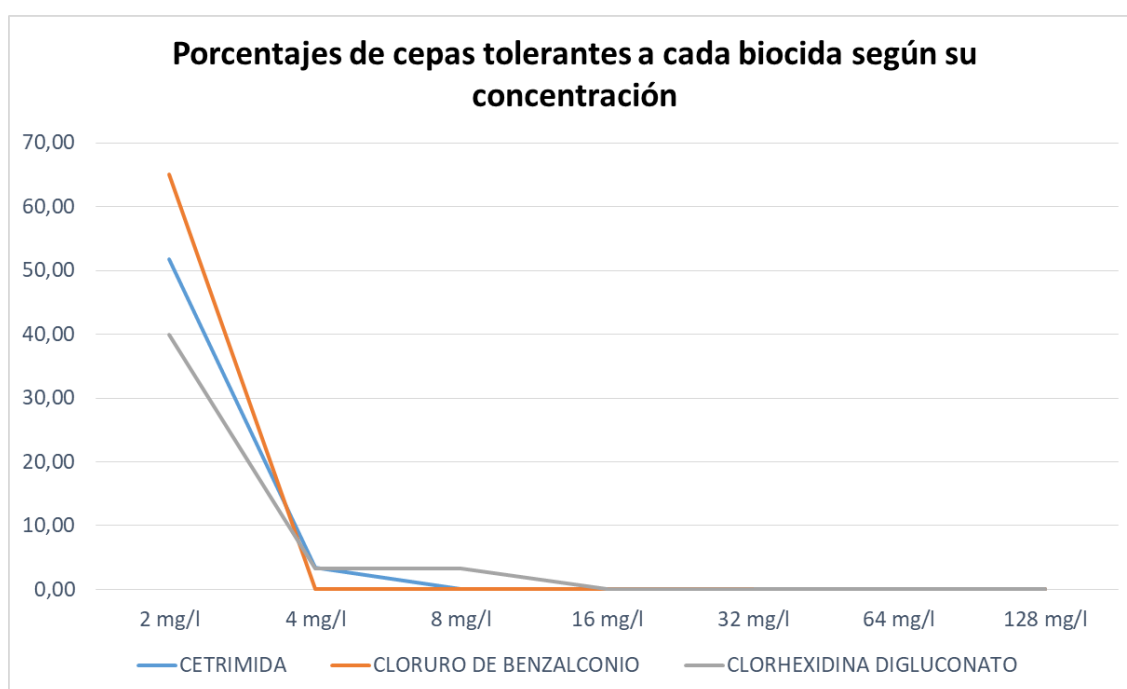


Figura 12. Porcentaje de cepas tolerantes a cada biocida en función de la concentración del biocida.

4.3.4. Porcentaje de cepas tolerantes a biocidas según el punto de venta

De la misma forma que en los ensayos de sensibilidad a antibióticos, los datos obtenidos en los ensayos de tolerancia a biocidas se van a utilizar para calcular, para cada concentración ensayada, el porcentaje total de cepas resistentes a biocidas en función del punto de venta donde se obtuvieron las muestras de carne (Figura 13).

Así, en los pequeños comercios solo se han encontrado bacterias tolerantes a la concentración más baja de los biocidas, un 16,28% de las cepas toleraron concentraciones de 2 mg/l. En los supermercados, sin embargo, se han hallado tolerancias a concentraciones de 2 mg/l, 4 mg/l y 8 mg/l con el 76,74%, el 4,65% y el

2,33% de cepas tolerantes, respectivamente, mientras que para el resto de concentraciones no se han hallado tolerancias.

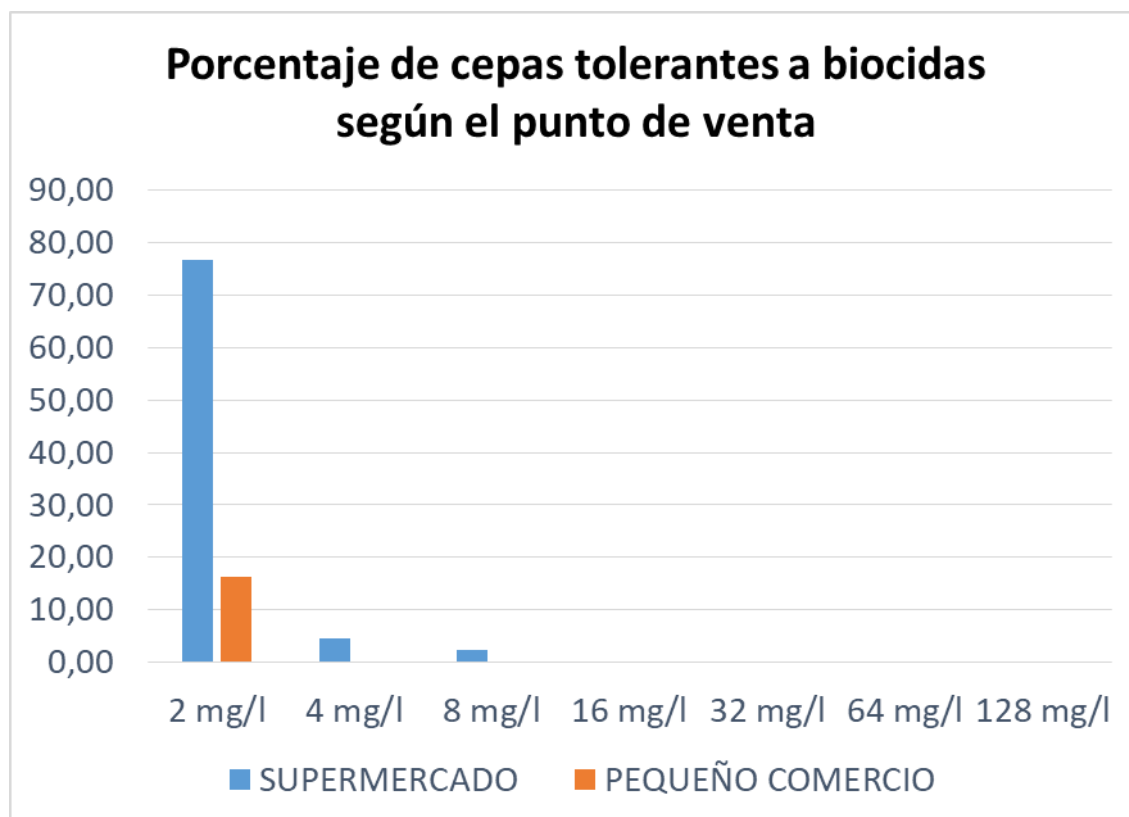


Figura 13. Porcentajes de cepas tolerantes a biocidas por concentración según el punto de venta de la carne.

4.3.5. Porcentaje de cepas tolerantes a biocidas según el procesado de la carne

Por último, también se ha calculado, para cada concentración ensayada, el porcentaje total de cepas resistentes a biocidas según el tipo de procesado al que fueron sometidas las muestras de carne (Figura 14).

En este caso, las carnes picadas han mostrado un 30,23 y un 2,33% de cepas tolerantes para concentraciones de 2 y 4 mg/l, respectivamente.

Por otro lado, las carnes sin picar han presentado tolerancias del 62,79% para la concentración más baja de los biocidas, 2 mg/l, mientras que para concentraciones de 4 y 8 mg/l se han encontrado tolerancias del 2,33% en ambos casos.

Finalmente, en el resto de concentraciones no se han obtenido cepas tolerantes.

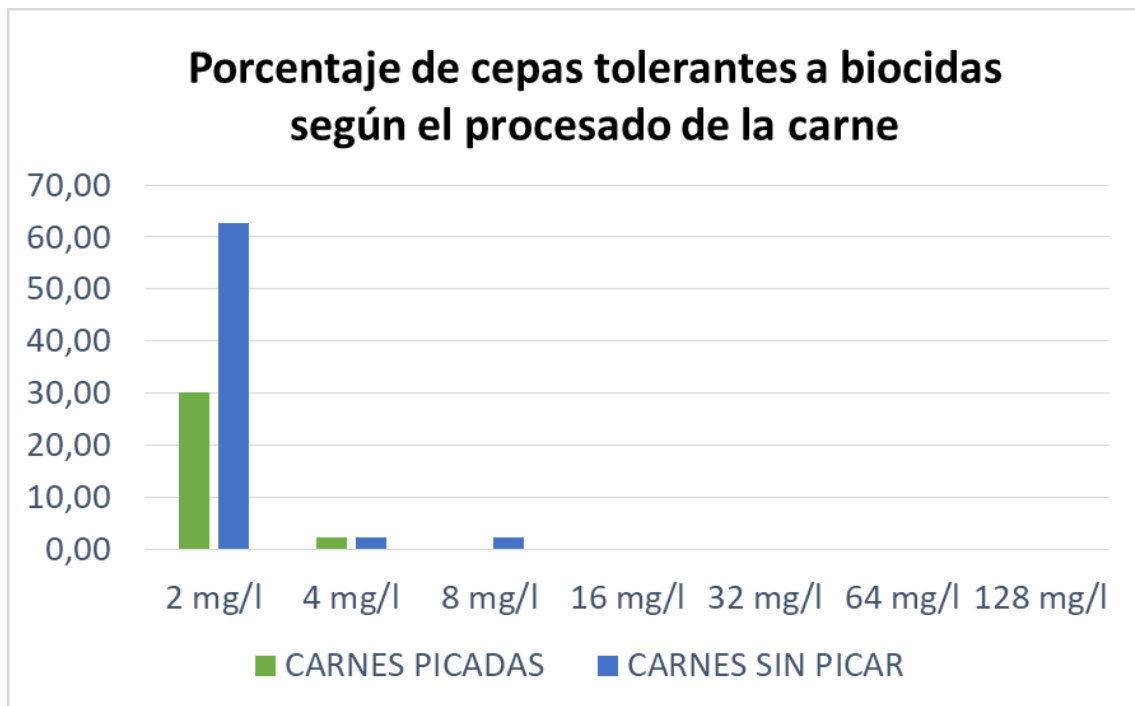


Figura 9. Porcentajes de cepas tolerantes a biocidas por concentración según el tipo de procesado de la carne.

5. CONCLUSIONES

Primera. El estudio de la carga microbiana total de cada muestra no ha permitido establecer relación alguna entre la calidad microbiológica de las carnes de pollo y los puntos de venta ni tampoco con el procesado de las carnes.

Segunda. El ensayo de susceptibilidad a antibióticos ha permitido relacionar un mayor porcentaje de incidencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos con las carnes sin picar y con carnes procedentes de pequeños comercios.

Tercera. El ensayo de susceptibilidad a biocidas ha permitido relacionar un mayor porcentaje de incidencia de cepas bacterianas tolerantes a biocidas a la mínima concentración ensayada con las carnes sin picar y con carnes procedentes de supermercados.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2012). *Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistances among isolates of Listeria monocytogenes from poultry in Spain*. Food Control 23:37-41.

- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. y García-Fernández, M. C. (2002). *Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain*. Meat Science 62:45-50.
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C. y Capita, R. (2012). *Prevalence and antimicrobial resistance of Salmonella serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006*. International Journal of Food Microbiology 153:281-287.
- Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díaz-Vega, C., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). *Antimicrobial resistance in E. coli isolates from conventionally and organically reared poultry: a comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods*. Food Control 30:227-234.
- Buzón-Durán, L., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2017). *Microbial loads and antibiotic resistance patterns of Staphylococcus aureus in different types of raw poultry-based meat preparations*. Poultry Science 96:4046-4052.
- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). *Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 53:11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C., y Moreno, B. (2001). *Microbiological quality of retail poultry carcasses in Spain*. Journal of food protection. Vol. 64. 12:1961-1966.
- Codex Alimentarius. (1969). *Principios generales de higiene de los alimentos*. CAC/RCP 1-1969.
- Codex Alimentarius. (2005). *Código de prácticas de higiene para la carne*. CAC/RCP 58-2005.
- García-Sánchez, L., Melero, B., Díez, A. M., Jaime, I. y Rovira, J. (2018). *Characterization of Campylobacter species in Spanish retail from different fresh chicken products and their antimicrobial resistance*. Food Microbiology 76:457-465.
- Hamada, M., Elbehiry, A., Marzouk, E., Moussa, I. M., Hessain, A. M., Alhaji, J. H., Heme, H. A., Zahran, R. y Abdeen, E. (2018). *Helicobacter pylori in a poultry*

- slaughterhouse: prevalence, genotyping and antibiotic resistance pattern*. Saudi Journal of Biological Sciences. Vol. 25. 6:1072-1078.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2016). *Microorganismos de los alimentos 8. Uso de datos para evaluar el control del proceso y aceptación del producto*. Zaragoza: Acribia
- Jay, J. M., Loessner, M. J. y Golden, D. A. (2009). *Microbiología moderna de los alimentos*. (5.ª ed.). Zaragoza: Acribia
- May, K. N. (1962). *Bacterial contamination during cutting and packaging chicken in processing plants and retail stores*. Food Technology 16:89-91.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). *Resistencia a los antimicrobianos. Reunión de alto nivel de las Naciones Unidas sobre la resistencia a los antimicrobianos*. Tomado de: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/events/UNGA-meeting-amr-sept2016/es/>
- Rouger, A., Moriceau, N., Prévost, H., Remenant, B. y Zagorec, M. (2017). *Diversity of bacterial communities in French chicken cuts stored under modified atmosphere packaging*. Food Microbiology. Vol. 70. 7-16.
- The Plos Medicine Editors. (2016). *Antimicrobial resistance: is the world unprepared?* PLOS Medicine. Vol 13. 9:e1002130