



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

**Determinación de la
susceptibilidad a
antibióticos y biocidas
de cepas de *Escherichia
coli* aisladas de
superficies de un
matadero.**

Alumno: Antonio José Cabello Gámez.

Julio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales

Determinación de la susceptibilidad a antibióticos y biocidas de cepas de *Escherichia coli* aisladas de superficies de un matadero

Alumno: Antonio José Cabello Gámez

Julio, 2018

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Matadero	6
1.1.2 Medidas de higiene	9
1.1.3 Patógenos presentes en un matadero	10
1.1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	11
1.2 Resistencia a antibióticos	12
1.3 Resistencia a biocidas.....	15
1.4 Resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas	17
2. OBJETIVOS	19
3. MATERIAL Y MÉTODOS	20
3.1. Cepas bacterianas	20
3.2 Medios de cultivo.....	21
3.2.1. Medio Tryptone Soy Broth (TSB)	21
3.2.2. Medio Mueller-Hinton Broth (MHB)	21
3.3. Agentes antimicrobianos	21
3.3.1 Antibióticos.....	21
3.3.2 Biocidas	24
3.4 Determinación de la MIC de los diferentes antibióticos y biocidas	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Susceptibilidad a Antibióticos	26
4.1.1 Tetraciclina.....	26
4.1.2 Ampicilina.....	28
4.1.3 Eritromicina	30
4.1.4 Estreptomicina	32

4.2 Susceptibilidad a Biocidas.....	34
4.2.1 Cloruro de Benzalconio.....	34
4.2.2 Clorhexidina.....	36
4.3 Relación de resistencia/sensibilidad de las distintas cepas con los antimicrobianos utilizados	38
5. DISCUSIÓN.....	41
6. CONCLUSIÓN	45
7. BIBLIOGRAFÍA.....	46

RESUMEN

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por microorganismos pero también pueden ser de síntesis, que a concentraciones pequeñas tienen un efecto antimicrobiano, estos han salvado muchas vidas a lo largo de la historia. Los biocidas son sustancias químicas utilizadas en los procesos de desinfección en los diferentes ambientes. La resistencia a los antibióticos y a los biocidas puede ser definida como la capacidad de un microorganismo de resistir la inhibición ejercida por estos antimicrobianos mediante mecanismos innatos o adquiridos. La resistencia a los antimicrobianos es un problema mundial que afecta al hombre y también a los animales, que está derivado del mal uso de éstos.

Dada la preocupación actual que existe por este tema nos pareció interesante determinar si existían resistencias a diferentes antimicrobianos a lo largo de la cadena de la producción de carne trabajando con cepas de *Escherichia coli* aisladas de diferentes zonas de un matadero de Jaén. Los resultados mostraron que efectivamente como se preveía existía una gran cantidad de resistencias y además obtuvimos otros datos importantes como la resistencia que mostró una cepa de *E. coli* aislada de la Sala Blanca, uno de los últimos lugares por donde pasa la carne antes de llegar al consumidor, a la mayoría de los antimicrobianos empleados. Por otro lado el Cloruro de Benzalconio resultó ineficaz frente a todas las cepas aisladas.

Palabras clave: Antibióticos, biocidas, antimicrobiano, resistencia, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Antibiotics are chemical products produced by microorganisms but they can also be synthetic, they have a small antimicrobial effect, they have saved many lives throughout history. Biocides are used in disinfection processes in different environments. Resistance to antibiotics and biocides can be like the ability of a microorganism to resist inhibition by these antimicrobials through innate or acquired mechanisms. Resistance to antimicrobials is a global problem that affects men and also animals, which is derived from the misuse of these.

Given the current concern about this issue, we found it interesting to determine if there were resistance to different antimicrobials along the chain of meat production working with strains of *Escherichia coli* isolated from different areas of a slaughterhouse in Jaén. The results showed that, as expected, there was a large amount of resistances and moreover we got other important data such as the resistance shown by an *E. coli* strain isolated from the White Room, one of the last places where the meat passes before arriving to the consumer, to the majority of the antimicrobial agents used. On the other hand, Benzalkonium Chloride was ineffective against all the isolated strains.

Key Words: Antibiotics, biocides, antimicrobials, resistance, *Escherichia coli*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Matadero

Un matadero puede ser definido como un establecimiento industrial estatal o privado que está destinado a la producción de carne regulada de una o varias especies de animales de abasto, para su posterior comercialización. Pueden ser clasificados en cuatro tipos:

- 1.- Municipales, sus funciones están determinadas por la necesidad del control y de la higiene de la carne. Realizan el sacrificio de los animales, la preparación de canales y otros servicios en relación a la elaboración de la carne. Suelen estar subvencionados con cargo a los ingresos locales.
- 2.- Cooperativa de productores, se realiza el sacrificio de los animales, la preparación de canales y la recuperación de subproductos de los animales de su región de producción correspondiente.
- 3.- Empresa comercial privada, realiza también la matanza y preparación de canales de animales pero comprados por el propietario o producidos en su propia explotación. La carne elaborada se puede vender al por menor, por lo que este matadero deberá poseer una instalación para cortar la carne, puede ser la propia fábrica la que se encargue de sostener a este tipo de matadero o pueden ser sostenidos por un grupo de supermercados que tenga necesidad de unas cantidades regulares de trozos cortados para la venta al por menor.
- 4.- Órgano paraestatal encargado de la facilitación regional/nacional de los servicios necesarios; además de garantizar el cumplimiento legal de sus responsabilidades con lo referente a la salud pública también trata de regular los servicios del matadero que son necesarios para el progreso nacional de la ganadería y el comercio de la carne.

1.1.1 Nivel de organización

El diseño de un matadero siempre debe cumplir estos parámetros: 1) consideraciones humanas en el sacrificio de animales, 2) elaboración y

almacenamiento higiénicos de la carne y los subproductos comestibles, 3) esparcimiento y recreo de los empleados, 4) instalaciones para el ganado.

Un factor importante a tener en cuenta es el cuidado del ganado y, es una exigencia legal inalterable que se proporcione una superficie apropiada cubierta o no cubierta según las condiciones climáticas para que el ganado pueda descansar después de haber recorrido cierta distancia que requiera entre dos y tres días de viaje, en esta idea juega un papel importante el bienestar animal. La inspección *in vivo* impone también la obligación de mantener seco al ganado y si son necesarios los dispositivos para el lavado deben estar diseñados para evitar un exceso de humedad en el lugar del sacrificio. El movimiento del ganado en los corrales o en las zonas de descanso hasta el lugar donde se procede a la matanza debe de ser mínimo para mantener una alta calidad de la carne.

Para una matanza humanizada, higiénica y racional se requiere de un sistema de cadena de fábrica en varias etapas, pasando de las de las zonas en que se realizan las operaciones sucias a las operaciones cada vez más limpias hasta el punto de venta. Etapas:

- 1- Mantenimiento en corrales, atronamiento (o matanza) y sangría, desuello.
- 2- Preparación, podemos distinguir dentro de esta etapa la extracción de las tripas, separación del material inadecuado o no comestible bajo la inspección de un veterinario, división de la canal y limpieza.
- 3- Colgado o enfriamiento a temperaturas del almacén antes de la entrega.
- 4- Deshueso y corte antes de realizar una nueva verificación de la temperatura y adaptación antes del envío a un mercado o directamente al consumidor.

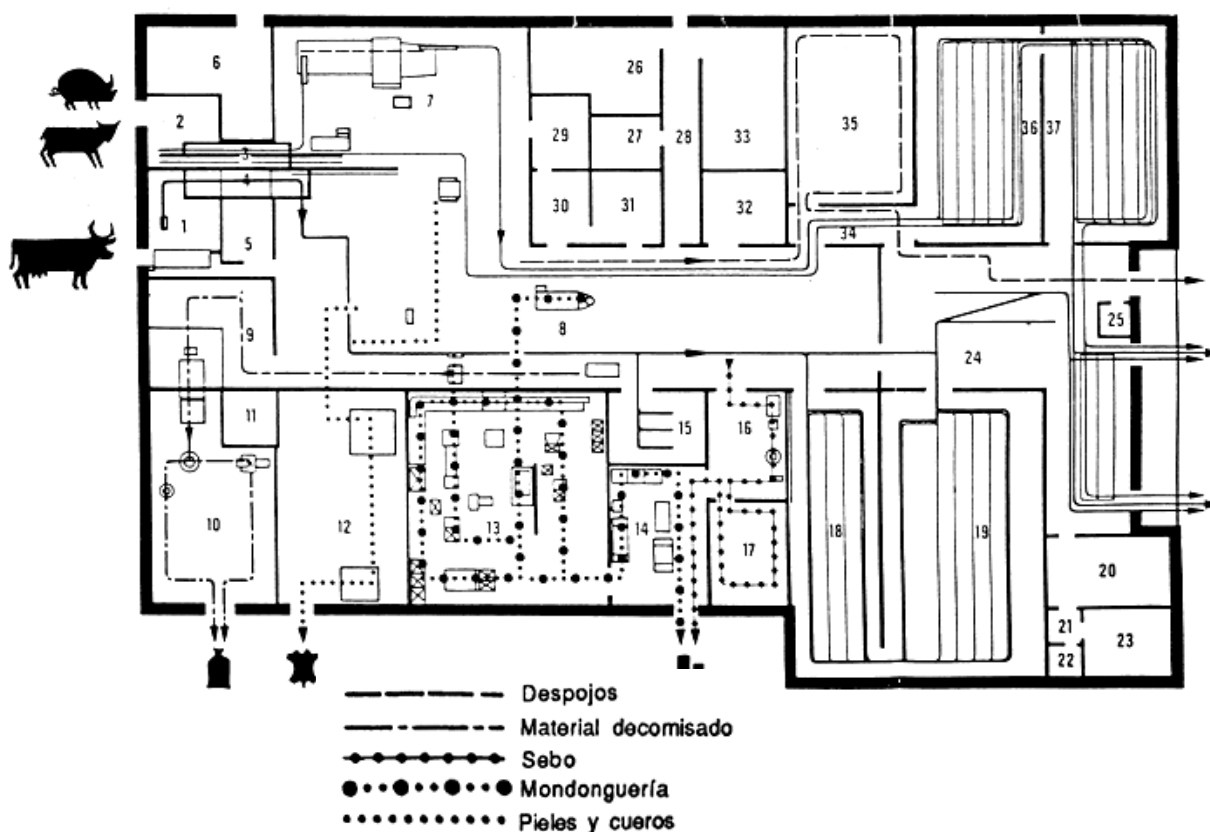


Figura 1: Diagrama de flujo y plan de un matadero de dimensiones medias que sacrifica de 50 a 100 bovinos al día (<http://www.fao.org/docrep/004/T0566S/T0566S00.HTM>)

1-Atronamiento de cabezas de ganado vacuno

2-Atronamiento de cerdos y ovejas

3/4-Carril de desangrado

5-Depósito de sangre

6-Sala de calderas

7-Preparación de la carne de cerdos y ovejas

8-Preparación de la carne de bovinos

9-Extracción y desecación de la carne

10-Cuarto para productos de huesos y sangre

11-Almacén de sal

12-Almacén de cueros y pieles

13-Separación de las vísceras y limpieza de los intestinos

14-Almacén de embutidos

15-Sala de inspección de los productos refrigerados

16-Extracción de sebos comestibles

17-Cámara frigorífica para grasas

18-Nave de enfriamiento parabovinos	28-Entrada de los empleados
19-Almacén frío para bovinos	29-Oficina
20-Oficina	30-Oficina del veterinario
21-Cuarto de reposo	31-Laboratorio
22-Aseos	32-Aseos
23-Almacén	33-Sala de máquinas
24-Nave de carga	34-Pasillo
25-Cuarto para pesar	35-Cámara frigorífica para despojos
26-Vestuario	36-Cámara de enfriamiento para cerdos y ovejas
27-Aseos	37-Cámara fría para cerdos y ovejas

1.1.2 Medidas de higiene

Es necesario constituir un sistema de higiene de la carne a lo largo de todas las etapas de producción ya que en la carne se pueden dar abundantes enfermedades y distintos agentes contaminantes y que puede ser derivada de una infección intravital en el animal, de una contaminación secundaria a partir del ser humano o del medio ambiente. Este sistema tiene que comenzar donde tiene su origen el ganado, continuar a través de toda la elaboración de la carne hasta la fase final de distribución al cliente. En este sistema de higiene es necesario establecer un control preciso de las condiciones ambientales en todas las fases del tratamiento, debido a la sensibilidad de la carne a la contaminación microbiológica a partir de las manos de los trabajadores, el equipo, la ropa e incluso del propio aire, etc., debe aumentar el control en las atmósferas cálidas y húmedas o contaminadas y englobar la temperatura y la humedad. Si hay una mayor producción, este control adquiere mayor importancia. Independientemente de otros factores como pueden ser la economía de la producción, la utilidad o estética, el diseño del matadero debe siempre cumplir con las exigencias de higiene determinadas por el país correspondiente.

La naturaleza del control general diario de instalaciones de sacrificio y faenado y de la higiene del personal se basa en la comprobación de que las condiciones generales marcadas por los Reglamentos (CE) nº 852/2004 y 853/2004 son las correctas. Este apartado hace alusión al preoperativo y control de la limpieza y desinfección con una especial atención a los cuchillos, sierras de corte, ganchos, perchas, etc., así como el mantenimiento de instalaciones y equipos, sobre todo de esterilizadores de cuchillos, lavabotas, etc., de manera que se deben de garantizar las más apropiadas condiciones para la realización de un sacrificio higiénico.

También se comprueba la higiene del personal del matadero, comprobando que todas las personas que participan en los trabajos de sacrificio y sangrado están instruidas en las adecuadas prácticas de higiene para las operaciones que llevan a cabo, mantienen siempre un elevado grado de aseo personal, llevan una vestimenta adecuada y limpia y, cuando es necesario protectora.

1.1.3 Patógenos presentes en un matadero

Los agentes biológicos que se pueden encontrar en el ámbito laboral de un matadero proceden de:

1. Animales enfermos y animales portadores asintomáticos, que son la principal fuente de exposición a patógenos (zoonosis).
2. Los microorganismos de este sector alterantes de carne pueden proceder de las partes externas del animal como pueden ser la piel o las pezuñas, los elementos contaminados (estiercol, camas de los corrales, etc.), el sistema de climatización-ventilación, el aire exterior, el propio trabajador, etc., la carne es el reservorio para los microorganismos y en ella se pueden multiplicar, su dispersión es facilitada por las propias actividades del matadero, a veces, en forma de bioaerosoles. Entre los patógenos oportunistas podemos encontrar:

-Bacterias: *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, Enterobacterias (*Escherichia coli*, *Salmonella*), *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Brochothrix*, etc.

-Mohos y levaduras: *Thamnidium*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Sporotrichum*, *Alternaria*, *Mucor*, *Monilia*, *Trichosporon scotti*, *Aspergillus glaucus*, etc.

3. Los cultivos “starter” o cultivos iniciadores son utilizados en diferentes procesos de elaboración de productos cárnicos. Además se dan de forma natural y proliferan sin complicación durante el curado y la maduración de embutidos. Están compuestos esencialmente por bacterias lácticas y hongos (*Pediococcus*, *Debaryomyces* *Kloeckeri*, *Lactobacillus* y *Scopulariopsis alboblavescentes*). Se suelen tratar de agentes biológicos que conllevan poco riesgo aunque pueden generar procesos de sensibilización por su presentación y utilización en forma de liofilizados, de la misma forma que ocurre con las especias y/o aditivos alimentarios, muchos de origen biológico.

1.1.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli fue descubierta por Theodor Escherich quien aisló y caracterizó por primera vez esbeltas varillas cortas de heces para bebés, él las llamó *Bacterium coli commune*, en 1885. Más adelante otros investigadores describieron el organismo con el nombre de *Escherichia coli*, que finalmente fue reconocido en 1954 (Croxen et al., 2013)

Escherichia coli es un bacilo gram negativo, anaerobio abundante en la intestinal humana, a menudo se encuentra de forma inocua internado al lumen intestinal, pero cuando se trata de inmunosuprimidos o cuando las barreras intestinales han sido sobrepasadas las cepas de *E. coli* pueden producir infecciones. Estas infecciones pueden limitarse a superficies mucosas o pueden llegar a diseminarse por todo el cuerpo, las infecciones más comunes producidas por *E. coli* son las enfermedades entéricas y diarreas (Canata et al., 2012). Podemos distinguir las cepas de *Escherichia coli* patógenas de las demás por la capacidad que poseen de producir enfermedades severas como consecuencia de su información genética para la creación de toxinas, capacidad de adhesión y penetración en células huéspedes, la interferencia con el metabolismo celular y destrucción de tejidos.

E. coli es causante de aproximadamente 630 millones de casos de diarrea en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año, afecta especialmente a los niños de países en desarrollo.

Se pueden diferenciar seis tipos de patógenos causantes de diarreas:

- *E. coli* enteropatógena - EPEC

- *E. coli* enterohemorrágica – EHEC
- *E. coli* enterotoxigénica – ETEC
- *E. coli* enteroagregativa – EAEC
- *E. coli* enteroinvasiva – EIEC
- *E. coli* uropatogénica – DAEC2

En lo referente a las infecciones del tracto urinario podemos destacar *E. coli* uropatogénica – UPEC

En un estudio realizado en un matadero se observó presencia de *E.coli* en el 85,71% de las muestras de carne de cerdo y en el 85,71% de las de las muestras de utensilios y de superficies de contacto. La presencia de esta bacteria en la carne refleja una mala calidad higiénica y sanitaria del producto ya que *E. coli* está presente en el tracto gastrointestinal del hombre y es considerada un microorganismo de contaminación fecal. Esta contaminación puede estar asociada a malas prácticas de higiene por parte de los manipuladores, aguas contaminadas que entran en contacto con la carne, superficies de contacto del alimento y utensilios contaminados, y sistemas sanitarios inadecuados. Por otra parte el tracto gastrointestinal de animales como los bovinos es reservorio también de dicha bacteria. Algunas cepas de *E. coli* O157:H7 están relacionadas con enfermedades transmitidas por alimentos que pueden producir no solo cuadros de gastroenteritis sino también, toxiinfecciones (Púa et al., 2014)

1.2 Resistencia a antibióticos

El origen de la palabra antibiótico es griego: anti significa contra, y bio, vida. En 1928 fue descubierto el primer antibiótico, la penicilina por un científico británico, Alexander Fleming, que la descubrió accidentalmente en el curso de sus investigaciones sobre la gripe.

Trascurrió mucho tiempo hasta que la penicilina fue utilizada como medicamento, fue usada en la II Guerra Mundial como tratamiento de infecciones bacterianas este hecho se le atribuye a un farmacéutico australiano llamado Ernest Chain, a partir de este suceso se puede considerar una nueva etapa en el progreso y prescripción de antibióticos (Lavilla Lerma et al., 2014).

Un antibiótico es toda sustancia, que suele ser de bajo peso molecular, fabricada por seres vivos (antibiótico natural) o puede ser modificado de manera artificial a partir

de ella (antibiótico semisintético), que a concentraciones pequeñas tiene un resultado antimicrobiano, después de ser administrado por la vía que corresponda a un organismo receptor. Por lo que podemos decir que son compuestos simples, obtenidos de bacterias u hongos que actúan sobre las bacterias, al interferir en algún proceso del metabolismo donde halla una diana adecuada. Se agrupan según su diana de actuación aunque no posean una estructura química semejante. En las bacterias las dianas más significativas para la actuación de los antibióticos son; pared celular, membrana citoplasmática, la biosíntesis de las proteínas y la síntesis de ácidos nucleicos (Lavilla Lerma et al., 2014).

Un antibiótico es resistente a una bacteria cuando esta es capaz de resistir la inhibición ejercida por el antibiótico, puede deberse al resultado de mecanismos innatos (intrínsecos) o adquiridos. La resistencia intrínseca es un rasgo de una especie bacteriana, por ejemplo la especie puede producir enzimas que destruyan al agente antimicrobiano. Una cepa bacteriana puede adquirir resistencia por mutación o bien por la adquisición de genes exógenos que pueden llegar a modificar la estructura de un antimicrobiano, son normalmente transferibles (SCENIHR, 2009).

La resistencia a los antimicrobianos es un problema mundial que afecta al hombre y también a los animales, que está producido por un mal empleo de éstos. A la hora de la producción de alimentos se usan antibióticos como medicación en animales enfermos, para prevenir enfermedades y también como promotores del crecimiento lo que conlleva a un uso abusivo. El problema se produce cuando los antibióticos utilizados de una forma inadecuada en la industria ganadera son los mismos que se utilizan en la clínica humana por lo que aumenta el riesgo de diseminación de emergencias y de bacterias resistentes, que causan infecciones en el hombre y los animales (WHO, 2012, 2014).

Se realizó un estudio en dos mataderos franceses uno de ganado adulto y otro de terneros, se recolectaron 4 muestras de cada EDAR: aguas residuales, efluente tratado, lodo activado y lodo espesado. Realizaron una enumeración y aislamiento de *E.coli* y para el tratamiento utilizaron 16 antibióticos diferentes.

Se realizó una afiliación a los ocho grupos filogenéticos para los 320 aislados de *E. coli* que se sometieron a las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana.

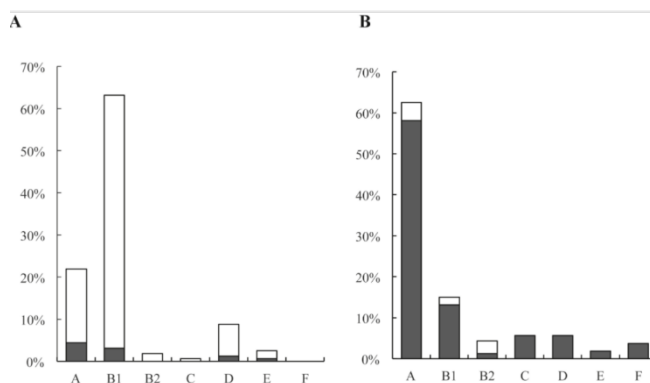


Figura 2: Distribución filogenética de 160 cepas de *E. coli* aisladas de ganado adulto (A) y 160 cepas de *E. coli* aisladas de ternera (B) de matadero. En cada matadero, se analizaron 40 aislamientos de *E. coli* por punto de muestreo. Las barras sólidas indican la proporción de aislados de *E. coli* resistentes a los antibióticos.

En cuanto a la eficiencia de los antibióticos administrados en los dos mataderos hay una clara diferencia de porcentajes respecto a la resistencia a antibióticos. En los aislamientos de ganado adulto, esta bacteria fue principalmente resistente a tetraciclina, ampicilina, sulfonamidas y estreptomicina, y en los aislamientos del matadero de terneros los porcentajes de resistencia fueron más altos para tetraciclina, ampicilina, sulfonamidas, estreptomicina y trimetoprima.

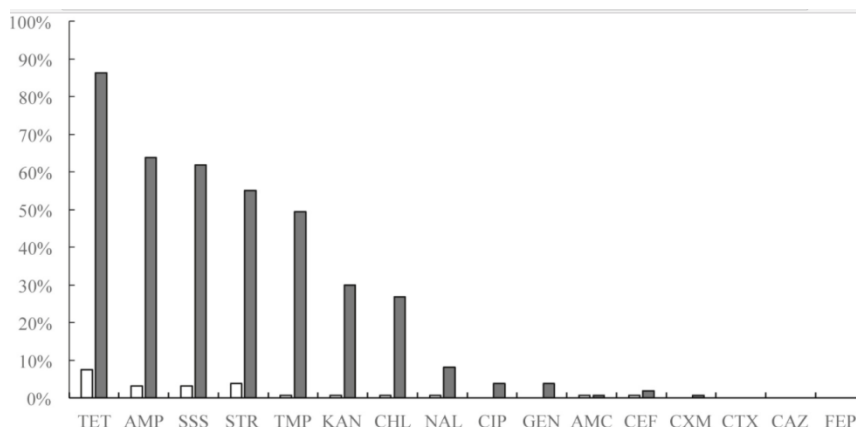


Figura 3: Porcentajes de resistentes a los antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de ganado adulto (barras claras) y becerro bovino (barras sólidas). AMP, ampicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulánico; CAZ, ceftazidima; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CXM, cefuroxime; CHL, cloranfenicol; CIP ciprofloxacina; FEP, cefepima; GEN, gentamicina; KAN, kanamicina; NAL, ácido nalidíxico; SSS, sulfonamidas; STR estreptomicina; TET, tetraciclina; TMP, trimetoprima.

Otras conclusiones que se extraen de este artículo son también que tanto los mataderos de bovinos terneros como en los de adultos, los porcentajes de cepas de *E. coli* resistentes a los antibióticos no se vieron afectados por el proceso de tratamiento de aguas residuales. La cepa más patógena, una STEC 0157: H7, que fue aislada del lodo espesado del matadero de ganado adulto, podría llegar al medio ambiente mediante la aplicación de tierra. Y por último y no menos importante destacar que se detectaron riesgos para la salud pública, y para ello se propuso una gestión adecuada de desechos para reducir la diseminación de cepas de *E. coli* patógenas y resistentes a antibióticos (Um et al., 2016)

1.3 Resistencia a biocidas

Según el Real Decreto 1054/2002 del 11 de octubre, los biocidas son las sustancias activas y preparados que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos (BOE número 247/2002, de 15 de octubre 2002).

Los biocidas están divididos en 23 tipos de productos según su uso, que se pueden clasificar en 4 grandes grupos:

- Grupo 1: Desinfectantes y biocidas generales
- Grupo 2: Conservantes
- Grupo 3: Plaguicidas
- Grupo 4: Otros biocidas

Según su mecanismo de acción, se pueden clasificar en biocidas oxidantes que son los que tienden a oxidar todo tipo de materia orgánica y se acaban de forma rápida en sistemas muy contaminados. Por otro lado están los biocidas no oxidantes que poseen un efecto más dañino y pueden llegar a entrar en las células y alterar el DNA, el RNA o los sistemas de defensa celulares, por lo que estos últimos son los más recomendados. Cada biocida tiene una concentración mínima inhibitoria frente a un microorganismo específico que determina la capacidad para inactivar el crecimiento microbiano (Aguayo et al., 2010).

La diferencia entre los biocidas y los antibióticos es que estos últimos actúan sobre una diana específica y la gran mayoría de los biocidas interaccionan con numerosas moléculas e interfieren en varios procesos fisiológicos aunque a concentraciones bajas o sub-inhibitorias tienen la capacidad de restringir su acción a una sola diana (Lavilla Lerma et., 2014).

La resistencia bacteriana a los biocidas es conocida desde la década de 1950, cuando se produjo la contaminación de formulaciones de biocidas catiónicos. La resistencia se refiere a un aislamiento microbiano que no es susceptible a una concentración determinada de biocida o que no es inactivado por concentraciones que suelen inactivar la mayoría de cepas de un microorganismo. La resistencia ha surgido especialmente por un uso inadecuado o almacenamiento de los compuestos que ha provocado un descendimiento de la eficacia de las concentraciones empleadas hasta ahora (SCENIHR, 2009).

Los factores que pueden hacer disminuir el efecto del desinfectante son la existencia de materia orgánica que funciona como protector de bacterias, la presencia de biofilms y la adaptación de bacterias por la exposición usual a concentraciones subletales de desinfectantes, igualmente los alimentos también pueden facilitar un buen entorno para el desarrollo microbiano (Lavilla Lerma et al., 2013).

En un estudio realizado por Lavilla Lerma et al. (2013) en la universidad de Jaén se evaluó la prevalencia de resistencia a antibióticos y/o biocidas de algunos grupos microbianos como son psicrotrofos, *Pseudomonas* sp., *E. coli*, estafilococos y bacterias del ácido láctico (BAL) a lo largo de la cadena de producción de la carne, desde la sala de sacrificio hasta la obtención producto final en un matadero de cabras y corderos.

Se aislaron cepas resistentes de *Pseudomonas* sp. a lo largo de toda la cadena de producción de la carne mostrando resistencias a la clorhexidina y compuestos de amonio cuaternario como el benzalconio, además los psicrotrofos no pseudomonas mostraron resistencia a la clorhexidina, pero también al triclosán, la mayoría de las bacterias Gram-negativas presentaron más resistencias a los biocidas que las bacterias Gram-positivas. Las bacterias Gram-negativas tienen diferentes resistencias siendo las cepas de *Pseudomonas* sp. más resistentes que las cepas de *E. coli* y esta más que *Staphylococcus* sp. Por otro lado, las BAL se componen

especialmente de *Lactobacillus* sp. que muestran resistencia a la clorhexidina y el triclosán y resistencia media al cloruro de benzalconio y al PHMG.

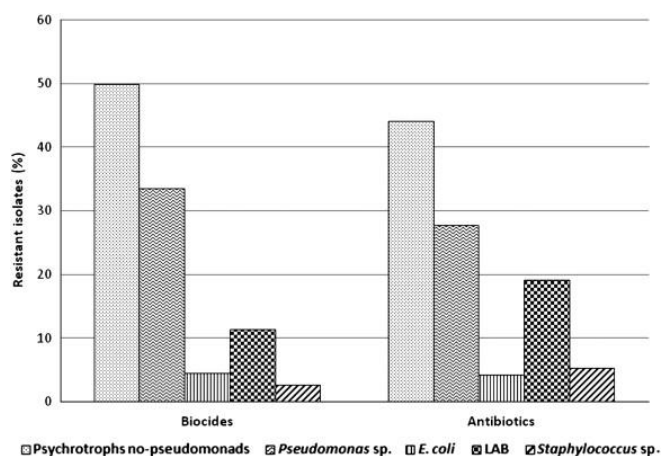


Figura 4: Resistencia a biocidas y antibióticos según el tipo microbiano (Lavilla Lerma et al., 2013)

La mayor cantidad de cepas de *E. coli* resistentes se obtuvo en la sala de sacrificio seguido de la sala de despiece frente al benzalconio, lo que indica contaminación fecal durante el proceso de sacrificio pero no se obtuvieron cepas de *E. coli* en los productos finales que si mostraron psicrotrofos, incluyendo *Pseudomonas* sp.

En la sala de despiece, la resistencia al hexadecilpiridinio, cetrimida y la clorhexidina es la más relevante y en la sala de sacrificio la resistencia al hexaclorofeno, oxonia 6P y PHMG.

La conclusión de este estudio es que para evitar el desarrollo de resistencias en este tipo de mataderos, principalmente en sala de sacrificio y despiece, es recomendable un uso rotatorio de diferentes desinfectantes en un ambiente que se desinfecta con frecuencia. También es necesaria una vigilancia continua en la cadena de producción de alimentos para detectar los fenotipos de resistencias emergentes, además también se podría buscar otros tratamientos que reemplacen los métodos habituales de desinfección como el ozono o las bacteriocinas (Lavilla Lerma et al., 2013).

1.4 Resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas

El uso de biocidas y el uso excesivo de estos en áreas como pueden ser hospitales, industrias alimentarias, hogares e incluso en algunos productos de forma

inapropiada puede llevar a la aparición de tolerancia a diversos biocidas y la resistencia concomitante a los antibióticos. La resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas es ejecutada por la presión selectiva de los biocidas porque la administración de biocidas a baja concentración al ambiente puede aumentar el riesgo de selección de microorganismos resistentes y mantener así la presión selectiva. Para conservar la actividad de los biocidas y evitar la aparición de tolerancia/resistencia a ambos antimicrobianos, se debe tener un uso prudente de biocidas en entornos clínicos y además en aplicaciones veterinarias agrícolas, industriales y otros tipos. Ya se han desarrollado esquemas regulatorios para controlar el uso de biocidas en distintas áreas (UE, Reglamento 528/2012) que cubre distintos productos conteniendo desinfectantes, productos de control de plagas y conservantes.

Los biocidas juegan un papel importante en el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos, lo cual es preocupante y se han realizado varios cambios en la legislación europea y las afirmaciones de un riesgo de uso de biocidas. En el estudio de Lavilla Lerma et al. (2015) se analizó las posibles interconexiones entre los biocidas utilizados habitualmente en la industria alimentaria y los antibióticos utilizados normalmente en tratamientos clínicos, se detectaron correlaciones positivas entre antibióticos, biocidas y la combinación de ambos antimicrobianos que era altamente dependiente de la cepa de *Pseudomonas* sp.

La resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos que se basa especialmente en bombas de eflujo, se detectó principalmente entre PHMG o triclosán y distintos antibióticos dependiendo del biocida y el tipo de población microbiana. La resistencia se vio inducida después de la exposición a bajas concentraciones de desinfectantes como el cloruro de benzalconio, clorhexidina, PHMG o triclosán lo cual causó un aumento en la concentración mínima inhibitoria de casi todos los antibióticos y biocidas en cepas de *Pseudomonas* sp. lo que sugiere una presión de selección cruzada, por lo que la utilización de estos biocidas como desinfectantes en las diferentes áreas del matadero tiene que evaluarse cuidadosamente. Por último, este estudio también llegó a la conclusión que formulaciones industriales específicas como pueden ser el topax 66 y oxonia P3 tienen escasas correlaciones con antibióticos, es decir, deberían tenerse en cuenta a la hora de proceder a la desinfección en el matadero de cabras y corderos donde se realizó el estudio.

2. OBJETIVOS

Hoy en día la resistencia a antibióticos supone un problema de salud pública ya que hay una transferencia o diseminación de genes de resistencia en los diferentes ecosistemas; a nivel de centro de salud, hospitales, ganaderos...etc, tenemos un flujo de genes de resistencia entre los distintos ecosistemas porque todos ellos están altamente interconectados, por lo que hay un incremento de resistencias a causa de esta diseminación. Las bacterias que han sido sensibles a antibióticos y/o biocidas anteriormente pueden ser ahora resistentes debido a la adquisición de genes de resistencia.

Los resultados de una investigación anterior revelaron que había una amplia distribución de bacterias resistentes a lo largo de la cadena de producción de la carne, se encontró que en las zonas más contaminadas con bacterias resistentes eran la sala de sacrificio y la sala de despiece pero también el producto final contenía un número importante de bacterias resistentes a antibióticos y biocidas, lo cual es muy preocupante ya que esto es lo que llega directamente al consumidor.

Es alarmante el incremento de las resistencias porque cada año mueren 25.000 personas en Europa a causa de bacterias resistentes, más que la enfermedad del cáncer o más que los accidentes de tráfico y a nivel mundial unas 700.000 personas. Los objetivos de este estudio fueron:

1. Determinar la resistencia de cepas de *Escherichia coli* a antibióticos.
2. Determinar la resistencia de cepas de *Escherichia coli* a biocidas.
3. Resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Cepas bacterianas

En este estudio, hemos utilizado distintas cepas de *E. coli* fueron aisladas de diferentes áreas de un matadero de Jaén (Figura 5).

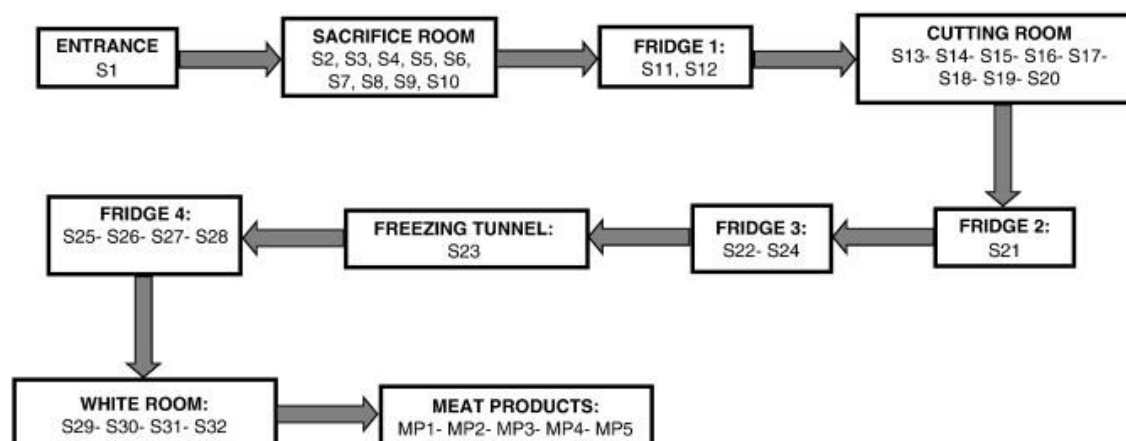


Figura 5: Esquema de flujo de la cadena de producción de carne en un matadero de cordero y cabra de Jaén (Lavilla Lerma et al., 2013).

Para uso rutinario, las diferentes cepas bacterianas (Tabla 1) fueron cultivadas al 1% en medio Triptona Soja Broth (TSB) y preservadas a 4°C. Para su conservación a largo plazo, se almacenaron a -20°C y -80°C, se utilizó como sustancia crioprotectora glicerol puro. Se trabajó con 10 cepas de *E. coli* (Tabla 1).

1-	M12.V.13	Desagüe de la cámara fría
2-	M12.V.04	Desagüe de la cámara fría
3-	M14.V.10.01	Mesa de sala de despiece
4-	M14.V.02	Mesa de sala de despiece
5-	M18.V3.13.2	Cortados de la sala de despiece
6-	M18.V3.13.3	Cortados de la sala de despiece
7-	M21.V.06.1	Desagüe de la cámara 2
8-	M21.V.06.2	Desagüe de la cámara 2
9-	M28.V.07	Suelo de la cámara
10-	M32.V.02.1	Tabla de cortar de la sala blanca

Tabla 1: Procedencia de las diferentes cepas de *E. coli* aisladas de las diferentes zonas del matadero.

Para llevar a cabo las tareas planteadas en este trabajo, se realizaron resiembras periódicas de las diferentes cepas. Para ello se inocularon 20 µl de la cepa en tubos de TSB de 2 ml, y a continuación se incubaron a 37°C durante 24 horas.

3.2 Medios de cultivo

3.2.1 Medio Tryptone Soy Broth (TSB)

El medio TSB se utilizó para la resiembra periódica de *E. coli*, preparándose a partir del medio comercial siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medio Tryptone Soy Broth (PanReac AppliChem), su composición en g/L:

Papaic digestivo de Soja	3 g/l
D(+)-Glucosa	2.5 g/l
Digerido pancreático de caseína	17.0 g/l
di-potasio, fosfato de hidrógeno	2.5 g/l
Cloruro de sodio	5.0 g/l

3.2.2 Medio Mueller-Hinton Broth (MHB)

Se utilizó para realizar las diferentes diluciones del antibiótico y ensayo de la susceptibilidad de las cepas de *E. coli* a los antibióticos. Este medio se preparó según las indicaciones del fabricante.

Medio Mueller-Hinton Broth (Fluka, Analytical), su composición en g/L:

Hidrolizado ácido de caseína	17.5 g/L
Extracto de carne	3 g/L
Almidón	1.5 g/L

3.3. Agentes antimicrobiano

3.3.1 Antibióticos

Los antibióticos ensayados fueron: Tetraciclina, Ampicilina, Eritromicina y Estreptomicina.

Las soluciones de cada antibiótico se prepararon pesando el antibiótico a razón de 10 mg. Tetraciclina y Ampicilina se disolvieron en 5 ml de agua MQ estéril más 5 ml de etanol absoluto quedando un total de 10 ml de antibiótico. Eritromicina y

Estreptomycin fueron disueltos solamente en agua MQ estéril hasta un volumen final de 10 ml. Se obtuvo una concentración final del antibiótico de 1 mg/ml.

Después, a partir de las suspensiones de los diferentes antibióticos (1 mg/ml) se prepararon diluciones a diferentes concentraciones con el caldo MHB para obtener las siguientes concentraciones: 0.5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml, 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 64 µg/ml, 128 µg/ml y 256 µg/ml.

Para ello se prepara la dilución de la concentración más alta y se diluye cada vez $\frac{1}{2}$.

Para preparar la primera dilución, es decir la más alta (se pretende obtener 10 ml de 256 µg/ml), se necesitó 2.56 ml de antibiótico a nuestra concentración final, es decir, 1 mg/ml y 7.44 ml de MHB. Este procedimiento se realiza 2 veces para obtener 2 réplicas de la dilución más alta. Para realizar la siguiente dilución, la de 128 µg/ml se cogen 6 ml de la dilución realizada previamente de 256 µg/ml y se le añaden 6 ml de MHB, para la siguiente (64 µg/ml) igualmente se cogen 6 ml de la dilución anterior realizada de 128 µg/ml y se le añaden 6 ml de MHB, y así sucesivamente hasta realizarlas todas.

Tras preparar estas diluciones se disponen alícuotas en placas de microtitulación de 96 pocillos cada una, en cada pocillo se echa 180 µl de la dilución que corresponda por triplicado y además 20 µl de la bacteria *E. coli* que ha sido cultivada durante 24 horas a 37°C, al adicionar la bacteria se debe resuspender varias veces con la pipeta para mezclar bien la dilución del antibiótico con la bacteria. La dilución que corresponde al control solamente lleva 180 µl del medio MHB sin el antibiótico.

Se utilizaron 4 placas de microtitulación para cada antibiótico y para las 10 cepas de *E. coli*. En los tres primeros pocillos se dispuso la muestra control y en los siguientes las diluciones del antibiótico de más diluida a menos diluida, realizando tres replicas por cada dilución (Figura 6).

Cepa 1	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 2	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 3	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32

Cepa 3	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 4	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 5	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 6	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2

Cepa 6	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 7	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 8	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			

Cepa 9	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			
Cepa 10	C	C	C	0.5	0.5	0.5	1	1	1	2	2	2
	4	4	4	8	8	8	16	16	16	32	32	32
	64	64	64	128	128	128	256	256	256			

Figura 6: Disposición de las cepas y la distribución de las tres réplicas de cada dilución del antibiótico al igual que la muestra control. Cada tabla representa a una placa de microtitulación.

Tras realizar la inoculación de las cepas en los diferentes pocillos y resuspender varias veces se tapan las placas de microtitulación que se introducen en la estufa a 37°C durante 24 horas. Al día siguiente se analiza el crecimiento de la bacteria, primero visualmente, para ver si hay presencia o ausencia de turbidez en el pocillo. A continuación, se utilizó el lector de placas BIO-RAD iMark™ para medir la densidad óptica en el pocillo a longitud de onda de 595 nm.

3.3.2 Biocidas

Los biocidas utilizados en este trabajo fueron: Cloruro de Benzalconio y Clorhexidina.

Se prepararon de la misma forma que los antibióticos pero para disolver los dos biocidas se empleó 5 ml de agua MQ estéril más 5 ml de etanol absoluto. También quedando una concentración final del biocida de 1 mg/ml.

Se siguió el mismo proceso que para los antibióticos tanto como para la preparación de los diferentes biocidas a diferentes concentraciones, como para la disposición de las cepas de *E. coli*, distribución de las concentraciones y réplicas de estas en las placas de microtitulación.

3.4 Determinación de la MIC de los diferentes antibióticos y biocidas

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) es la mínima concentración de antimicrobiano ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. Se ha establecido como “*gold Standard*” comparándose con otros métodos que evalúan la susceptibilidad antimicrobiana, también es capaz de confirmar resistencias inusuales y dar respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos no es determinado (Horna et al., 2005)

Algunas de las ventajas que aporta la MIC son que proporciona concentraciones útiles clínicamente y que permite establecer puntos de corte de sensibilidad y resistencia.

La MIC se determinó de forma visual y mediante el lector de placas BIO-RAD iMarkTM para ambos antimicrobianos (antibióticos y biocidas).

4. RESULTADOS

Tras realizar el correspondiente procedimiento con cada antibiótico y/o biocida e incubarlo durante 24 h en la estufa a 37°C se procedió a la lectura de resultados primeramente de forma visual observando la turbidez o ausencia de esta en cada pocillo, es decir la presencia o ausencia de crecimiento de *E. coli* y después se utilizó el lector de placas BIO-RAD iMark™ para medir la densidades ópticas en cada pocillo. De forma conjunta pudimos determinar la MIC para cada antimicrobiano.

4.1 Susceptibilidad a Antibióticos

Para poder afirmar si cada una de las cepas es sensible o resistente a los cuatro antibióticos utilizados en este estudio se tienen en cuenta los Puntos de Corte “Breakpoints” obtenidos por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (CLSI, 2018).

Los “Breakpoints” o Puntos de Corte son valores que se utilizan para separar la población normal sensible de un determinado grupo de microorganismos de la población resistente. Los puntos de corte epidemiológicos son de gran utilidad para analizar los resultados de sensibilidad cuando no hay suficiente información suficiente para establecer puntos de corte clínicos. Son específicos para cada especie, estan basados en datos epidemiológicos, farmacodinámicos y clínicos; estos puntos de corte son también revisados periódicamente según van apareciendo nuevos datos procedentes de nuevos estudios (Cuenca et al., 2013).

4.1.1 Tetraciclina

Para la tetraciclina, tres de las cepas de *E. coli* (M12.V.04, M14.V.10.01 y M14.V.02) mostraron una MIC de 4 µg/ml, dos de ellas mostrarón una MIC de 32 µg/ml (M18.V3.13.3 y M28.V.07), otras dos mostraron la MIC de 128 µg/ml (M21.V.06.1 y M21.V.09.2), la cepa M12.V.13 mostró una MIC muy baja de 0,5 µg/ml, para la cepa M18.V3.13.2 le correspondió 64 µg/ml y por último para la cepa aislada de la sala blanca M32.V.02.1 se obtuvo una MIC bastante mayor correspondiente a 256 µg/ml (Tabla 2).

CEPA	ORIGEN	Concentraciones de Antibiótico en µg/ml										
		0	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
M12.V.13	C.F.1	1,17±0,07	0,63±0,20	0,67±0,01	0,58±0,01	0,73±0,25	0,54±0,03	0,47±0,01	0,45±0,00	0,52±0,05	0,6±0,01	0,62±0,07
M12.V.04	C.F.1	1,3±0,01	0,9±0,01	0,76±0,00	0,58±0,02	0,48±0,04	0,38±0,01	0,36±0,01	0,35±0,01	0,33±0,05	0,3±0,00	0,44±0,01
M14.V.10.01	S.D.	1,35±0,01	0,84±0,03	0,69±0,02	0,62±0,04	0,74±0,02	0,69±0,01	0,59±0,02	0,45±0,02	0,09±0,09	0,07±0,02	0,12±0,00
M14.V.02	S.D.	0,67±0,04	0,41±0,05	0,39±0,01	0,37±0,02	0,22±0,03	0,31±0,02	0,33±0,01	0,37±0,02	0,29±0,06	0,39±0,02	0,39±0,02
M18.V3.13.2	S.D.	0,98±0,00	0,67±0,00	0,67±0,05	0,66±0,01	0,93±0,03	0,95±0,01	0,93±0,02	0,65±0,05	0,49±0,06	0,39±0,01	0,65±0,01
M18.V3.13.3	S.D.	1,22±0,05	0,47±0,04	0,24±0,00	0,56±0,17	0,74±0,17	0,79±0,16	0,44±0,14	0,32±0,07	0,29±0,02	0,44±0,03	0,68±0,04
M21.V.06.1	C.2	1,15±0,18	1,01±0,02	1,01±0,03	1,03±0,02	1,13±0,19	0,98±0,02	0,94±0,03	0,77±0,02	0,58±0,11	0,4±0,01	0,39±0,02
M21.V.06.2	C.2	1,14±0,16	1±0,01	1,04±0,01	1,04±0,02	1,08±0,21	0,9±0,02	0,85±0,00	0,7±0,00	0,67±0,18	0,48±0,02	0,31±0,03
M28.V.07	C.4	0,74±0,07	0,74±0,02	0,76±0,01	0,75±0,06	0,65±0,04	0,58±0,01	0,52±0,00	0,39±0,02	0,15±0,03	0,24±0,01	0,33±0,03
M32.V.02.1	S.B.	0,89±0,13	0,98±0,02	0,95±0,01	0,81±0,11	0,33±0,29	0,47±0,03	0,46±0,01	0,25±0,00	0,36±0,05	0,4±0,02	0,42±0,02

Tabla 2: Media de las densidades ópticas y desviación estándar correspondiente que se obtuvo para la Tetraciclina tras realizar una media de tres datos ya que se realizó el estudio para cada concentración por triplicado. C.F.1; cámara fría 1, S.D.; Sala de despiece, C.2; cámara 2, C.4; cámara 4, S.B.; sala blanca. La concentración señalada en amarillo es la MIC obtenida en nuestro estudio para cada cepa.

Los datos que se muestran a continuación para enterobacterias (*E. coli*) muestran los Breakpoints para Tetraciclina según CLSI (2018), por lo que se pueden considerar sensible si la MIC se encuentra por debajo o igual a 4 µg/ml, intermedia si es de 8 µg/ml y resistente si es mayor o igual a 16 µg/ml (Tabla 3).

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
C	Tetracycline	30 µg	≥15	–	12–14	≤11	≤4	–	8	≥16
O	Doxycycline	30 µg	≥14	–	11–13	≤10	≤4	–	8	≥16
O	Minocycline	30 µg	≥16	–	13–15	≤12	≤4	–	8	≥16

Tabla 3: Adaptación de tabla (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018).

Según los datos publicados por Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), las cepas M18.V3.13.2, M18.V3.13.3, M21.V.06.1, M21.V.09.2, M28.V.07, M32.V.02.1 se consideran resistentes ya que tienen una MIC superior a 16, por otra parte se consideran; M12.V.13, M12.V.04, M14.V.10.01, M14.V.02 sensibles a la Tetraciclina ya que la MIC obtenida es menor o igual a 4.

4.1.2 Ampicilina

Para la Ampicilina, cuatro cepas de *E. coli* (M12.V.13, M12.V.04, M14.V.02 y M18.V3.13.2) mostraron una MIC bastante alta a una concentración de 256 µg/ml, dos de las cepas (M21.V.06.1 y M21.V.06.2) tuvieron una MIC de 8 µg/ml y para otras dos (M14.V.10.01 y M28.V.07) se obtuvo una MIC de 64 µg/ml, la cepa M18.V3.13.3 mostró una MIC de 128 µg/ml y por último cabe destacar que la cepa procedente de la sala blanca M32.V.02.1, no fue posible determinar la MIC ya que se observó turbidez en todos los pocillos por lo que debía ser superior a 256 µg/ml (Tabla 4).

CEPA	ORIGEN	Concentraciones de Antibiótico en µg/ml										
		0	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
M12.V.13	C.F.1	0,67±0,23	0,36±0,03	0,37±0,02	0,38±0,04	0,82±0,21	0,59±0,02	0,7±0,01	0,72±0,03	0,41±0,00	0,45±0,10	0,28±0,05
M12.V.04	C.F.1	0,77±0,18	0,6±0,01	0,7±0,11	0,75±0,02	0,68±0,07	0,57±0,02	0,56±0,03	0,6±0,05	0,32±0,05	0,43±0,00	0,41±0,04
M14.V.10.01	S.D.	0,78±0,22	0,54±0,02	0,59±0,04	0,6±0,05	0,8±0,27	0,48±0,00	0,45±0,01	0,53±0,01	0,17±0,03	0,2±0,02	0,14±0,03
M14.V.02	S.D.	0,6±0,06	0,66±0,04	0,71±0,01	0,61±0,02	0,48±0,06	0,65±0,03	0,72±0,02	0,67±0,01	0,41±0,06	0,45±0,04	0,35±0,01
M18.V3.13.2	S.D.	0,33±0,12	0,17±0,03	0,29±0,02	0,3±0,02	0,57±0,11	0,59±0,01	0,56±0,04	0,64±0,07	0,43±0,08	0,48±0,04	0,35±0,03
M18.V3.13.3	S.D.	0,6±0,12	0,42±0,03	0,6±0,02	0,59±0,06	0,63±0,13	0,56±0,02	0,64±0,04	0,45±0,01	0,38±0,05	0,31±0,06	0,3±0,01
M21.V.06.1	C.2	1±0,04	1,07±0,04	1,05±0,01	0,92±0,09	0,46±0,04	0,42±0,01	0,43±0,02	0,45±0,03	0,23±0,06	0,33±0,02	0,42±0,02
M21.V.06.2	C.2	1,05±0,02	1,1±0,02	1,09±0,00	0,95±0,01	0,47±0,02	0,37±0,03	0,35±0,01	0,33±0,03	0,27±0,05	0,31±0,02	0,33±0,03
M28.V.07	C.4	0,71±0,02	0,75±0,02	0,74±0,03	0,77±0,02	0,55±0,02	0,48±0,01	0,45±0,03	0,52±0,01	0,32±0,02	0,24±0,01	0,26±0,01
M32.V.02.1	S.B.	0,93±0,03	0,94±0,01	0,93±0,05	0,89±0,05	0,48±0,01	0,48±0,02	0,56±0,03	0,53±0,05	0,8±0,01	0,88±0,04	0,66±0,01

Tabla 4: Media de las densidades ópticas y desviación estandar correspondiente que se obtuvo para la Ampicilina tras realizar una media de tres datos ya que se realizó el estudio para cada concentración por triplicado. C.F.1; cámara fría 1, S.D.; Sala de despiece, C.2; cámara 2, C.4; cámara 4, S.B.; sala blanca. La concentración señalada en amarillo es la MIC obtenida en nuestro estudio para cada cepa.

A continuación se muestran los datos según CLSI para la Ampicilina, si la MIC obtenida es menor o igual a 8 µg/ml la cepa será sensible a Ampicilina, y si por el contrario la MIC es mayor o igual a 32 µg/ml se considera resistente para este antibiótico (Tabla 5):

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
A	Ampicillin	10 µg	≥17	–	14–16	≤13	≤8	–	16	≥32
O	Piperacillin	100 µg	≥21	–	18–20	≤17	≤16	–	32–64	≥128
O	Mecillinam	10 µg	≥15	–	12–14	≤11	≤8	–	16	≥32

Tabla 5: Adaptación de tabla (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)

Se consideran las cepas; M12.V.13, M12.V.04, M14.V.10.01, M14.V.02, M18.V3.13.2, M18.V3.13.3, M28.V.07 resistentes ya que su MIC es mayor que 32 µg/ml de igual forma también consideramos resistente la cepa M32.V.02.1, la cual no tiene su MIC señalada en amarillo porque es superior a 256 µg/ml ya que la cepa de *E. coli* creció en todo los pocillos. Se consideran sensibles a Ampicilina las cepas M21.V.06.1 y M21.V.06.2 ya que sus MICs son inferiores a 8 µg/ml.

4.1.3 Eritromicina

Para la Eritromicina, dos cepas de *E. coli* (M18.V3.13.2 y M32.V.02.1) presentaron una MIC de 4 µg/ml, otra cepa *E. coli* M21.V.06.2 presentó una MIC de 8 µg/ml, otras dos cepas de *E. coli* (M14.V.02 y la M21.V.06.1) mostraron una MIC de 16 µg/ml, tres cepas (M14.V.10.01, M18.V3.13.3 y M28.V.07) mostraron una MIC de 32 µg/ml y para las cepas *E. coli* M12.V.13 y M12.V.04 se obtuvo una MIC de 64 µg/ml (Tabla 6).

CEPA	ORIGEN	Concentraciones de Antibiótico en µg/ml										
		0	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
M12.V.13	C.F.1	1±0,02	0,91±0,01	0,91±0,02	0,81±0,03	0,91±0,02	0,72±0,01	0,66±0,02	0,59±0,03	0,49±0,04	0,36±0,02	0,37±0,01
M12.V.04	C.F.1	1,18±0,05	1,09±0,02	1,09±0,01	1,04±0,12	0,93±0,04	0,83±0,01	0,77±0,03	0,66±0,02	0,43±0,04	0,29±0,01	0,29±0,01
M14.V.10.01	S.D.	1,12±0,03	1,04±0,02	1,08±0,01	0,96±0,13	0,95±0,02	0,82±0,02	0,78±0,02	0,64±0,08	0,44±0,02	0,32±0,01	0,3±0,02
M14.V.02	S.D.	1,09±0,00	1,06±0,00	1,05±0,06	0,97±0,09	0,89±0,02	0,75±0,01	0,64±0,05	0,58±0,02	0,37±0,08	0,27±0,02	0,31±0,02
M18.V3.13.2	S.D.	0,67±0,16	0,47±0,02	0,42±0,02	0,39±0,05	0,57±0,13	0,45±0,02	0,44±0,01	0,42±0,03	0,34±0,08	0,31±0,05	0,31±0,01
M18.V3.13.3	S.D.	0,64±0,19	0,42±0,05	0,38±0,02	0,39±0,02	0,4±0,13	0,3±0,02	0,38±0,01	0,34±0,02	0,35±0,04	0,36±0,03	0,27±0,02
M21.V.06.1	C.2	1,33±0,02	1,26±0,01	1,22±0,02	1,09±0,05	0,85±0,01	0,7±0,02	0,67±0,02	0,62±0,02	0,52±0,03	0,43±0,02	0,41±0,01
M21.V.06.2	C.2	1,31±0,01	1,23±0,01	1,21±0,01	1,1±0,04	0,91±0,01	0,71±0,01	0,65±0,02	0,61±0,03	0,62±0,02	0,49±0,00	0,42±0,01
M28.V.07	C.4	1,18±0,02	1,14±0,02	1,15±0,04	1,08±0,07	0,96±0,05	0,82±0,02	0,72±0,01	0,62±0,01	0,44±0,04	0,33±0,07	0,31±0,01
M32.V.02.1	S.B.	0,59±0,04	0,57±0,01	0,51±0,01	0,43±0,01	0,31±0,02	0,24±0,02	0,25±0,01	0,28±0,02	0,19±0,00	0,19±0,02	0,24±0,02

Tabla 6: Media de las densidades ópticas y desviación estándar correspondiente que se obtuvo para la Eritromicina tras realizar una media de tres datos ya que se realizó el estudio para cada concentración por triplicado. C.F.1; cámara fría 1, S.D.; Sala de despiece, C.2; cámara 2, C.4; cámara 4, S.B.; sala blanca. La concentración señalada en amarillo es la MIC obtenida en nuestro estudio para cada cepa.

Este antibiótico no ha sido incluido aún en el comité europeo de pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, para enterobacterias por lo que no aparece Breakpoints publicados por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018). Según Microbiology guide to interpreting minimum inhibitory concentration (2017) se considera una cepa resistente a la Eritromicina cuando su MIC es igual o superior a 8 µg/ml, intermedia cuando es entre 1 y 4 µg/ml y sensible cuando se encuentra entre 0.25 y 0.5 µg/ml (Tabla 7).

Antibiotic	Susceptible	Intermediate	Resistant breakpoint
Enrofloxacin Gram-negative	0.12–0.5	1–2	4
Enrofloxacin Gram-positive	0.5	1–2	4
Erythromycin	0.25–0.5	1–4	8
Gentamicin Gram-negative	1–4	8	16
Gentamicin <i>Staphylococcus</i>	0.5–4	8	16
Imipenem	1–4	8	16

Tabla 7: Adaptación de tabla (Microbiology guide to interpreting minimum inhibitory concentration, 2017)

Se consideran resistentes las cepas de *E. coli*; M12.V.13, M12.V.04, M14.V.10.01, M14.V.02, M18.V3.13.3, M21.V.06.1, M21.V.06.2, M28.V.07, ya que su MIC es igual o superior a 8, sin embargo se toman como intermedias las cepas M18.V3.13.2 y M32.V.02.1 porque su MIC es igual a 4.

4.1.4 Estreptomina

Para la Estreptomina, se obtuvo una MIC bastante semejante para la mayoría de las cepas, presentando una MIC de 32 µg/ml para las cepas de *E. coli*: M12.V.13, M14.V.10.01, M14.V.02, M18.V3.13.2, M18.V3.13.3 y M28.V.07, otras dos cepas de *E. coli* (M12.V.04, M21.V.06.1 y M21.V.06.2) mostraron una MIC de 64 µg/ml y por último para la cepa aislada de la sala blanca (M32.V.02.1) se obtuvo una MIC de 256 µg/ml (Tabla 8).

CEPA	ORIGEN	Concentraciones de Antibiótico en µg/ml										
		0	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
M12.V.13	C.F.1	0,94±0,03	0,87±0,01	0,92±0,02	0,88±0,04	1,08±0,03	0,86±0,01	0,7±0,04	0,59±0,07	0,53±0,02	0,46±0,07	0,46±0,02
M12.V.04	C.F.1	1,25±0,04	1,19±0,02	1,25±0,01	1,23±0,04	1,16±0,04	0,92±0,02	0,64±0,04	0,61±0,04	0,52±0,03	0,35±0,02	0,35±0,02
M14.V.10.01	S.D.	1,12±0,02	1,03±0,02	1,09±0,04	1,06±0,09	1,12±0,02	0,97±0,03	0,86±0,03	0,66±0,08	0,43±0,03	0,29±0,03	0,32±0,02
M14.V.02	S.D.	1,13±0,01	1,11±0,03	1,17±0,02	1,09±0,07	1,02±0,04	0,81±0,01	0,64±0,02	0,59±0,04	0,45±0,03	0,35±0,01	0,38±0,02
M18.V3.13.2	S.D.	0,7±0,16	0,55±0,01	0,53±0,00	0,57±0,04	0,95±0,16	0,71±0,03	0,53±0,01	0,46±0,03	0,33±0,12	0,31±0,02	0,31±0,02
M18.V3.13.3	S.D.	0,63±0,24	0,56±0,02	0,59±0,03	0,6±0,04	0,79±0,17	0,66±0,03	0,56±0,02	0,41±0,01	0,49±0,12	0,45±0,00	0,36±0,01
M21.V.06.1	C.2	1,28±0,03	1,29±0,02	1,36±0,02	1,35±0,04	1,26±0,00	1,05±0,02	0,88±0,02	0,8±0,09	0,58±0,03	0,56±0,02	0,59±0,01
M21.V.06.2	C.2	1,34±0,01	1,31±0,02	1,39±0,02	1,38±0,04	1,28±0,01	1,03±0,04	0,85±0,02	0,71±0,03	0,62±0,01	0,52±0,01	0,55±0,03
M28.V.07	C.4	1,21±0,02	1,18±0,02	1,22±0,03	1,17±0,08	1,05±0,03	0,81±0,02	0,64±0,02	0,55±0,02	0,32±0,01	0,25±0,02	0,28±0,02
M32.V.02.1	S.B.	0,69±0,01	0,79±0,08	0,75±0,08	0,74±0,01	0,57±0,15	0,48±0,05	0,46±0,01	0,54±0,01	0,62±0,04	0,59±0,01	0,49±0,02

Tabla 8: Media de las densidades ópticas y desviación estándar correspondiente que se obtuvo para la Estreptomicina tras realizar una media de tres datos ya que se realizó el estudio para cada concentración por triplicado. C.F.1; cámara fría 1, S.D.; Sala de despiece, C.2; cámara 2, C.4; cámara 4, S.B.; sala blanca. La concentración señalada en amarillo es la MIC obtenida en nuestro estudio para cada cepa.

La estreptomicina si aparece en la lista de antibióticos para enterobacterias publicada por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018), sin embargo no aparece el dato de la MIC Breakpoint (Tabla 9).

Test/Report Group	Antimicrobial Agent	Disk Content	Interpretive Categories and Zone Diameter Breakpoints, nearest whole mm				Interpretive Categories and MIC Breakpoints, µg/mL			
			S	SDD	I	R	S	SDD	I	R
A	Gentamicin	10 µg	≥15	–	13–14	≤12	≤4	–	8	≥16
A	Tobramycin	10 µg	≥15	–	13–14	≤12	≤4	–	8	≥16
B	Amikacin	30 µg	≥17	–	15–16	≤14	≤16	–	32	≥64
O	Kanamycin	30 µg	≥18	–	14–17	≤13	≤16	–	32	≥64
O	Netilmicin	30 µg	≥15	–	13–14	≤12	≤8	–	16	≥32
O	Streptomycin	10 µg	≥15	–	12–14	≤11	–	–	–	–

Tabla 9: Adaptación de tabla (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018)

De acuerdo con Anonymous (2008), la Breakpoint de la estreptomicina para enterobacterias es de 64 µg/µl, por lo tanto las cepas de *E. coli* (M12.V.04, M21.V.06.1 y M21.V.06.2 y M32.V.02.1) se consideran resistentes, mientras que las cepas de *E. coli* (M12.V.13, M14.V.10.01, M14.V.02, M18.V3.13.2, M18.V3.13.3 y M28.V.07) se consideran sensibles a la estreptomicina.

4.2 Susceptibilidad a Biocidas

4.2.1 Cloruro de Benzalconio

Para el Cloruro de Benzalconio, se obtuvo una MIC bastante homogénea, la mayoría de las cepas de *E. coli* (M14.V.02, M18.V3.13.2, M18.V3.13.3, M21.V.06.1, M21.V.06.2 y M28.V.07) presentaron una MIC de 32 µg/ml, dos cepas de *E. coli* (M12.V.13 y M14.V.10.01) presentaron una MIC de 64 µg/ml; la cepa *E. coli* M12.V.04 mostró una MIC de 128 µg/ml y para la cepa *E. coli* M32.V.02.1 se obtuvo una MIC de 16 µg/ml (Tabla 10).

CEPA	ORIGEN	Concentraciones de Biocida en µg/ml										
		0	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
M12.V.13	C.F.1	0,46±0,05	0,43±0,01	0,4±0,03	0,47±0,03	0,7±0,01	0,74±0,01	0,76±0,01	0,45±0,01	0,25±0,07	0,31±0,06	0,43±0,01
M12.V.04	C.F.1	0,67±0,03	0,72±0,01	0,68±0,01	0,7±0,04	0,66±0,02	0,68±0,00	0,68±0,02	0,68±0,03	0,46±0,08	0,35±0,02	0,44±0,01
M14.V.10.01	S.D.	0,57±0,03	0,63±0,03	0,63±0,01	0,62±0,03	0,53±0,01	0,52±0,02	0,46±0,03	0,38±0,01	0,15±0,10	0,15±0,01	0,24±0,01
M14.V.02	S.D.	0,15±0,06	0,11±0,01	0,7±0,01	0,64±0,02	0,63±0,07	0,65±0,01	0,61±0,01	0,45±0,02	0,21±0,02	0,36±0,01	0,47±0,00
M18.V3.13.2	S.D.	1,03±0,03	1,02±0,02	1,05±0,02	1,02±0,05	1,24±0,02	1,14±0,02	1,04±0,03	0,49±0,07	0,23±0,01	0,3±0,01	0,58±0,02
M18.V3.13.3	S.D.	1,17±0,01	1,14±0,01	1,2±0,01	1,17±0,09	1,17±0,03	0,59±0,02	0,68±0,03	0,3±0,01	0,24±0,00	0,33±0,00	0,43±0,01
M21.V.06.1	C.2	1,37±0,04	1,33±0,05	1,4±0,02	1,42±0,01	1,36±0,03	1,26±0,02	0,89±0,02	0,23±0,00	0,15±0,01	0,18±0,02	0,43±0,01
M21.V.06.2	C.2	1,44±0,02	1,41±0,01	1,47±0,02	1,47±0,03	1,4±0,02	1,3±0,02	1±0,04	0,22±0,01	0,14±0,01	0,16±0,01	0,35±0,01
M28.V.07	C.4	0,82±0,10	0,82±0,00	0,83±0,01	0,84±0,02	0,78±0,08	0,72±0,03	0,69±0,00	0,35±0,01	0,16±0,03	0,32±0,01	0,36±0,01
M32.V.02.1	S.B.	0,86±0,09	0,92±0,02	0,9±0,01	0,88±0,04	0,94±0,09	0,92±0,02	0,32±0,01	0,33±0,02	0,18±0,00	0,24±0,01	0,49±0,01

Tabla 10: Media de las densidades ópticas y desviación estándar correspondiente que se obtuvo para el Cloruro de Benzalconio tras realizar una media de tres datos ya que se realizó el estudio para cada concentración por triplicado. C.F.1; cámara fría 1, S.D.; Sala de despiece, C.2; cámara 2, C.4; cámara 4, S.B.; sala blanca. La concentración señalada en amarillo es la MIC obtenida en nuestro estudio para cada cepa.

Para los biocidas, como no hay existencia de cortes, se ha tomado como punto de corte la concentración de 10 µg/ml, por encima de esta se consideran resistentes y por debajo sensibles al correspondiente biocida. De esta forma todas las cepas se consideran resistentes al Cloruro de Benzalconio porque las MICs obtenidas para todas las cepas es igual o mayor a 16 µg/ml.

4.2.2 Clorhexidina

Para la Clorhexidina también se obtuvieron unas MIC bastante homogéneas, cuatro de las cepas de *E. coli* (M18.V3.13.2, M21.V.06.1, M21.V.06.2 y M32.V.02.1) presentaron una MIC de 4 µg/ml, dos cepas de *E. coli* (M18.V3.13.3 y M28.V.07) mostraron una MIC de 8 µg/ml, para otras dos cepas de *E. coli* (M12.V.04 y M14.V.02) se obtuvo una MIC de 16 µg/ml y para las cepas de *E. coli* M12.V.13 y M14.V.10.01 no se pudo determinar una MIC ya que esta sería superior a 256 µg/ml al presentar turbidez en todos los pocillos para todas las concentraciones (Tabla 11).

CEPA	ORIGEN	Concentraciones de Biocida en µg/ml										
		0	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
M12.V.13	C.F.1	0,94±0,07	0,56±0,06	0,45±0,02	0,52±0,04	0,77±0,06	0,31±0,02	0,29±0,06	0,42±0,02	0,54±0,03	0,49±0,05	0,85±0,03
M12.V.04	C.F.1	1,07±0,07	0,76±0,03	0,73±0,02	0,79±0,04	0,89±0,07	0,34±0,06	0,27±0,04	0,43±0,02	0,4±0,01	0,47±0,02	0,89±0,03
M14.V.10.01	S.D.	1,14±0,08	0,78±0,04	0,75±0,02	0,73±0,06	0,84±0,09	0,26±0,06	0,25±0,01	0,31±0,01	0,46±0,03	0,59±0,03	1,03±0,02
M14.V.02	S.D.	1,03±0,04	0,97±0,02	1,05±0,03	0,87±0,17	0,75±0,03	0,42±0,03	0,28±0,01	0,34±0,03	0,54±0,01	0,8±0,02	1,39±0,02
M18.V3.13.2	S.D.	0,61±0,21	0,47±0,03	0,41±0,01	0,4±0,04	0,54±0,14	0,37±0,02	0,36±0,01	0,4±0,01	0,38±0,13	0,45±0,01	0,47±0,03
M18.V3.13.3	S.D.	0,77±0,21	0,56±0,30	0,72±0,01	0,69±0,08	0,48±0,14	0,29±0,01	0,32±0,01	0,36±0,01	0,41±0,06	0,54±0,01	0,51±0,01
M21.V.06.1	C.2	1,28±0,03	1,24±0,01	1,28±0,01	1,23±0,04	0,22±0,05	0,19±0,02	0,22±0,02	0,25±0,01	0,47±0,01	0,73±0,03	1,39±0,02
M21.V.06.2	C.2	1,32±0,02	1,3±0,01	1,32±0,02	1,2±0,05	0,41±0,04	0,18±0,01	0,19±0,01	0,21±0,01	0,51±0,02	0,72±0,02	1,26±0,03
M28.V.07	C.4	1,22±0,05	0,28±0,01	0,21±0,03	0,26±0,13	0,72±0,02	0,28±0,02	0,21±0,02	0,26±0,00	0,29±0,04	0,39±0,01	1,14±0,01
M32.V.02.1	S.B.	0,68±0,03	0,65±0,01	0,67±0,01	0,74±0,09	0,23±0,00	0,19±0,02	0,21±0,03	0,23±0,01	0,38±0,01	0,62±0,00	1,02±0,02

Tabla 11: Media de las densidades ópticas y desviación estándar correspondiente que se obtuvo para la Clorhexidina tras realizar una media de tres datos ya que se realizó el estudio para cada concentración por triplicado. C.F.1; cámara fría 1, S.D.; Sala de despiece, C.2; cámara 2, C.4; cámara 4, S.B.; sala blanca. La concentración señalada en amarillo es la MIC obtenida en nuestro estudio para cada cepa.

Al tratarse de igual forma de un biocida se toma como punto de corte 10 µg/ml. Las cepas de *E. coli* M12.V.04 y M14.V.02 se consideran resistentes por tener una MIC de 16 µg/ml, también se consideran resistentes las cepas de *E. coli* M12.V.13 y M14.V.10.01 porque al no tener la MIC señalada con amarillo en la tabla significa que es superior a 256 µg/ml, la bacteria creció en todos los pocillos. Por otro lado se consideran sensibles las cepas con una MIC menor que 10 µg/ml, es decir, las cepas de *E. coli* M18.V3.13.2, M18.V3.13.3, M21.V.06.1, M21.V.06.2, M28.V.07 y M32.V.02.1.

4.3 Relación de resistencia/sensibilidad de las distintas cepas con los antimicrobianos utilizados

A continuación se muestra una tabla resumen donde podemos observar las distintas cepas y ver para qué antibióticos y/o biocidas son resistentes y para cuales son sensibles (Tabla 12):

Cepas	Antimicrobianos					
	Tet	Amp	Ery	Str	CB	Ch
M12.V.13	S	R	R	S	R	R
M12.V.04	S	R	R	R	R	R
M14.V.10.01	S	R	R	S	R	R
M14.V.02	S	R	R	S	R	R
M18.V3.13.2	R	R	I	S	R	S
M18.V3.13.3	R	R	R	S	R	S
M21.V.06.1	R	S	R	R	R	S
M21.V.06.2	R	S	R	R	R	S
M28.V.07	R	R	R	S	R	S
M32.V.02.1	R	R	I	R	R	S

Tabla 12: Tet, Tetraciclina; Amp, Ampicilina; Ery, Eritromicina; Str, Estreptomicina, CB, Cloruro de Benzalconio, Ch, Clorhexidina. S, sensible; R, resistente; I, intermedia.

En los siguientes gráficos se pueden observar nuestros datos obtenidos en porcentaje (Figuras 7 y 8):

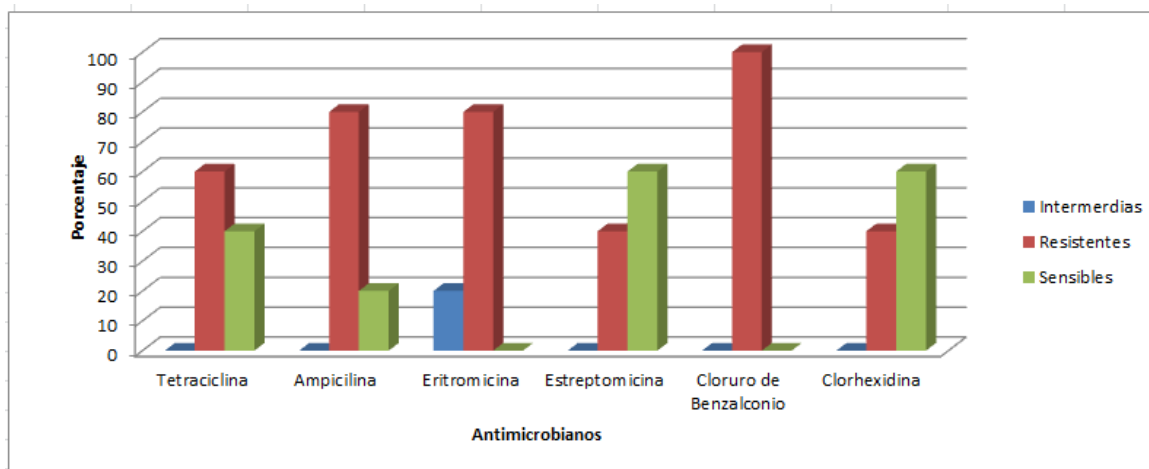


Figura 7: Porcentaje general de resistencias a los antimicrobianos empleados

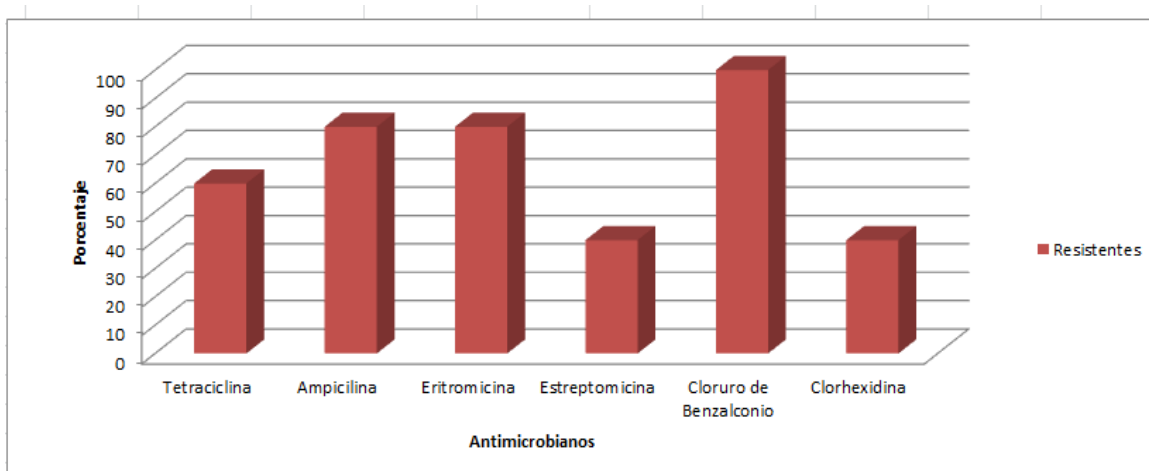


Figura 8: Porcentaje general de cepas de *E. coli* resistentes

A través de los resultados obtenidos en este estudio, se puede afirmar que hay una gran cantidad de resistencias ya que la mayoría de las cepas han mostrado resistencias con al menos tres de los antimicrobianos ensayados. Estos antibióticos son muy usados en hospitales por lo que podría ser un grave problema si estas resistencias llegan a transferirse a la microbiota humana.

Cabe destacar con respecto a los antibióticos que en nuestros resultados para la Tetraciclina y la Estreptomicina se obtiene para la cepa M32.V.02.1 una MIC de 256 $\mu\text{g/ml}$ y para la Ampicilina no se pudo determinar la MIC para dicha cepa ya que sería superior a 256 $\mu\text{g/ml}$ porque presentaron turbidez todos los pocillos, destaco

este dato porque son tres de los cuatro antibióticos ensayados a los que esta cepa presentó resistencia y con una MIC muy alta, es preocupante ya que esta cepa se aisló de la Sala Blanca y es este lugar uno de los últimos de la cadena por donde pasa la carne del matadero antes de llegar al consumidor.

Por otro lado es importante señalar que para el biocida; Cloruro de Benzalconio, todas las cepas presentaron resistencia por lo que este biocida no debe utilizarse para desinfectar las diferentes áreas del matadero siendo sustituido por otros para los que si se presenten unas MIC más bajas y por lo tanto cepas sensibles a los antimicrobianos.

5. DISCUSIÓN

La resistencia a los distintos antimicrobianos se ha convertido en una amenaza a la esencia de la medicina moderna y a la estabilidad de la salud pública mundial ante la amenaza existente con respecto a las enfermedades infecciosas, es una crisis que hay que intentar poner límite con máxima urgencia. La Asamblea Mundial de la Salud de mayo de 2015 realizó un plan de acción mundial que recoge cinco objetivos sobre la resistencia a los antimicrobianos:

- 1- Aumentar la conciencia y comprensión con respecto a la resistencia de los antimicrobianos a través de la comunicación, educación y formación adecuadas.
- 2- Fortalecer los conocimientos y la base científica mediante la vigilancia y la investigación.
- 3- Disminuir el número de infecciones mediante medidas eficientes de saneamiento, higiene y prevención de las infecciones.
- 4- Emplear de manera óptima los medicamentos antimicrobianos tanto en la salud humana como animal.
- 5- Desarrollar argumentos económicos para obtener una inversión sostenible que englobe las necesidades de todos los países y, incrementar la inversión en nuevos medicamentos, medios de diagnóstico, vacunas y otras intervenciones (Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos, OMS, 2016).

En un estudio realizado en Argentina en el que utilizaron cepas de *E. coli* aisladas de cerdos sin diarrea y cerdos con diarrea no necesariamente debida a *E. coli*, los mayores porcentajes de resistencia se obtuvieron frente a los antimicrobianos empleados normalmente en las ganaderías; Ampicilina, Estreptomicina y Tetraciclinas, lo que puede indicar que el empleo continuo y a veces discriminado de un antibiótico puede traer consigo la emergencia de cepas resistentes o multiresistentes (Moredo et al., 2007). En este estudio se han evaluado también los mismos antimicrobianos que utilizó Moredo et al. (2007) además de la Eritromicina ya que hay referencias que indican una alta incidencia de cepas de *E. coli* con alta resistencia a estos antibióticos y como cabía esperar se han obtenido resistencias

siendo la resistencia a Ampicilina y Eritromicina las más prevalentes y a la Estreptomicina la menos prevalente para las distintas cepas de *E. coli*.

En una investigación que se realizó en la Universidad de Jaén por Lavilla Lerma et al. (2014), se tomaron muestras en diferentes lugares del matadero, en la cadena de producción de la carne, para analizar las bacterias resistentes a los antibióticos; bacterias patógenas como *Pseudomonas*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*...etc. Los resultados revelaron que había una amplia distribución de bacterias resistentes a lo largo de la cadena de producción de la carne, las zonas más contaminadas con bacterias resistentes eran la sala de sacrificio y la sala de despiece pero el producto final también contiene un número importante de bacterias resistentes a los antimicrobianos al igual que en este estudio se han encontrado gran cantidad de resistencias y en especial una muy común ha sido la cepa de *E. coli* M32.V.02 en la Sala Blanca, uno de los últimos lugares de la cadena de producción de carne.

España utiliza más antibióticos en el uso veterinario que otros países europeos. En los países nórdicos utilizan menos antibióticos en sus animales y esto se repercute también en la resistencia. En España el antibiótico más utilizado es tetraciclina seguido de penicilina que son betalactámicos, y sulfonamidas (ECDC, 2014).

Estos datos concuerdan con los datos obtenidos por el estudio de Lavilla Lerma et al. (2014) que revelaron que los genes codificantes para la resistencia a tetraciclina son los más prevalentes seguidos de sulfonamidas y betalactámicos, por lo que los antibióticos usados en animales han ejercido una presión selectiva seleccionando las bacterias resistentes a estos antibióticos por lo que el problema lo sabemos, ahora hay que controlarlo (Lavilla Lerma et al., 2014).

Existen también otros antimicrobianos empleados en la industria alimentaria, como por ejemplo los biocidas, la resistencia al triclosán ha sido descrita, ya que este era muy utilizado en la clínica, industria y veterinaria (Bhargava y Leonard, 1996; Jones et al., 2000). Así, nos resultó interesante para este estudio analizar el Cloruro de Benzalconio y la Clorhexidina ya que son dos biocidas que se están utilizando mucho últimamente, el Cloruro de Benzalconio resultó ineficaz para la inhibición de *E. coli* ya que todas mostraron resistencias para él, hay otra investigación que se llevó a cabo para evaluar y certificar su eficacia, este biocida es un compuesto de amonio cuaternario. Fue evaluado en patógenos alimentarios, tres Gram positivos;

Staphylococcus aureus, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus* y tres Gram negativas; *Salmonella typhimurim*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados que obtuvieron mostraron a *Listeria monocytogenes* como la bacteria más sensible y a *Bacillus cereus* como la más resistente debido a su capacidad para formar esporas, este biocida fue más efectivo frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas, con respecto a estas últimas los aislamientos de *Salmonella* fueron menos susceptibles seguidos de *Escherichia coli* (Fazlara et.al, 2012). La ineficacia del Cloruro de Benzalconio estaba ya probada parcialmente en el estudio de Fazlara et al. (2012) pero este estudio reveló una ineficacia total para las cepas aisladas de *E. coli* por lo que debería dejar de utilizarse en los mataderos y utilizar en su lugar otros biocidas y usando siempre estos de forma rotatoria para así evitar que se produzcan las resistencias a estos (Lavilla Lerma et al., 2014).

La OMS está muy preocupada por este tema y ha lanzado una serie de recomendaciones:

- Restringir el uso de antibióticos en animales destinados a la producción de alimentos. Hay datos que confirman que al reducir y restringir se reduce la resistencia en un 39%.

- Reducción general de todas las clases de antibióticos de importancia médica en los animales destinados a la producción de alimentos. Solamente se permite el uso de antibióticos como medida metafiláctica, la resistencia es desde la granja hasta la mesa.

- Administrar antibióticos a animales sanos para prevenir una enfermedad, si ésta ha sido diagnosticada en otros animales de la misma población (OMS, 2017).

La resistencia a los antimicrobianos es un problema de máxima actualidad, en octubre de 2015, la OMS puso en marcha el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los antimicrobianos denominado GLASS, este sistema ha desvelado la existencia generalizada de resistencias a los antibióticos en muestras de 500.000 personas de 22 países en los que se sospechaban infecciones bacterianas. Las bacterias más usualmente resistentes fueron *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella* spp. En pacientes en los que se sospechó una infección sanguínea hubo

una gran variación entre países en cuanto al porcentaje de resistencias, entre un 8% y un 65% de las muestras de *E. coli*, presentaban resistencias al ciprofloxacino, antibiótico que comúnmente se utiliza contra infecciones provocadas por *E. coli* (OMS, 2018).

Desde 2010, la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) se han unido bajo el concepto de Una sola Salud creando una alianza tripartita. Es un enfoque global creado para afrontar el problema de resistencias a nivel mundial, permite la colaboración para la prevención y el control de los riesgos sanitarios en el interfaz hombre-animal-medio ambiente ya que los ecosistemas están altamente interconectados (OIE, 2010).

6. CONCLUSIÓN

Es alarmante el incremento de resistencias que hoy en día existe a los antimicrobianos, es debido a un mal uso que todos realizamos tanto de los antibióticos como de los biocidas por lo que se debe concienciar a la sociedad sobre el incorrecto uso abusivo de estos que se está llevando a cabo. Este problema está amenazando a la seguridad y estabilidad global y el crecimiento económico. Como se ha demostrado en este trabajo no sólo es problema de los hospitales sino que también la industria alimentaria es un importante factor debido a la cantidad de cepas resistentes que se han encontrado a lo largo de la cadena de la carne. Estamos creando bacterias multiresistentes que están poniendo en peligro la vida de miles de personas en todo el mundo por lo que deberíamos promover la investigación de nuevos antibióticos para combatirlas y que éstas no nos ganen la batalla.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aguayo, M. C. L., Burgos, M. J. G., López, R. L., & Gálvez, A. (2010). Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, (23), 121-136.

ANONYMOUS (2008): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard-Third edition Vol 28, CLSI document M31-A3, 1 - 99. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Wayne Pennsylvania, USA.

Bhargava, H. N., & Leonard, P. A. (1996). Triclosan: applications and safety. *American journal of infection control*, 24(3), 209-218.

Canata, M. G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., & Guillén, R. (2016). Molecular characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolates obtained from feces of children with gastroenteritis at the Institute for Social Welfare Central Hospital in 2012. *Pediatría (Asunción)*, 43(1), 13-17.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 822-880.

Cuenca-Estrella, M., Alastruey-Izquierdo, A., Gómez-López, A., & Monzón, A. (2013). Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 53-58.

ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. 2014. Suirveillance of antimicrobial consumption in Europe in 2011.

Fazlara, A., & Ekhtelat, M. (2012). The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 12(1), 23-29.

Horna, G., Silva, M., Taboada, V., & Ortiz, T. Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas

aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.[Rev. Scielo]* 2005.[acceso 15 de diciembre de 2013]**; vol. 16: N 1.

Lavilla Lerma L., Benomar N., Gálvez A., Abriouel H. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *International Journal of Food Microbiology*. 2013; 161: 97–106.

Lerma, L. L., Benomar, N., Knapp, C. W., Galeote, D. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PloS one*, 9(12), e114252.

Lerma, L. L., Benomar, N., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Antibiotic multi-resistance analysis of mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* sp. isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Applied and environmental microbiology*, AEM-01998.

Lerma, L. L., Benomar, N., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2015). Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food microbiology*, 51, 33-44.

Moredo, F. A., Vigo, G. B., Cappuccio, J. A., Piñeyro, P., Perfumo, C. J., & Giacoboni, G. I. (2007). Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 39(4), 227-229.

Ojo, O. E., Ogunyinka, O. G., Agbaje, M., Okuboye, J. O., Kehinde, O. O., & Oyekunle, M. A. (2012). Antibigram of Enterobacteriaceae isolated from free-range chickens in Abeokuta, Nigeria. *Veterinarski arhiv*, 82(6), 577-589.

Pua, A. L., & Navas, N. M. G. (2014). Calidad higiénica y determinación de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en carne de cerdo en expendios de Barranquilla. *@limentech, Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 12(1).

Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas.

SCENIHR (Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks). (2009). Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. European Commission, Health & Consumer Protection.

Um, M. M., Barraud, O., Kérourédan, M., Gaschet, M., Stalder, T., Oswald, E., & Bibbal, D. (2016). Comparison of the incidence of pathogenic and antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains in adult cattle and veal calf slaughterhouse effluents highlighted different risks for public health. Water research, 88, 30-38.

World Health Organization. (2012). The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. World Health Organization.

Páginas web:

<http://www.fao.org/docrep/004/T0566S/T0566S00.HTM>

http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/pncoca/P4_Mataderos_otros.pdf

<http://insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/NTP/NTP/Ficheros/891a925/901w.pdf>

http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>

<http://www.monografias.com/trabajos10/antibi/antibi.shtml>

<https://www.boe.es/boe/dias/2002/10/15/pdfs/A36188-36220.pdf>

<http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/biocidas/>

https://laurieximenez.files.wordpress.com/2012/04/especialidades-2012_diapositivas-4.pdf

<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf;jsessionid=4963CC307B991645045EDC8D2A88D26E?sequence=1>

http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_R7-sp.pdf

[http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2014_2019/plmrep/COMMITTEES/ENVI/P
R/2018/02-26/1140127ES.pdf](http://www.europarl.europa.eu/meetdocs/2014_2019/plmrep/COMMITTEES/ENVI/P
R/2018/02-26/1140127ES.pdf)

[http://www.90.oie.int/sp/FECHAS-CLAVE/CALENDARIO/April/FAO-OIE-OMS-una-
alianza-tripartita-para-Una-sola-Salud](http://www.90.oie.int/sp/FECHAS-CLAVE/CALENDARIO/April/FAO-OIE-OMS-una-
alianza-tripartita-para-Una-sola-Salud)

[http://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-
animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance](http://www.who.int/es/news-room/detail/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-
animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance)

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>

[https://cdn2.hubspot.net/hubfs/413558/09-67064-
01%20Microbiology%20Guide%20Update_V2_L.pdf?t=1489092481255](https://cdn2.hubspot.net/hubfs/413558/09-67064-
01%20Microbiology%20Guide%20Update_V2_L.pdf?t=1489092481255)