



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

ESTUDIOS DE RESISTENCIAS ANTIBIÓTICAS A ENROFLOXACINA EN
MUESTRAS DE CERDO.

STUDIES OF ANTIBIOTIC RESISTANCES TO ENROFLOXACIN IN PIGS
SAMPLES.

Autor

Ingrid Lleberia Sedó

Directores

Rosa María Bolea Bailo

Mariano José Morales Amella

Facultad de Veterinaria

2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	pág. 2
2. ABSTRACT.....	pág. 2
3. INTRODUCCIÓN.....	pág. 3
3.1 Actualidad de la resistencia a los antibióticos.....	pág. 3
3.2 Antimicrobianos y Resistencia genética.....	pág. 4
3.2.1 Antimicrobianos.....	pág. 4
3.2.2 Resistencia genética.....	pág. 4
3.3 Mecanismos de resistencia bioquímica.....	pág. 6
3.3.1 Inactivación o modificación del antibiótico.....	pág. 6
3.3.2 Modificación del sitio blanco del antibiótico.....	pág. 8
3.3.3 Alteración de la permeabilidad de la membrana externa.....	pág. 9
3.4 Bacterias antibiorresistentes en veterinaria.....	pág. 10
3.5 Enrofloxacin. Características del antibiótico.....	pág. 14
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	pág. 15
5. METODOLOGÍA.....	pág. 16
5.1 Características de los animales.....	pág. 16
5.2 Diseño experimental.....	pág. 16
5.3 Toma de muestras.....	pág. 17
5.4 Procesado y cultivo de las muestras.....	pág. 17
5.5 Identificación de los géneros bacterianos.....	pág. 20
5.6 Otros cultivos, tinciones de Gram y el VITEK.....	pág. 21
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	pág. 23
6.1 Naturaleza de los cultivos que mostraron crecimiento bacteriano.....	pág. 23
6.2 Identificación bacteriana mediante cultivos cromogénicos.....	pág. 24
6.3 Análisis de los datos por días.....	pág. 26
7. CONCLUSIONES.....	pág. 31
8. CONCLUSIONS.....	pág. 32
9. VALORACIÓN PERSONAL.....	pág. 33
10. BIBLIOGRAFÍA.....	pág. 34

1. RESUMEN

Las bacterias se hacen resistentes a los antimicrobianos por la adquisición de mecanismos de resistencia a través de procesos genéticos, bien de origen plasmídico o del cromosoma bacteriano. La antibiorresistencia supone una amenaza creciente para la Salud pública y la Sanidad Animal, acentuada por el uso indebido de estos fármacos.

En este trabajo se han estudiado muestras de cerdos que recibieron un tratamiento antibiótico con enrofloxacin. El objetivo de este estudio es la identificación de géneros bacterianos antibiorresistentes presentes en dichos animales, mediante el uso de medios de agar cromogénicos para el aislamiento selectivo de cepas resistentes a la vancomicina y antibióticos betalactámicos. Se han procesado muestras biológicas procedentes de 12 cerdos, obtenidas a lo largo de seis días de tratamiento antibiótico, y se ha determinado que el género bacteriano predominante es *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina. Además, se aprecia un patrón común en la frecuencia de aislamiento bacteriano, a lo largo de todo el estudio; *E. faecium* (62%), *E. coli* (23%), *E. faecalis* (4%) y *K. pneumoniae* (1%). El uso de enrofloxacin supone una modificación de las poblaciones bacterianas presentes en la microbiota de los cerdos. En el caso de *K. pneumoniae*, esta bacteria muestra mayor sensibilidad a la enrofloxacin, y su frecuencia de aislamiento está reducida en el grupo experimental a diferencia del grupo control. Por el contrario, el género *E. coli*, se ve favorecido por el uso de enrofloxacin, y su frecuencia es superior en el grupo experimental, a diferencia del grupo control, en el que no se aisló en ninguna muestra.

2. ABSTRACT

Bacteria become resistant to antimicrobials by the acquisition of resistance mechanisms and genetic processes. Antibiotic resistance is regarded as an increasing threat, which is accentuated by the misuse of the aforementioned drugs in human and in veterinary medicine.

The present study examines samples of pigs, which have been treated with enrofloxacin. The aim is to identify antibiotic-resistant bacterial in these animals, through the use of chromogenic agar media for selective isolation of vancomycin and beta-lactam resistant strains. Samples of 12 pigs, obtained over six days, have been processed and it is determined that vancomycin resistant *Enterococcus faecium* is the predominant bacterial genre. Additionally, throughout this study, it has resulted a common pattern in the frequency of bacterial isolation; *E. faecium* (62%), *E. coli* (23%), *E. faecalis* (4%) and *K. pneumoniae* (1%). The use of enrofloxacin involves a modification of the bacterial populations present in the microbiota of pigs. In this regard, *K. pneumoniae* shows a greater sensitivity to enrofloxacin and its isolation frequency is reduced in the experimental group as opposed to the control group. On the contrary, the genre *E. coli* is

avored by the use of enrofloxacin, its frequency is higher in the experimental group, unlike the control group, in which it was not isolated in any sample.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Actualidad de la resistencia a los antibióticos

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una grave amenaza para la salud humana y el desarrollo económico. El uso excesivo e indebido de los antimicrobianos en humanos, animales y plantas, tanto en un pasado cercano, como en la actualidad han acelerado los procesos evolutivos naturales mediante los cuales los microorganismos patógenos se vuelven resistentes a los tratamientos antimicrobianos. La OMS ha designado la resistencia antimicrobiana (RAM) como uno de los problemas más importantes a los que se enfrenta la salud humana ya que, se considera una de las mayores amenazas para la salud mundial.

Se trata de un problema que implica a varios sectores; la medicina humana, la Veterinaria en todos sus sectores y el sector fitosanitario. Por este motivo en la actualidad, se lleva a cabo un enfoque de colaboración multidisciplinario conocido como “One Health”, en el que participan la OMS, FAO y OIE (1). Dentro del sector de la ganadería, el uso de antibióticos y piensos medicamentosos para combatir las enfermedades, son una herramienta de uso frecuente. El estado de salud de los animales es determinante para la obtención de alimentos seguros. Y el hecho de no disponer de antibióticos eficaces, compromete de forma directa la obtención de alimento inocuo para el ser humano, siendo una vía de entrada de patógenas antibiorresistentes en la cadena alimentaria (2).

Un informe elaborado en 2017 por la *Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria*, la *Agencia Europea de Medicamentos* y el *Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades*, confirma el vínculo entre el consumo de antibióticos y la resistencia a los antibióticos tanto en humanos como en animales productores de alimentos. Este informe demuestra que se da un mayor uso de antibióticos en el sector de los animales de producción, que en humanos. Es el claro ejemplo de la *colistina*, que es usada con gran frecuencia en veterinaria, a la vez que, se ha incrementado el uso en los hospitales como tratamiento de infecciones de determinados patógenos aerobios Gram negativos, en pacientes que no responden a otros tratamientos con antibióticos. Del mismo modo, las *quinolonas* usadas en tratamientos contra la salmonelosis y campilobacteriosis en humanos, se relaciona con el uso de estos antibióticos en los animales de abasto (3).

Es de suma importancia, entender que mecanismos favorecen el desarrollo de resistencia y la relación intrínseca a la hora de aplicar un tratamiento antibacteriano, para reducir la problemática actual de la antibiorresistencia. Además de la búsqueda de nuevos enfoques y estrategias que permitan reducir el uso de antibióticos y uso de estos en casos justificados.

3.2 Antimicrobiano y Resistencia genética.

La emergencia de bacterias resistentes a los antibióticos ha ido paralela a la aparición y uso de nuevos antibióticos para la lucha contra infecciones. La resistencia a los antibióticos es un extraordinario modelo de evolución biológica que se ha descrito desde el principio de la era de los antibióticos. Un ejemplo a destacar es, la importancia inicial de cepas de *Staphylococcus aureus*, capaces de degradar la penicilina y la posterior aparición de esta misma bacteria con resistencia a la meticilina. Estos problemas se fueron resolviendo, sacando al mercado nuevas moléculas modificadas en función de las resistencias del momento. Pero la aparición de nuevas resistencias, es un hecho continuo, que siempre estará presente.

3.2.1 Antimicrobianos

Un agente antimicrobiano se define como una sustancia natural o sintética que mata o inhibe el crecimiento de microorganismos como bacterias, hongos y algas. Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas (4).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno que se ha visto favorecido por los siguientes factores: el uso de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana, la presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico en humanos o animales, el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los diferentes gérmenes, etc. (5).

3.2.2 Resistencia genética

Fundamentalmente existen dos tipos de resistencia presentes en las bacterias, la resistencia natural y la resistencia adquirida.

Resistencia natural o intrínseca.

La resistencia natural es una propiedad específica de las bacterias. Se encuentra en todas las bacterias de una misma especie o grupo bacteriano de manera innata. Se trata mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionados con el incremento de dosis del antibiótico (6). Un ejemplo de ello, es la resistencia natural de *E. coli* a la vancomicina (7).

Resistencia adquirida.

Es variable y la adquiere una cepa de una especie bacteriana concreta. Las bacterias se hacen resistentes a los antimicrobianos por distintos procesos genéticos: aparición de mutaciones en genes cromosómicos o plasmídicos, reorganización genética y adquisición de genes de resistencia mediante procesos de transferencia horizontal (6).

Las mutaciones pueden actuar modificando un solo nucleótido o incluso, producir la modificación de un segmento de ADN. Estas mutaciones se producen como errores de replicación o una reparación incorrecta del ADN dañado. Además, los genes mutados pueden estar codificados en el material genético cromosómico, es decir, en el propio genoma bacteriano, o por el contrario, pueden ser externos a ese genoma, como los plásmidos y transposones (extracromosómicos). En presencia de un determinado antimicrobiano, las bacterias con mutación tendrán ventaja selectiva, llegarán a sobrevivir en ese ambiente desfavorable y con el tiempo se acabará reemplazando a la población original. Otra situación en la que intervienen procesos mutagénicos, se asocia a la presencia de ciertos antibióticos que producen una situación de estrés en las bacterias, generando una respuesta denominada SOS, en la que se activan un tipo de genes que cometen más errores en la replicación del ADN, incrementando de este modo la tasa de mutación bacteriana, y que generen finalmente bacterias mutantes con genes de resistencia a ese antimicrobiano (8). Un ejemplo de mutación en este caso, es el de la resistencia a las quinolonas en *E. coli* que, está causada por cambios en al menos siete aminoácidos en el gen *gyrA* o tres aminoácidos en el gen *parC0*. Y otro ejemplo, en relación a la generación de respuesta tipo “SOS,” es el de la estreptomycin que provoca un fenotipo hipermutable en *E. coli*. (7).

En cuanto a reorganización genética, se relaciona con secuencias de inserción, transposones e integrones. Son elementos genéticos de pequeño tamaño que al interrumpir genes pueden causar resistencia o aumentar la expresión de genes de resistencia lo cual contribuye a un aumento de la resistencia. Pueden integrarse en un plásmido o en el cromosoma del huésped y movilizarse por el genoma bacteriano, de una posición a otra, o hacia un plásmido dentro de la misma bacteria. También, pueden ser transferidos mediante transformación, transducción y conjugación bacteriana, proceso que se observa en algunas bacterias Gram positivas como *Enterococcus* y *Streptococcus* (8).

La transferencia genética horizontal por la que las bacterias adquieren genes de resistencia exógenos puede ocurrir por tres vías: conjugación, transformación o transducción. La más importante es la conjugación, por la cual se produce el paso de cierto tipo de plásmidos presentes en bacterias donantes, a bacterias receptoras. Los genes de resistencia codificados por plásmidos pueden luego integrarse en otros plásmidos o incluso en el cromosoma de la propia bacteria. Otro proceso de transferencia, es la transformación. Permite a las bacterias

incorporar de forma natural moléculas de ADN del entorno, y luego integrarlas en su propio genoma mediante recombinación (6).

Dentro de la resistencia adquirida, también se utilizan denominaciones como resistencia gradual o relativa, que se da cuando se produce un incremento gradual de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a través del tiempo, para obtener un efecto terapéutico adecuado. La susceptibilidad de la bacteria depende de la concentración del fármaco. También existe otra posibilidad más extrema, conocida como resistencia absoluta. La CMI aumenta súbitamente y el incremento de la dosis no surge efecto (9).

En la actualidad se habla del concepto de multirresistencia adquirida (multidrug resistant, MDR) a los antimicrobianos. Se trata de la ausencia de sensibilidad al menos a un antibiótico de tres o más familias consideradas de utilidad para el tratamiento de las infecciones producidas por cada una de las especies bacterianas consideradas (10). Se ha demostrado la resistencia a múltiples fármacos en *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, produciendo β -lactamasas de espectro extendido (ESBL). También *E. faecium* resistentes a vancomicina (VRE), y *S. aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) (7).

3.3 Mecanismos de resistencia bioquímicos.

Los principales tipos de mecanismos bioquímicos que utilizan las bacterias para la defensa son los siguientes: *Inactivación o modificación del antibiótico*, *Modificación del sitio blanco del antibiótico* y *Alteraciones de la permeabilidad de membranas*.

3.3.1 Inactivación o modificación del antibiótico.

Este mecanismo de resistencia se lleva a cabo mediante la producción por parte de la bacteria, de una serie de enzimas que producen la inactivación o modifican las características de un antibiótico determinado. Existen principalmente tres enzimas que inactivan los antibióticos: β -lactamasas, enzimas modificadoras de aminoglucósidos, y cloranfenicol-acetiltransferasas.

Modificación del antibiótico por hidrólisis.

Las β -lactamasas son enzimas de alta prevalencia y distribución. Se conocen alrededor de 300 β -lactamasas diferentes. Estas enzimas, son producidas principalmente por bacterias Gram negativas. Se han descrito con mayor frecuencia en cepas de *K. pneumoniae* y *E. coli*, pero las β -lactamasas de espectro extendido pueden ser producidas por cualquier enterobacteria. Se pueden clasificar según la estructura molecular y en la homología de sus secuencias de aminoácido; las enzimas de clase A son del tipo penicilinasas y carbapenemasas, de clase B metalo- β -lactamasas (Zn), de clase C corresponde a Amp C o cefalosporinasas y las de clase D son oxacilinasas (11). En la actualidad, las carbapenemasas (MBL) suponen una amenaza mundial

ya que inactivan prácticamente al último escalón terapéutico frente a microorganismos Gram negativos multirresistentes. Últimamente, se está produciendo un incremento en la aparición de nuevas familias de estas enzimas y además están causando alarma epidemiológica en multitud de países (12).

Estas enzimas se encuentran codificadas en cromosomas y plásmidos. Los genes que codifican a las β -lactamasas son transferidos por transposones, pero también pueden encontrarse formado parte de integrones. La facilidad en la transferencia a otras bacterias por conjugación, favoreció su rápida dispersión. Las β -lactamasas hidrolizan casi todos los betalactámicos que poseen enlaces éster y amida (penicilinas, cefalosporinas, monobactamas y carbapenems). Son capaces de romper el puente amida del anillo penicilánico o cefalosporánico y producir derivados ácidos sin propiedades bactericidas, esto evita que dichos antibióticos puedan unirse a las proteínas transportadoras (PBP) para impedir la formación de la pared bacteriana, por lo que no se logra la lisis bacteriana (7).

La aparición de estas enzimas se da tras el uso repetitivo de las penicilinas, nuevos betalactámicos, penicilinas semisintéticas y cefalosporinas. También debido a mutaciones de los genes que codificaban las β -lactamasas, produciendo la apareciendo nuevas variantes. Hasta que, en 1983 se describen por primera vez las llamadas β -lactamasas de espectro extendido (ESBL). Las ESBL son resistentes a penicilinas, cefalosporinas de tercera generación, aztreonam, cefamandol, cefoperazona. También son resistentes a las quinolonas, pero su resistencia no depende de plásmidos de resistencia múltiple, sino de mutaciones en genes *gyrA* y *parC*. Estas cepas son propias de *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis* (7). Por el contrario, estas enzimas son sensibles a las metoxi-cefalosporinas y carbapenems. También pueden inactivarse mediante el uso de inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam (13).

Inactivación de antibióticos por transferencia de grupo.

Las transferasas son un grupo de enzimas que inactivan aminoglucósidos, cloranfenicoles, estreptograminas, macrólidos o rifampicina, cuando se produce la unión de un grupo adenilo, fosforilo o acetilo a la periferia de la molécula de antibiótico. Los aminoglucósidos son neutralizados por enzimas específicas: fosforiltransferasas (APH), nucleotidiltransferasas o adenililtransferasas (ANT), y acetiltransferasas (AAC). Estas enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AME) reducen la afinidad de una molécula modificada, impiden la unión a la subunidad ribosomal 30S y proporcionan una resistencia de espectro extendido a los aminoglucósidos y fluoroquinolonas. Las AME se identifican en *S. aureus*, *E. faecalis* y cepas de *S. pneumoniae*. La mayoría de las AME son transferidas por transposones (7).

Inactivación de antibióticos por procesos redox.

Las bacterias patógenas utilizan las reacciones de oxidación y reducción como un mecanismo de resistencia contra los antibióticos. Algunas bacterias pueden utilizar el potencial de óxido-reducción, como mecanismo de evasión del efecto antimicrobiano como ocurre con la oxidación del antibiótico tetraciclina por la enzima TetX, presente en *Streptomyces virginiae*, agente productor de antibiótico M1 del tipo A estreptogramina virginiamicina. La bacteria se protege de su propio antibiótico mediante la reducción de un grupo cetona a un alcohol (11).

3.3.2 Modificación del sitio blanco del antibiótico.

La interacción entre el antibiótico y su sitio de acción en la bacteria, mantiene una relación muy específica, viéndose afectada incluso con pequeños cambios moleculares. Los antibióticos actúan en diferentes sitios de unión según su naturaleza de acción. Pueden actuar en la pared bacteriana, en ribosomas bacterianos, en proteínas de síntesis y de funcionamiento de los ácidos nucleicos (5).

Alteración de la estructura de la pared celular.

La inhibición de la síntesis de la estructura de peptidoglicanos, se realiza mediante antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems, monobactamas) y glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina).

El anillo betalactámico presenta una estructura similar a la región peptídica bacteriana. En condiciones normales, las enzimas PBP (*penicillin binding protein* "proteína ligada a la penicilina"), se unen a los péptidos de la pared, finalizando el proceso de síntesis del peptidoglicano. Por tanto, cuando el antibiótico (anillo betalactámico) se une de forma covalente a la región peptídica, se impide la formación de la pared, lo cual acarrea la muerte bacteriana. El problema de resistencia bacteriana, se inicia cuando se produce la mutación de las proteínas de la pared celular, concretamente en las enzimas que se unen a los péptidos, llamadas también PBP. La presencia de mutación en los PBP conduce a una afinidad reducida a los antibióticos betalactámicos. De este modo se produce la resistencia de *S. pneumoniae* a la penicilina (7).

Los antibióticos glucopéptidos, son una clase de péptidos que contienen azúcares ligados a aminoácidos y actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglicano en un paso metabólico distinto y anterior a los betalactámicos (7). Así actúa la vancomicina, uniéndose a residuos (acil-D-alanil-D-alanina) de precursores del peptidoglicano. Las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* tienen una alta resistencia a la vancomicina y teicoplanina (resistencia de tipo VanA). La resistencia de tipo

VanA se transfiere mediante conjugación. El gen de resistencia VanA se encuentra localizado en el transposón, generalmente localizado en un plásmido (14).

Interferencia de Síntesis de Proteínas e Interferencia de síntesis de ADN.

Algunos antibióticos actúan inhibiéndola síntesis de proteínas uniéndose a las subunidades ribosomales. Las mutaciones en el ARN ribosomal (rARN 23S, rARN no metilado) se asocian con la resistencia a los MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptogramina).

La interferencia en la síntesis de ADN es un mecanismo de resistencia debido una modificación de dos enzimas por mutación: ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y topoisomerasa IV (*parC* y *parE*). Las mutaciones en los genes *gyrA* y *parC*, son seguidas por un fallo de replicación y luego las quinolonas / fluoroquinolonas no pueden unirse. Un ejemplo representativo de este tipo de fenómeno de resistencia es la mutación en el gen *gyrA* en *E. coli*, que causa una disminución de la afinidad con el antibiótico, debido a la modificación del ADN. De este modo, la concentración mínima inhibitoria (CIM) se vuelve más alta (7).

3.3.3 Alteraciones de la permeabilidad de la membrana externa

La envoltura celular es crucial para el mantenimiento de la forma celular y el intercambio de nutrientes o moléculas. Está conformada por la pared celular bacteriana y la membrana plasmática presente en Gram positivos y Gram negativos. Y también, la membrana externa exclusiva de Gram negativos. Estas estructuras son puntos importantes en los que actúan ciertos antibióticos y además, es la vía de ingreso de diversos compuestos antimicrobianos hacia el interior de la célula (11).

Las bombas de eflujo captan el antibiótico desde el compartimiento intracelular, y lo expulsa al exterior evitando la llegada a su sitio de acción en la bacteria. Están ubicadas en la membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas y en el espacio intermembrana de las Gram negativas. Estas bombas pueden ser específicas de antibióticos, aunque la mayoría de ellas son transportadoras de múltiples fármacos que son capaces de bombear una amplia gama antibióticos y por lo tanto contribuyen significativamente a la MDR (7).

Por otro lado, las bacterias son capaces de alterar la permeabilidad de su membrana produciendo cambios de conformación en las porinas. Las porinas son proteínas que se encuentran presentes en la membrana externa de bacterias Gram negativas. Forman canales hidrofílicos en la membrana y seleccionan el ingreso de partículas, de manera que actúan evitando la entrada del antimicrobiano y reduciendo su acción a nivel citoplasmático o de la envoltura celular. Los canales de porinas son la vía de entrada de antibióticos betalactámicos y fluoroquinolonas. El mecanismo de resistencia a nivel de las porinas ocurre por la exposición a

los antibióticos debido a respuestas adaptativas frente a una terapia antibiótica. Este fenómeno de adaptación se traduce con cambios fenotípicos que regulan la función de las porinas. Un ejemplo de este mecanismo es la pérdida de la actividad de porinas OmpC en bacterias Gram negativas, impidiéndose la entrada de antibióticos betalactámicos (11).

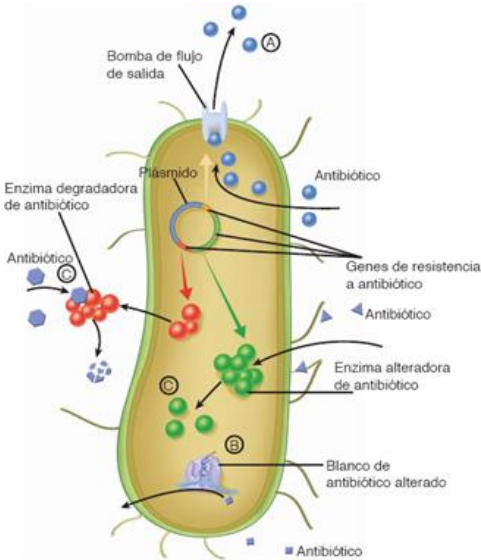


Ilustración 1. Mecanismos bioquímicos de resistencia bacteriana. Kenneth J. Ryan, C. George Ray. Sherris. Microbiología médica, 6e. Mc Graw- Hill. 2017.

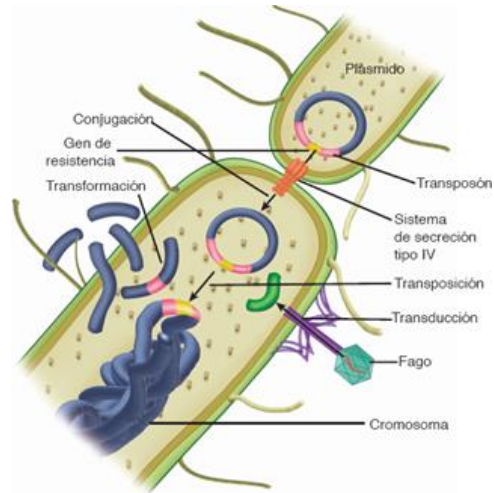


Ilustración 2. Mecanismos genéticos de resistencia bacteriana. Kenneth J. Ryan, C. George Ray. Sherris. Microbiología médica, 6e. Mc Graw- Hill. 2017.

3.4 Bacterias antibiorresistentes en veterinaria

Durante la última década, ha habido una creciente conciencia de los posibles problemas asociados a la salud humana, derivados de la utilización de los antibióticos animales destinados a la producción de alimentos. Los antimicrobianos se usan de forma terapéutica en animales clínicamente enfermos y también de forma preventiva mediante la metafilaxia, cuando existe sospecha de infección bacteriana en un grupo de animales clínicamente sanos. El uso de antibióticos como promotores de crecimiento, no es una práctica legal en Europa, pero si en otros países.

España es uno de los países con más consumo de antibióticos, mayores tasas de resistencia bacteriana y por tanto, contribuyen a la diseminación de estas resistencias al resto de países (15). Dentro del ámbito veterinario, son de especial atención a una serie de bacterias implicadas en las zoonosis, que presentan resistencias elevadas a antibacterianos y con trascendencia en las infecciones causadas en humanos: *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* y *Yersinia enterocolitica*. Se asocian al ganado porcino, vacuno y en avicultura y por tanto en los alimentos de origen animal (16).

Escherichia coli

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es parte de la microbiota intestinal normal en los seres humanos, pero también es una causa común de infecciones. La resistencia en *E. coli* se desarrolla fácilmente a través de mutaciones, como se ve a menudo para la resistencia a las fluoroquinolonas, o mediante la adquisición de elementos genéticos móviles, como plásmidos, para la codificación de mecanismos de resistencia, como la producción de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL) y las carbapenemasas. Estas enzimas confieren resistencia a la mayoría de los antibióticos betalactámicos, incluidos cefalosporinas de tercera generación (17).

Las cefalosporinas y sulfonamidas de primera y segunda generación están clasificadas como agentes antimicrobianos muy importantes para el tratamiento de la infección por *E. coli* en humanos. Varias cefalosporinas se usan ampliamente en la terapia clínica veterinaria. Estas incluyen cefalosporinas de primera, segunda, tercera y cuarta generación. Ocurre lo mismo con las fluoroquinolonas, que son ampliamente usadas, tanto en terapia para humanos como en tratamientos en veterinaria, tanto en el ámbito productivo como en pequeños animales.

Varios estudios han demostrado la presencia de *E. coli* productora de ESBL en animales y en otros productos, como por ejemplo la carne. Este hecho se atribuye, al uso de la cefalosporina de tercera generación y ceftiofur en animales destinados a la producción de alimentos. Desde finales de la década de 1990, se detectó *E. coli* productora de ESBL en la venta al por menor de carne y animales de producción en Europa, Asia, África y los Estados Unidos (18). Otro estudio realizado en Cataluña, en granjas de cerdos, aves y conejos en las que se aislaron cepas de *E. coli* productoras de ESBL y otras β -lactamasas. Demostraba la relación de los animales de producción, como reservorios de estas cepas productoras de resistencia (19). En el 2010, en Suiza también se realizó un estudio en el cual se investigaron muestras fecales de 59 cerdos y 64 bovinos, para determinar la presencia de enterobacterias productoras de ESBL. Se observó que hasta un 15,2% de las muestras porcinas y un 17,1% de las muestras bovinas, resultaron positivas en enterobacterias productoras de ESBL y que de estas, *E. coli* fue la cepa principalmente aislada (20).

Datos más actuales encontramos en el estudio europeo del 2017, realizado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Centrándonos en *E. coli*, este informe revela que en cerdos de engorde se detectaron altos niveles de resistencia a tetraciclinas (52,1%), sulfametoxazol (42,4%), ampicilina (38,5%) y trimetoprim (32,2%). Observándose este patrón común de resistencia en el 48,5% de todos los aislados de *E. coli* MDR (susceptibilidad reducida a varios antimicrobianos) (21).

Salmonella spp.

Una de las principales zoonosis, causadas por bacterias Gram negativas pertenecientes al género *Salmonella*. Es un género bacteriano de amplia difusión mundial, perteneciente al grupo de las enterobacterias y causante de infecciones gastrointestinales (principalmente por *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y otras) que afectan tanto al hombre como a los animales domésticos y silvestres. Actualmente esta bacteria está suponiendo un grave problema, en cuanto a su resistencia a antibióticos convencionales, debido al aumento de su incidencia y severidad de los cuadros clínicos (22).

Según un estudio realizado en 2002 en España, en el que se analizaron unas 40.000 muestras de coprocultivos de personas enfermas realizados entre 1993 y el 2000 se observó que, de un total de 2.924 aislamientos de *Salmonella*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los serotipos predominantes representando respectivamente un 62% y un 24% del total. Se detectó un mayor porcentaje de resistencia a ampicilina (32.3 %) y tetraciclina (23.5 %). Y la resistencia a la ciprofloxacina pasó de ser del 0 % en 1993 al 3,3 % para el año 2000 (23).

Datos más actuales de un estudio europeo realizado en 2017 por la EFSA, analiza datos sobre la resistencia a los antimicrobianos en bacterias zoonóticas, tanto en humanos como en animales destinados a la producción de alimentos. En el caso de *Salmonella* aislada en humanos, *S. Typhimurium monofásica*, tuvo un 80% de MDR. Esta serovariedad se encuentra frecuentemente en los cerdos, que actúan como reservorios principales. En cuanto a los aislamientos de *Salmonella* en las muestras de frotis de la canal de cerdos, los niveles más altos de resistencia se observaron en ampicilina (53%), sulfametoxazol (59.5%) y tetraciclina (56.5%). De las serovariedades de *Salmonella* spp. aisladas en canales de cerdo, y en las muestras del contenido cecal, se demuestra la contribución principal de siete serovares a la aparición de resistencias: *Typhimurium monofásica*, *Derby*, *Typhimurium*, *Rissen*, *Infantis*, *Londres* y *Brandenburg* (ordenados según mayor prevalencia), que representaron el 89% de los aislamientos de *Salmonella* spp. De este informe se puede concluir que *S. Typhimurium monofásica*, fue el serovar con mayor prevalencia detectado en porcino y que el cerdo es huésped de numerosos serotipos de *Salmonella*, que se consideran zoonosis (21).

Otro estudio llevado a cabo por Wiuffet et al. (2003), estudiaron el efecto de la vía de administración y la dosis de el antibiótico enrofloxacina, sobre el desarrollo de la resistencia en *Salmonella* en el intestino de cerdos infectados experimentalmente con *Salmonella*. Descubrieron que, usar intramuscularmente en comparación con la administración oral, y el aumentar la dosis de 3 a 6 veces más que la recomendada, podría reducirse la selección para la resistencia en *Salmonella*. Este estudio indica que una dosis mayor de un agente antimicrobiano

puede ser beneficiosa. Por lo tanto, parece que hay varias opciones disponibles para reducir la selección de resistencia. Sin embargo, se necesitan muchos más datos dentro de este área antes de que puedan surgir recomendaciones (24).

Enterococcus spp.

Actualmente *Enterococcus* es otro género bacteriano que representa un desafío terapéutico, debido a la facilidad de adquisición de mecanismos y genes de resistencia a antibióticos. Esta bacteria Gram positiva de baja patogenicidad, forma parte de la microbiota intestinal y del tracto genitourinario en humanos y animales. *Enterococcus* posee multiresistencia intrínseca de carácter cromosómico a varios antibióticos (betalactámicos, aminoglucósidos y clindamicina) y también resistencia adquirida a través de plásmidos, transposones, intercambio cromosómico y mutaciones espontáneas (25).

La resistencia de este género a los antibióticos, se conoce desde hace tiempo. La resistencia a la vancomicina se remite a los años 90, cuando *Enterococcus* emergió como patógeno nosocomial en humanos y en animales. Esta situación pasada, se asoció con el uso de avoparcina (análogo de vancomicina) como promotor del crecimiento animal por lo que, en 1997 se prohibió su uso en la Unión Europea (26).

La resistencia adquirida a los glucopéptidos de relevancia clínica está mediada principalmente por dos fenotipos: VanA, con resistencia de alto nivel a vancomicina y un nivel variable de resistencia a la teicoplanina y fenotipo VanB, con un nivel variable de resistencia a la vancomicina solamente. El fenotipo VanC media la resistencia intrínseca. El mecanismo bioquímico de resistencia a los glucopéptidos se basa en la modificación de la diana: el pentapéptido de la pared celular terminado en D-Ala-D-Ala, cambia un aminoácido por otro diferente. Los *Enterococcus* también poseen resistencia de bajo nivel a las fluoroquinolonas debido a mutaciones en el gen *parC*, que codifica la subunidad ParC de la topoisomerasa IV, y el gen *gyrA*, que codifica la subunidad GyrA de la ADN girasa (17).

Este género que también ha sido aislado en animales de producción, posee unos mecanismos muy eficaces para transferir ciertos genes de cepas resistentes, a cepas potencialmente patógenas, o que estas mismas cepas provoquen infecciones en pacientes susceptibles. En Europa se realizó un estudio a partir de muestras de cerdos, aves, bovinos, en los que se aisló cepas de *E. faecium* que presentaban resistencia a un antibiótico de uso exclusivo en medicina humana, la vancomicina (27). Otro estudio realizado por De Leener et al. 2005, en el que se tipificaron 59 cepas de *E. faecium* positivas a un gen de resistencia a antibióticos, aisladas de cerdos, pollos de engorde y humanos. Se sugirió el intercambio horizontal del gen de resistencia entre *Enterococcus* humanos y de animales. Y esta transferencia de genes de resistencia podía

darse mediante dos vías. De forma directa, cuando bacterias zoonóticas resistentes infectasen a los humanos. Y de forma indirecta cuando, bacterias resistentes que se originan en animales, transfieren sus genes de resistencia horizontalmente a la población bacteriana humana (28).

3.5 Enrofloxacin. Características del antibiótico

La enrofloxacin es un antibiótico perteneciente a la familia de las quinolonas, en concreto a las fluoroquinolonas (poseen un átomo de flúor). Es un antibiótico de uso exclusivo en veterinario. No obstante, otras quinolonas son usadas con frecuencia en medicina humana. Tiene actividad bactericida y es dependiente de la concentración. Actúa inhibiendo la actividad de las enzimas bacterianas ADN-girasa y la topoisomerasa, que actúan en la replicación del ADN. Las quinolonas pueden clasificarse por su espectro de actividad, en 4 grupos según su generación, la enrofloxacin es una quinolona de tercera generación. Tiene actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, como por ejemplo:

Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella, Escherichia coli, Enterobacter, Campylobacter, Shigella, Salmonella, Aeromonas, Haemophilus, Proteus, Yersinia, Serratia, Vibrio, Brucella, Chlamydia trachomatis, Staphylococcus, Mycoplasma, Mycobacterium (29).

Para las fluoroquinolonas también se han descrito fenómenos de resistencia. La resistencia bacteriana a este antibiótico, se produce por mutación de las enzimas topoisomerasa y ADN-girasa, siendo estas el punto de acción de las fluoroquinolonas. Al principio, este fenómeno de resistencia puede observarse con el ligero aumento de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Este mecanismo de resistencia, se produce por fenómenos de transmisión de material genético exógeno procedente de plásmidos y transposones (30).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural. No obstante, hoy en día es una de las mayores amenazas para la salud mundial y la seguridad alimentaria. El uso indebido de estos fármacos tanto en el ser humano, como en los animales, está acelerando el proceso de resistencia bacteriana. Por ello, se deben tomar medidas que reduzcan el impacto de este proceso descontrolado en el que muchas infecciones comunes y lesiones menores pueden convertirse en enfermedades potencialmente mortales.

El objetivo principal del trabajo es identificar los géneros bacterianos que presenten resistencias antimicrobianas, aislados en muestras de cerdos que han sido sometidos a tratamiento con enrofloxacin. Además, se ha procedido a valorar los cambios que pueden producirse en la población bacteriana tras el efecto del tratamiento antibiótico.

Por ello, los objetivos específicos de este trabajo son:

- Manejo de muestras biológicas y su preparación para su posterior procesado.
- Realización de siembras bacterianas en distintos medios de cultivo, incubación de los cultivos y tinciones de microorganismos (Gram).
- Utilización de los distintos medios de cultivo necesarios para el desarrollo de este trabajo.
- Lectura de los resultados e identificación de las bacterias obtenidas en los cultivos, con capacidad de resistencia a la enrofloxacin y a otros antibióticos.
- Análisis de los resultados y discusión de los mismos.

5. METODOLOGÍA

Para llevar a cabo este estudio, se han utilizado muestras de mucosa rectal y mucosa prepucial o vaginal procedentes de 12 cerdos tratados con el antibiótico enrofloxacin. También se procesaron muestras de un grupo control, el cual no recibió ningún tratamiento. Se analizaron un total de 92 muestras de porcino. De estas, 84 muestras (42 de mucosa rectal y 42 del tracto reproductivo) pertenecen al grupo experimental, y 8 muestras (4 de mucosa rectal y 4 del reproductivo), corresponden al grupo control, formado por dos animales. Las muestras se procesaron y posteriormente se cultivaron en medios cromogénicos de tres tipos (VRE, ESBL, CARB). Así, de cada muestra se realizaron tres cultivos distintos (3x92=276 placas sembradas en distintos medios de cultivo), con la finalidad de buscar la presencia de distintos géneros bacterianos capaces de generar resistencia a los antibióticos.

5.1 Características de los animales.

Este trabajo, forma parte del proyecto “Desarrollo de una solución pionera de autocontrol en animales vivos para minimizar la presencia de residuos de antibióticos en la cadena alimentaria del área transfronteriza España-Francia (TESTACOS)”. Aprobado por la *Comisión ética asesora para la experimentación animal*, con el número de referencia PI58/17.

Los animales procedentes de una explotación ganadera porcina fueron recibidos el 5 de septiembre de 2018 en las instalaciones experimentales de la Facultad de Veterinaria (SAEA). Son animales que llegaron vacunados de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de *Circovirus porcino tipo 2*, y tratados con un tratamiento preventivo contra coccidios. Se alojaron en una nave en la que previamente se realizó un vacío sanitario, donde permanecieron aislados de otros animales. Los lechones se repartieron en varios corrales en los que permanecieron durante todo el experimento. La edad media de los lechones era de 28-30 días, y de un peso medio de 12,76 kg, coincidiendo con la fase del destete. Cada animal fue identificado mediante un crotal, al cual se le asignó una nomenclatura específica según el lote experimental. Además, se les administró un pienso libre de antibióticos y *ad libitum* con los requerimientos nutricionales adecuados para su fase de crecimiento.

5.2 Diseño experimental.

El experimento empieza el 10 de noviembre de 2018, con la administración del tratamiento antibiótico, y finaliza el 12 de diciembre, con la última toma de muestras. El antibiótico utilizado fue *Baytriluno 100mg/ml*[®] solución inyectable, cuyo principio activo es la enrofloxacin. Se administró según la prescripción de la ficha técnica para porcino, con una dosis de 7,5ml/kg mediante una inyección intramuscular profunda en las tablas del cuello. La duración del

tratamiento fue la máxima descrita en el prospecto, dos dosis separadas 48 horas, administradas de manera alterna en ambas tablas del cuello de cada animal según su peso. Se obtuvieron un total de 84 muestras, a lo largo de seis días posteriores a la administración del antibiótico. Del grupo control se recogieron 8 muestras, en otro periodo de tiempo, el 28 de noviembre y el 11 y 12 de diciembre.

El día 19/11, denominado T₀, se corresponde con la última dosis de tratamiento recibida por el lote experimental, y este día se decide tomar muestras de los 12 cerdos, para tener un control previo de la microbiota de los animales objeto de estudio. Los cerdos se muestrearon durante 6 días. El día 22/11(T₁) fue el primer día de muestreo y equivale a 24 horas tras la finalización del tratamiento. Recordemos que cada inyección de antibiótico dura 48 horas. El último día de muestreo es el 27/11(T₆). La distribución de días para la toma de muestras fue la siguiente: 22/11(T₁), 23/11(T₂), 24/11(T₃), 25/11(T₄), 26/11(T₅) y 27/11(T₆). Cada día se muestreaban un total de 6 animales: los dos que iban a sacrificarse y dos hermanos de cada uno de los que se sacrificaban. También se obtuvieron 8 muestras de un grupo de cerdos control, al que no se le administró el tratamiento antibiótico. En este lote se tomaron muestras en dos periodos de tiempo separados por trece-catorce días. Los días de muestreo en este grupo fueron el 28 de noviembre y el 11 y 12 de diciembre.

5.3 Toma de muestras.

Se tomaron las muestras de un total de 12 animales a los cuales se les ha administrado dos dosis inyectadas de enrofloxacin, separadas por 48 horas. Las muestras se toman desde el último día de tratamiento y durante seis días más, tras la finalización del tratamiento (T₀-T₁-T₂-T₃-T₄-T₅-T₆).

La toma de muestras se efectuó teniendo en cuenta las medidas higiénicas pertinentes en cada caso. Las muestras del aparato reproductor externo (mucosa vaginal o mucosa prepucial), se tomaron tras limpiar la zona con papel mojado en una disolución de con *Desinпов iodine*[®] (Povidona iodada 10%), y ayudados con un pequeño espéculo de plástico se recogieron la muestras, utilizando un hisopo de algodón estéril que se guardó en un recipiente de transporte sin medio específico. Para las muestras de mucosa anal, se procedió a limpiar la zona con un papel mojado en una disolución de Povidona iodada; se introdujo el hisopo estéril en el interior de la mucosa anal realizando una ligera rotación y se guardó en un recipiente de transporte sin medio. Todas las muestras se congelaron tras su recogida a -80° C.

5.4 Procesado y cultivo de las muestras.

El estudio realizado en este trabajo se inicia tras recibir las muestras congeladas a -80°C. Al estar las muestras congeladas, se procedió en primer lugar a su descongelación para realizar un pre-

enriquecimiento con el medio *Agar Brain Heart Infusion (BHI)*. Es un medio líquido de enriquecimiento de uso general adecuado para el cultivo de una amplia variedad de tipos de microorganismos. Se introdujeron los hisopos en probetas que contenían dicho medio de enriquecimiento. Se les asignó un código de identificación y se introdujeron en una estufa a 37º C para realizar la incubación durante 24 horas. Tras el periodo de incubación, se procedió a la siembra del contenido de las probetas en tres tipos de medios de cultivos cromogénicos para la identificación de géneros bacterianos con resistencia adquirida a la vancomicina, y a los betalactámicos (VRE, ESBL, CARB). Se realizó una siembra por agotamiento con asas de siembra desechables y posteriormente se introdujeron en la estufa a 37º C para su incubación durante 24 horas. Tras el tiempo transcurrido se sacaron de la estufa y se procedió a la identificación directa de las colonias bacterianas presentes. La identificación de las bacterias aisladas se realizó de forma inmediata gracias a las características exclusivas de los medios de cultivo utilizados.

Los medios utilizados para realizar el cultivo de las muestras de los cerdos son medios cromogénicos específicos y selectivos para el cultivo y la identificación simultánea de microorganismos. Dependiendo del color que adquieren las colonias al crecer en el medio, se pueden identificar de forma inmediata tras 24 horas de incubación. Estos medios (*chromID® de bioMérieux*) contienen sustratos cromogénicos específicos en el agar, junto con peptonas y antibióticos que evitan el crecimiento de ciertos microorganismos favoreciendo de este modo el crecimiento de otros. El sustrato se hidroliza cuando entra en contacto con las bacterias, dando lugar a una coloración específica para una clara identificación. De este modo, facilitan la visualización de los resultados. A parte de los tres medios, se utilizó uno más (*agar MacConkey*), para permitir el crecimiento de otros géneros bacterianos que en las placas cromogénicas podían quedar inhibidos, debido al efecto de los antibióticos presentes en la composición del agar. Así, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

1.-**CHROMID® CARBA**: Medio cromogénico selectivo para la detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas (CPE). Contiene tres sustratos cromogénicos que permiten la identificación presuntiva de la CPE más frecuentemente aisladas: Rosado a Borgoña: *E. coli*, Azul-verde a azul-gris: Grupo KESC (*Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*).



Cuadro 1. Explicación de la coloración del medio de agar cromogénico de BioMérieux.

Bacterias productoras de enzimas carbapenemasas que inducen resistencia a los betalactámicos.
- En verde-gris: *Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*.
- En rosado-borgoña: *E. coli*.

Ilustración 3. Medio ChromID® CARBA. Bacterias productoras de carbapenemasas. www.biomerieux.es

2.-CHROMID® ESBL: Mezcla patentada de antibióticos para el crecimiento selectivo de *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), que ofrece una alta sensibilidad. Mezcla patentada de 3 sustratos para permitir la identificación directa de los productores de ESBL más frecuentes. Aislamiento e identificación de *E. coli* representado por colores rosado a borgoña e identificación de *Klebsiella pneumoniae* representada por colonias de coloración verde. Algunas enterobacterias productoras de β -lactamasas producen colonias incoloras, particularmente cepas de *E. coli* que no poseen una beta-glucuronidasa y cepas de *P. mirabilis* que muestran un crecimiento débil asociado con una baja expresión de la producción de β -lactamasas de espectro extendido.



Ilustración 4. Medio ChromID ESBL. En verde, *K. pneumoniae* productor de β -lactamasas. Imagen por I. LI.

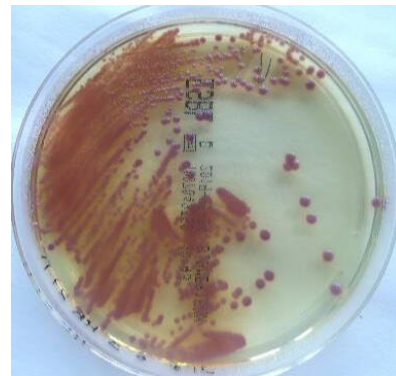


Ilustración 5. Medio ChromID ESBL. En borgoña, *E. coli* productor de β -lactamasas. Imagen por I. LI.

3.-CHROMID® VRE: Medio para el aislamiento y detección específica y selectiva de *Enterococcus* con resistencia adquirida a la vancomicina (VRE). Contiene dos sustratos cromogénicos y una mezcla de antibióticos, incluida la vancomicina. Según el color se puede diferenciar entre *E. faecium* (colonias violetas) cepas productoras de β -galactosidasa y *E. faecalis* (colonias azuladas) cepas productoras de α -glucosidasas resistentes a la vancomicina. Detección de genotipos VanA y VanB. La mezcla selectiva inhibe los *Enterococcus* con resistencia natural (VanC), la mayoría de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.



Ilustración 6. Medio ChromID VRE. En violeta, *E. faecium* resistente a la vancomicina. Imagen por I. LI.



Ilustración 7. Medio ChromID VRE. *E. faecalis* en azul y *E. faecium* en violeta resistentes a la vancomicina. www.biomerieux.es

5.5 Identificación de los géneros bacterianos.

La identificación de los géneros bacterianos aislados en los medios de cultivo, es el objetivo principal de este trabajo. En concreto, interesa poder detectar cepas con resistencia a antibióticos, que están presentes en el tracto digestivo y reproductivo de los cerdos estudiados, tras la administración de un tratamiento antibiótico.

Los medios de cultivo utilizados permiten detectar los grupos bacterianos con antibiorresistencia y a su vez inhiben el crecimiento de bacterias sin importancia para el estudio. Los géneros bacterianos que pueden ser detectados son los siguientes:

1.-Bacterias productor de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL): *E. coli*, *Klebsiella* y *Proteus*. Este tipo de cepas, produce enzimas β -lactamasas, que son capaces de inactivar además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam. Las β -lactamasas que producen pueden ser cromosómicas o extracromosómicas (mediadas por plásmidos). Las cepas productoras de ESBL confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos; pero además los plásmidos que codifican las ESBL portan genes de resistencia (transposones) a otros antimicrobianos como aminoglucósidos, tetraciclinas, etc. Por ello, el fenómeno de resistencia cruzada es muy frecuente y el tratamiento de las infecciones producidas por estas cepas tiene una mayor dificultad (31).

2.-Bacterias productoras de carbapenemasas (CPE): *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*. Se trata de un subtipo de enterobacterias productoras de enzimas carbapenemasas. Estas enzimas son un grupo específico de β -lactamasas con una alta eficiencia catalítica para la hidrólisis de carbapenems. Pero no se limitan a hidrolizar solo a éste grupo de antibióticos sino que, reconocen e hidrolizan casi todos los betalactámicos. Los carbapenems son un grupo de antibióticos betalactámicos de última línea terapéutica; es decir, que se reservan para tratar infecciones que no son sensibles a otros antibióticos. Este fenómeno de resistencia bacteriana (producción de enzimas que inactivan al antibiótico), se transmite por dos vías, la vertical y la horizontal. En la transferencia horizontal intervienen elementos genéticos móviles y adquisición de genes (transposones, integrones) (32).

3.-Bacterias resistencia adquirida a la Vancomicina (VRE): *E. faecium*, *E. faecalis*. Los genotipos VanA y VanB tienen impacto clínico por su capacidad de transferencia de genes de resistencia entre especies y géneros diferentes. Se han encontrado aislamientos clínicos de *Staphylococcus aureus* que portan el genotipo VanA procedente de *Enterococcus*. Las cepas con genotipo VanA presentan alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina. Esta resistencia es inducible por antibióticos glucopéptidos y está codificada a nivel de un transposón, Tn1546, frecuentemente

localizado en un plásmido. Las cepas VanB presentan resistencia inducible de nivel variable a vancomicina pero permanecen sensibles a teicoplanina. Los determinantes de resistencia VanB residen generalmente en el propio cromosoma bacteriano aunque también, pueden estar localizados en plásmidos y ser transferibles como parte de un gran elemento móvil (transposón) (33).

5.6 Otros cultivos, tinciones de Gram y el VITEK®.

En este trabajo también se realizaron otros cultivos bacterianos en medios como Agar MacConkey y Agar Sangre. Se utilizaron como métodos adicionales y complementarios de identificación. Los medios cromogénicos, tal y como hemos indicado anteriormente, son medios que seleccionan el crecimiento de ciertas bacterias, y al llevar en su composición mezclas de antibióticos inhiben el crecimiento de géneros bacterianos que no poseen la capacidad de generar resistencia. Por eso, es necesario la utilización de un medio de cultivo como el Agar MacConkey, que garantice la presencia de bacterias en las muestras, y así asegurar la validez de la muestra; independientemente de que en los medios cromogénicos no se evidencie crecimiento bacteriano. El medio de Agar Sangre, se utilizó solo en determinados casos. En algunas placas cromogénicas se produjo el crecimiento de colonias incoloras. Por este motivo, fue necesario hacer una resiembra de esas colonias en agar sangre y posteriormente realizar tinciones de Gram y otros métodos de identificación, como el *VITEK®2 (Compact) BioMérieux*, para determinar la etiología de esas colonias ausentes de coloración.

1.- **AGAR MACCONKEY:** es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento y la diferenciación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos fermentadores y no fermentadores de lactosa a partir de muestras clínicas. Se sembró en MacConkey al mismo tiempo que se realizaron las siembras en los medios cromogénicos. La siembra por agotamiento se realizó a partir de las probetas con medio líquido BHI que contenían las muestras. Seguidamente, se introdujeron en la estufa a 37°C, junto con las placas cromogénicas y se incubaba durante 24 horas.

2.- **AGAR COLUMBIA + 5% DE SANGRE DE OVEJA:** es un medio nutritivo de uso general para el aislamiento primario de microorganismos exigentes y no exigentes. Se pinchaban colonias de las placas cromogénicas con un hilo de siembra metálico y se sembraban en una placa de agar sangre. Se introdujeron en la estufa a 37°C y se incubaron durante 24 horas.

3.- **TINCIONES DE GRAM:** La tinción de Gram es un tipo de tinción diferencial que se utiliza tanto para poder referirse a la morfología celular bacteriana como para poder realizar una primera aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacterias Gram positivas aquellas

que se visualizan de color morado y bacteria Gram negativa a las que se visualizan de color rosado o rojo.

4.- VITEK® 2 (Compact) BioMérieux: es un instrumento automático diseñado para usarse en aplicaciones de rango bajo a medio en laboratorios tanto clínicos como industriales. El instrumento rellena los pocillos de muestras y realiza las lecturas de incubación/ópticas. VITEK® 2 (Compact) es un instrumento automático de dos pasos para: hidratar reactivos con inóculo de muestras, procesando previamente las tarjetas, incubar las muestras y realizar una lectura continua del crecimiento. Funciona con un software (VITEK® 2 Systems) que recibe las lecturas ópticas del instrumento y realiza los análisis. El instrumento tira después la tarjeta del reactivo finalizada al área de residuos para desecharla.

Este sistema incluye un instrumento VITEK® 2 (Compact), un ordenador (estación de trabajo) y una impresora. El software suministrado con la estación de trabajo incluye programas de análisis y de gestión de datos limitados. Una interfaz informática bidireccional puede transferir los resultados automáticamente al sistema de información de laboratorio del usuario.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras realizar los cultivos bacterianos a partir de las muestras de los animales objeto de estudio, se han obtenido resultados en referencia a las bacterias aisladas que presentan resistencia a la vancomicina, betalactámicos y a la enrofloxacin.

Tabla 1. Datos del estudio. Días de muestreo y número de muestras obtenidas. Cultivos en medios cromogénicos realizados a partir de las muestras (cada muestra se cultiva en tres tipos de medios). Se especifica el número de medios de cultivo que han tenido crecimiento bacteriano y los que no. M: muestras. C: controles.

DÍA	MUESTRAS	CULTIVOS	CON crecimiento bacteriano	SIN crecimiento bacteriano
19	24	72	16	56
22	12	36	10	26
23	12	36	8	28
24	12	36	13	23
25	12	36	11	25
26	8	24	5	19
27	4	12	4	8
CONTROL	8	24	8	16
TOTAL	92	276	75	201
	84M + 8C	252M + 24C	67M + 8C	185M +16C

Se analizaron un total de 92 muestras de porcino. De estas, 84 muestras (42 de mucosa rectal y 42 del tracto reproductivo) pertenecen al grupo experimental, formado por doce cerdos que recibieron el tratamiento antibiótico con enrofloxacin. Y 8 muestras (4 de mucosa rectal y 4 del reproductivo), que corresponden al grupo control, formado por dos animales, que no recibieron tratamiento. Cada una de las muestras fue cultivada en tres medios de cultivo específicos, que permiten el crecimiento de bacterias con resistencia a la vancomicina (medio VRE) y a los betalactámicos (medios ESBL y CARB), y se obtuvo un total de 276 cultivos, de los cuales 252 pertenecen a los animales tratados y 24 al grupo control. Del grupo experimental, solo el 33,5% de los medios de cultivo mostraron crecimiento bacteriano (67 placas), frente al 73,4% de los medios (185 placas) en los cuales no se obtuvo ningún aislamiento bacteriano.

6.1 Naturaleza de los cultivos que mostraron crecimiento bacteriano.

De las 92 muestras obtenidas, la mitad son de origen rectal y la otra mitad del tracto reproductivo. De los 276 cultivos realizados, solo 75 obtuvieron crecimiento bacteriano. El 79% de estos, procedían de muestras de mucosa rectal y solo un 21% de los cultivos eran procedentes de muestras del tracto reproductivo (vaginal o prepucial). Tal y como indica el gráfico, la mayoría de los cultivos con crecimiento bacteriano, proceden de muestras de mucosa rectal.

Tabla 2. Muestras procedentes de la Mucosa Rectal y del Tracto Reproductivo. Se relaciona el número de cultivos obtenidos con crecimiento bacteriano y el tipo de muestra de la cual proceden.

Origen De Las Muestras	Cultivos Obtenidos
M. Rectal	59
Reproductivo	16
Total General	75

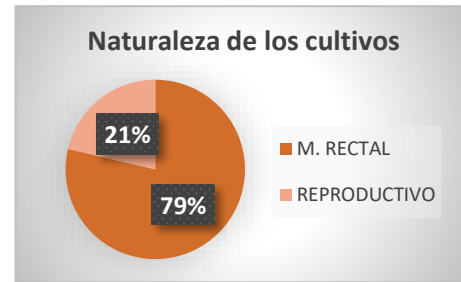


Gráfico 1. Porcentajes de los cultivos procedentes de muestras de la Mucosa Rectal y del Tracto Reproductivo.

6.2 Identificación bacteriana mediante cultivos cromogénicos.

En cuanto a los géneros bacterianos aislados a partir de los medios cromogénicos VRE, ESBL y CARB, podemos determinar lo siguiente. La bacteria *Enterococcus faecium*, que presenta genes de resistencia a la vancomicina (VRE), se aisló en un 62% de los medios de cultivo.

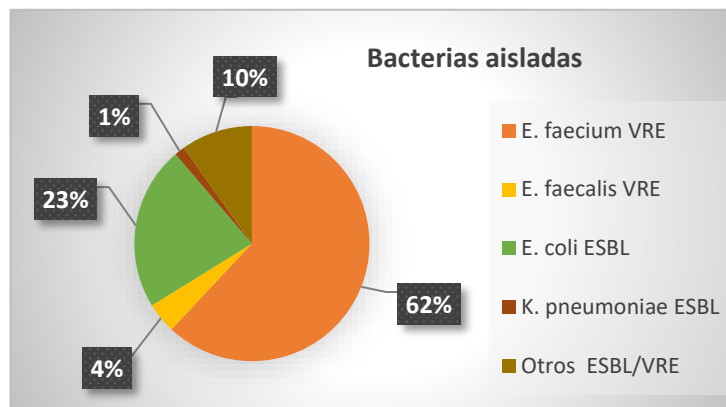


Gráfico 2. Grupo Experimental tratado con enrofloxacin. Porcentajes de los géneros bacterianos aislados en los cultivos cromogénicos a lo largo del estudio. Se observa que la bacteria aislada con mayor frecuencia es *Enterococcus faecium*, representando el 62% de los aislados.

El crecimiento se dio de forma única en 41 placas y de forma mixta junto con *Enterococcus faecalis* en 3 placas. La bacteria *E. faecalis* con resistencia a la vancomicina (VRE) se aisló en un 4% de los medios cromogénicos y siempre en forma de cultivo mixto junto con *E. faecium*. La bacteria *Escherichia coli*, formador de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), se aisló en un 23% de los cultivos con crecimiento bacteriano. La bacteria *Klebsiella pneumoniae*, productora de β -lactamasas de espectro extendido (ESBL), se detectó en un 1% de los aislamientos bacterianos siempre en forma de cultivo mixto junto *E. coli*. No se observó ningún crecimiento, en los medios de cultivos selectivos para bacterias con resistencia a los betalactámicos productoras de carbapenemasas (CARB).

Además de estos aislamientos, que se pudieron detectar mediante la coloración adquirida por cada género bacteriano en su respectivo medio; se produjeron crecimientos bacterianos incoloros en esos mismos medios que representaron un 10% de los aislamientos. En consecuencia, se tuvieron que cultivar de nuevo esas colonias incoloras en medios Agar Columbia enriquecido con sangre de oveja, para proceder a su posterior identificación mediante VITEK® 2 (Compact) BioMérieux. Se pudo determinar que las colonias incoloras aisladas en los medios selectivos para bacterias con resistencia a la vancomicina (VRE), pertenecían a los géneros *Pediococcus pentosacens*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas alcaligenes*. También se dieron crecimientos de colonias incoloras, en los medios selectivos para bacterias con resistencia a los betalactámicos productoras de β -lactamasas (ESBL), y se determinó que pertenecían a géneros como *Sphingomonas paucimobilis*, *Staphylococcus* spp., *Proteus mirabilis*.

Por otro lado, en el grupo control, de un total de 24 cultivos realizados, solo el 33,3% resultaron ser cultivos con crecimiento bacteriano en los medios específicos. Dentro de estos, el 44,4% de los aislamientos correspondieron a *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina y en una sola placa se dio cultivo mixto de *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*. En el otro 44,4% restante, se detectó *Klebsiella pneumoniae* productora de β -lactamasas de espectro extendido que confieren resistencia a los betalactámicos. Tampoco se encontraron crecimientos en los medios específicos para la detección de bacterias productoras de carbapenemasas. Y tampoco hubo ningún aislamiento del género bacteriano *E. coli* productor de β -lactamasas, resistente a los betalactámicos.

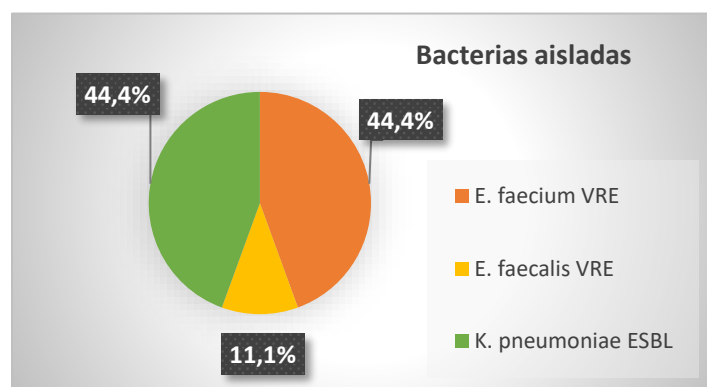


Gráfico 3. Grupo Control que no recibió tratamiento antibiótico. Porcentajes de los géneros bacterianos aislados en los cultivos cromogénicos a lo largo del estudio. Se observa que la bacteria aislada con mayor frecuencia es *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecium*, representando cada uno el 44,4% de los aislados.

6.3 Análisis de los datos por días.

- El día 19/11/2018, denominado T₀, se corresponde con las 24 horas tras finalizar el tratamiento con la enrofloxacina. Este día, se muestrearon todos los animales participantes en el estudio (con excepción del grupo control), para determinar el perfil bacteriano existente en los animales. De un total de doce animales, se obtuvieron 24 muestras. Se cultivó cada una de ellas en tres medios cromogénicos selectivos; VRE, ESBL y CARB. Obteniéndose un total de 72 cultivos, en los que se apreció crecimiento bacteriano en el 22,2% (16 placas). De estas 16 placas, el 81,25% provenían de la mucosa rectal y el resto del aparato reproductivo (vagina o prepucio).

El género bacteriano con mayor frecuencia de crecimiento fue *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina, apareciendo en un 72,2% de los aislamientos de ese día. De este porcentaje, se observó que el 76,92% de los cultivos procedían de muestras de mucosa rectal y el 23,07% restante de muestras del reproductivo.

El segundo lugar, fue para *E.coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido y el género bacteriano aislado con menor frecuencia fue *Enterococcus faecalis*, que se detectó en un 11.1% de los medios de cultivo y siempre en forma de cultivo mixto acompañado por colonias de *E. faecium*.

- El primer día de muestreo, 22/11/2018, denominado T₁, se muestrean un total de 6 animales obteniéndose 12 muestras (6 de mucosa rectal y 6 de reproductivo), se cultivan en los tres tipos de medios (36 medios) de los cuales se obtiene crecimiento bacteriano en el 27,7% de los cultivos (10 placas). El 80,0% de los cultivos provenían de muestras de mucosa rectal y el resto, del tracto reproductivo.

En cuanto al género bacteriano aislado con mayor frecuencia, fue *E. faecium* resistente a la vancomicina con un 54,5%. De este porcentaje se observó que, el 83.3% de los aislamientos de esta bacteria provenían de muestras de mucosa rectal y el resto de reproductivo.

Se aisló también *E. coli* en un 10%, y *E. faecalis* también en un 10% de los aislamientos. *E. faecalis*, creció en forma de cultivo mixto, junto con *E. faecium*. También se detectó el crecimiento de colonias sin coloración, que fueron identificadas a parte y mediante otras técnicas. (Ya explicado en apartado anterior)

- El segundo día de muestreo, 23/11/2018, denominado T₂, se muestrean un total de 6 animales obteniéndose 12 muestras (6 de mucosa rectal y 6 de reproductivo), se cultivan en los tres tipos de medios (36 medios) de los cuales se obtiene crecimiento solo en el 22.2% (8 placas). El 87,5% de los cultivos, provenían de muestras mucosa rectal y el resto del tracto reproductivo. En cuanto al género bacteriano aislado con mayor frecuencia fue otra vez, *E. faecium* resistente a la vancomicina con un 77,7%. De este porcentaje se observó que, el 85,7% de los aislamientos de

este género bacteriano, provenían de muestras de mucosa rectal y el resto, a partir de muestras del reproductivo.

Además, se aisló *E. coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de β -lactamasas, cada uno con un 11,1% de frecuencia de aislamiento.

- El tercer día de muestreo, 24/11/2018, denominado T₃, se muestrean un total de 6 animales, obteniéndose 12 muestras, la mitad procedentes de mucosa rectal y la otra mitad del tracto reproductivo. Se cultivan en los tres tipos de medios (36 medios), de los cuales se obtiene crecimiento bacteriano del 36,1% (13 placas). El 61,5% de los cultivos provienen de muestras de mucosa rectal, y el 38,5% restante, de muestras del reproductivo.

En cuanto al género bacteriano con mayor frecuencia de aislamiento, se encuentra la bacteria *E. faecium*, en un 61,5%. De este porcentaje, el 62,5% de los aislamientos de esta bacteria, procedían de muestras de mucosa rectal y el 37,5% restante, de muestras de origen reproductivo.

En segundo lugar, se aisló el género bacteriano *E. coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido, con una frecuencia del 23,07% y en menor proporción, se detectaron colonias sin coloración, que fueron identificadas mediante otras técnicas.

- El cuarto día de muestreo, 25/11/2018, denominado T₄, se muestrearon también 6 animales, se cultivan las 12 muestras (6 de mucosa rectal y 6 del reproductivo) en los tres tipos medios (36 medios) y se obtiene crecimiento en el 30,5% de los medios (11 placas). De estos, el 72,7% corresponden a muestras de la mucosa rectal y el 27,3% de los cultivos a muestras de origen reproductivo.

El género aislado con mayor frecuencia en los cultivos, fue *E. faecium* resistente a la vancomicina en un 45,4% y *E. coli* productor de β -lactamasas, en la misma proporción. De los aislados de *E. faecium*, el 80% de estos provenían de muestras de mucosa rectal, y el 20% restante de los aislamientos, procedían de muestras del tracto reproductivo. En los aislamientos de *E.coli* se determinó que, un 60% de los aislados de esta batería procedían de muestras de mucosa rectal y el 40%, del reproductivo.

En el 20% restante de los aislamientos, se observaron colonias sin coloración. Y se recurrió al sistema VITEK® 2 (Compact) BioMérieux para determinar su identidad

- El quinto día de muestreo, 26/11/2018, denominado T₅, se muestrearon 4 animales, de los que se obtuvieron 8 muestras (4 de mucosa rectal y 4 del reproductivo), y se cultivan en los tres tipos de medios (24 cultivos). De los 24 medios de cultivo efectuados, solo el 20,8% (5 placas) muestran crecimiento bacteriano. De estos medios, el 80% corresponden a muestras de la mucosa rectal y el 20% restante de los cultivos, a muestras del tracto reproductivo.

El género bacteriano con mayor frecuencia de aislamiento, fue *E. faecium* resistente a la vancomicina, en un 80%. Dentro de este porcentaje, un 75% de los aislamientos de esta

bacteria, provienen de muestras de mucosa rectal, y el 25% restante a muestras del reproductivo.

En segundo lugar, se aisló en un 20%, el género *E.coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido.

- El sexto y último día de muestro fue el 27/11/2018, denominado T₆. Se muestrearon solo 2 animales ya que son los únicos que quedaban vivos, y se obtuvieron 4 muestras (2 de mucosa rectal y dos del reproductivo). Las muestras se cultivan en los tres medios de cultivo (12 cultivos) y se obtiene crecimiento en un 33,3% de los medios (4 placas). De estos, el 100% de las muestras provienen de la mucosa rectal.

El género bacteriano que se aisló con mayor frecuencia, fue *E. coli* productor de β -lactamasas, que se detectó en un 50% de los aislamientos. Dentro de este porcentaje, el 100% de los aislamientos provenían de muestras de la mucosa rectal.

En segundo lugar, se aisló el género *E. faecium* resistente a la vancomicina, en un 25%. Y en el resto, se detectaron colonias bacterianas incoloras, las cuales se identificaron a parte y mediante otros métodos.

Tabla 3. Resumen del Análisis por días.

DÍAS MUESTREO	CULTIVOS TOTALES	CULTIVOS CRECIMIENTO BACTERIANO	NATURALEZA DE LOS CULTIVOS	GÉNERO BACTERIANO PREDOMINANTE
19	72	16	81,25% M.R/ 18,75% REPR.	72,2% <i>E. faecium</i> : -76,92 % M.R -23,07 % REPR.
22	36	10	80,0% M.R/ 20,0% REPR.	54,5% <i>E. faecium</i> : -83,33 % M.R -16,66 % REPR.
23	36	8	87,5% M.R/ 12,5% REPR.	77,7% <i>E. faecium</i> : -85,71 % M.R -14,28 % REPR.
24	36	13	61,5% M.R/ 38,5% REPR.	61,5% <i>E. faecium</i> : -62,5 % M.R -37,5 % REPR.
25	36	11	72,7% M.R/ 27,3% REPR.	45,4% <i>E. faecium</i> : -80 % M.R -20% REPR.
26	24	5	80,0% M.R/ 20,0% REPR.	80% <i>E. faecium</i> : -75 % M.R -25 % REPR.
27	12	4	100,0% M.R	50% <i>E. coli</i> : -100 % M.R
Control	24	8	87,5% M.R/ 12,5% REPR.	44,4 % <i>Klebsiella</i> y <i>E. faecium</i>

Días muestreo y cultivos totales se observa el número de cultivos totales realizados a lo largo de los días de muestreo. Al lado, se puede apreciar, el número de **cultivos con crecimiento bacteriano**. En **Naturaleza de los cultivos**, se indica la proporción de los cultivos que provienen de muestras procedentes de mucosa rectal (M.R) y los que provienen de muestras del tracto reproductivo (REPR.) En **género bacteriano predominante**, se observa que bacteria aparece con mayor frecuencia de aislamiento en ese día, y la proporción de los aislamientos que provienen de muestras de mucosa rectal y del tracto reproductivo.

A partir de estos datos se puede determinar que, la mayoría de los medios de cultivo que presentan crecimiento bacteriano, proceden de muestras de la mucosa rectal de los cerdos. También se observa que, el género bacteriano aislado con mayor frecuencia corresponde con *Enterococcus faecium* y además se aprecia un mismo patrón a lo largo de todo el estudio; *E. faecium*, *E. coli*, *E. faecalis* y por último *K. pneumoniae* (de mayor a menor frecuencia de aislamiento). Podríamos afirmar que, el tratamiento con la enrofloxacin tiene un efecto inhibitorio para cierto tipo de microbiota y potenciador para otros microorganismos, como puede ser el género *Enterococcus*. No obstante, hay que tener en cuenta el efecto selectivo de los medios de cultivo, ya que contienen mezclas de antibióticos en su composición, y solo permiten el crecimiento a aquellas cepas capaces de producir resistencia a los antibióticos del propio medio y a la enrofloxacin que es el antibiótico que se les administra a los cerdos antes de la obtención de las muestras.

Además, se ha de añadir que las muestras también fueron cultivadas en un medio MacConkey, específico para el crecimiento de enterobacterias. Este medio servía como garantía y control del crecimiento de microorganismos procedentes de las muestras y además, como demostrativo del efecto selectivo de los medios cromogénicos. Por ejemplo, los resultados de los cultivos en MacConkey del día 19/11, en el que se muestrearon todos los cerdos, indicaron la presencia de bacterias en un 91,6% de las muestras.

Si comparamos los datos del grupo experimental con los del grupo control, encontramos un perfil parecido en cuanto a la naturaleza de las muestras. Así, de 24 cultivos efectuados, solo aparece crecimiento bacteriano en 33,3% de los cultivos. Y dentro de estos, el 87,5% corresponden a muestras procedentes de la mucosa rectal. Hasta aquí, los resultados son similares. No obstante, encontramos dos diferencias en los géneros bacterianos aislados en los medios cromogénicos VRE, ESBL:

-En primer lugar, aparece *Klebsiella pneumoniae* productor de β -lactamasas de espectro extendido, como uno de los géneros predominantes aislado en un 44,4% de los cultivos. El otro 44,4% se corresponde con *E. faecium*, y el 11,2 % restante a *E. faecalis*.

-El segundo hallazgo se corresponde con la ausencia del género bacteriano *E. coli*, productor de β -lactamasas, en las muestras de los animales que conforman el grupo control.

Llegados a este punto, podríamos afirmar que la enrofloxacin, puede ser el factor clave que diferencia los resultados a este nivel entre los dos grupos de animales.

Una hipótesis, en referencia a la presencia de *Klebsiella pneumoniae*, es que esta bacteria muestra mayor sensibilidad a la enrofloxacin, ya que en el grupo experimental tratado con dicho antibiótico, se observa una frecuencia de aislamiento relativamente baja (un 1%), en comparación al grupo control (un 44,4%) no tratado con el antibiótico.

En cuanto al género *E. coli* productor de β -lactamasas, podríamos justificar su ausencia en las muestras del grupo control debido a que, este género concreto, podría hallarse en la microbiota de los cerdos en muy baja concentración. Y al no haber tratamiento antibiótico que altere el equilibrio inicial de la flora bacteriana, no se han producido fenómenos de selección para la resistencia en *E. coli*. Es decir, al no haberse administrado el tratamiento con la enrofloxacin, no se han producido modificaciones en la población bacteria base. La ausencia en las muestras del grupo control de *E. coli* productor de β -lactamasas, no significa la inexistencia de dicho género, sino que este podría hallarse en la microbiota de los cerdos en menor proporción.

Por el contrario, en el grupo experimental tratado con enrofloxacin, la frecuencia de aislamiento de *E. coli* es de un 23%. Podríamos afirmar en este caso que, el antibiótico ha modificado el equilibrio de las poblaciones presentes en la microbiota de los cerdos. Este género, ha experimentado un crecimiento y multiplicación debido al efecto de la enrofloxacin, o lo que es lo mismo; *E. coli* productor de β -lactamasas presenta resistencia al antibiótico administrado.

7. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos y tras las valoraciones anteriores se obtienen las siguientes conclusiones:

- Los géneros bacterianos aislados en los medios de cultivo selectivos utilizados en este estudio presentan resistencia tanto a la enrofloxacin, como a los antibióticos presentes en la composición de los medios cromogénicos (betalactámicos y vancomicina).
- Tanto el grupo experimental como el grupo control, poseen una microbiota formada por bacterias con resistencia a la vancomicina y a algunos antibióticos betalactámicos.
- Ninguno de los animales pertenecientes al grupo experimental y al grupo control, presentan bacterias productoras de enzimas carbapenemasas capaces de inactivar a los carbapenems.
- Tras administrar un tratamiento antibiótico a un grupo de cerdos, se obtiene un mayor porcentaje de bacterias con antibiorresistencia en muestras procedentes de mucosa rectal que en las del tracto reproductivo.
- A lo largo del estudio, se ha obtenido un patrón que se repite, en cuanto a los géneros bacterianos resistentes a la vancomicina y betalactámicos aislados y su frecuencia de aislamiento; *E. faecium*, *E. coli*, *E. faecalis* y *K. pneumoniae* (de mayor a menor frecuencia de aislamiento).
- El uso de enrofloxacin ha inhibido el crecimiento de *Klebsiella pneumoniae* antibiorresistente en el grupo experimental ya que, su frecuencia de aislamiento es muy baja en comparación del grupo control, que muestra una frecuencia más elevada.
- La enrofloxacin ha favorecido el crecimiento de *E. coli* antibioresistente en el grupo experimental, ya que en el grupo control, no se ha aislado este género en ninguna de las muestras de los cerdos.
- El uso de la enrofloxacin inhibe a las bacterias sensibles (*K. pneumoniae*), pero no afecta a las bacterias que hayan adquirido algún tipo de resistencia (*E. faecium* y *E.coli*); de hecho, estos grupos bacterianos antibioresistentes se multiplican, de modo que al final son los más prevalentes.

8. CONCLUSIONS

Taking into account the results obtained from the assessments carried out previously, the following conclusions shall be issued:

- The bacterial genera isolated in the selective culture media, which have been used in this study, show resistance to both enrofloxacin and antibiotics present in the composition of chromogenic media (beta-lactam and vancomycin).
- Both experimental group and control group have a microbiota made up of bacteria with resistance to Vancomycin and to some Beta-lactam antibiotics.
- None of the animals belonging to the experimental group and to the control group have bacteria producing carbapenemases enzymes, which are capable of inactivating Carbapenems.
- After administering an antibiotic treatment to a group of pigs, a higher percentage of bacteria with anti-resistance is obtained in samples from the rectal mucosa, rather than in the reproductive tract.
- Throughout the study, a repeating pattern has been obtained regarding bacterial genera resistant to vancomycin and beta-lactams isolated and their frequency of isolation; *E. faecium*, *E. coli*, *E. faecalis* and *K. pneumoniae* (from highest to lowest frequency of isolation).
- By using enrofloxacin, it has been inhibited the growth of anti-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the experimental group, since its isolation frequency is very low compared to the control group, which shows a higher frequency.
- Enrofloxacin has favored the growth of antibioresistant *E. coli* in the experimental group, since in the control group, the aforementioned genus has not been isolated in any of the pig samples.
- Sensitive bacteria (*K. pneumoniae*) are inhibited by the use of enrofloxacin, but does not affect bacteria that have acquired some type of resistance (*E. faecium* and *E.coli*); in fact, these antibiotic-resistant bacterial groups multiply themselves, so that they are the most prevalent at the end.

9. VALORACIÓN PERSONAL

Tras finalizar este trabajo experimental en el laboratorio de microbiología, me he dado cuenta de la complejidad que requiere llevar a cabo proyectos en los cuales debes obtener una serie de resultados para posteriormente, elaborar una memoria interpretativa de todo el proyecto. No ha sido una tarea fácil, ha sido un esfuerzo tanto personal como intelectual al que nunca antes me había enfrentado. Este proyecto, desde el inicio, me ha exigido llevar un nivel de orden y planificación estricta. En algunos momentos, aquello que parecía ser un camino recto y sencillo ha llegado a complicarse y ha requerido la búsqueda de otras opciones, para poder obtener resultados óptimos. Y como no, sin la ayuda y dedicación de mis tutores Rosa Bolea y Mariano Morales, no hubiese sido capaz de realizar este trabajo. Así que, les agradezco la oportunidad que me han dado de realizar este trabajo. También, quería dar las gracias a las profesoras Olga Mitjana, Mariví Falceto y M^a Jesús Serrano, al profesor Rafael Pagán, a la técnico de laboratorio María León y otros profesores por la ayuda prestada durante el proyecto. Quería mencionar también, que este trabajo se enmarca en el proyecto TESTACOS, bajo el título *“Desarrollo de una solución pionera de autocontrol en animales vivos para minimizar la presencia de residuos de antibióticos en la cadena alimentaria del área transfronteriza España-Francia (EFA152/16)”*, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional por el Programa Operativo Interreg V-A España- Francia- Andorra (Poctefa 2014-2020).

Desde un enfoque académico, también, ha sido todo un reto. Tanto el llevar a cabo todas las actividades realizadas en el laboratorio, como el tener que plasmar los resultados en 35 hojas e intentar hacer una memoria adecuada de todo el proyecto. Además, el hecho de pasar tantas horas leyendo artículos y buscando información sobre antibiorresistencias, me ha hecho tomar conciencia de este gran problema cuya responsabilidad atañe a tantos profesionales de la salud, tales como; veterinarios, médicos, farmacéuticos, etc.

Ha sido una experiencia muy grata el haber realizado este trabajo en el laboratorio de microbiología. Y tras 370 placas de cultivo sembradas y todas las horas dedicadas a este proyecto, puedo afirmar que ha merecido muchísimo la pena todo el esfuerzo y el tiempo invertido en ello.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | One Health. WHO [Internet]. World Health Organization; 2017 [cited 2019 Feb 13]; Available from: <https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>
2. Medicamentos DE, Sanitarios YP. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos AEMPS AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS. [cited 2019 Feb 16]; Available from: www.aemps.gob.es
3. ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. EFSA J [Internet]. 2015 Jul [cited 2019 Feb 17];15(7). Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2017.4872>
4. Resistencia a los antibióticos [Internet]. [cited 2019 Apr 19]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>
5. Alberto Sussmann OP, Mattos L, Restrepo A. Resistencia bacteriana [Internet]. [cited 2019 Apr 19]. Available from: <https://bloqs.xtec.cat/ferrerfrancesch/files/2009/06/002620resistencia.pdf>
6. Oromí Durich J. Resistencia bacteriana a los antibióticos. Medicina Integral. Med Integr [Internet]. IDEPSA; 2000 Dec 1 [cited 2019 Apr 19];36(10):367–70. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-los-antibioticos-10022180>
7. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A, Giedraitienė A, Vitkauskienė A, et al. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. Medicina (B Aires) [Internet]. Elsevier; 2011 Mar 22 [cited 2019 May 12];47(3):19. Available from: <http://www.mdpi.com/1010-660X/47/3/19>
8. Martínez-Martínez L. Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. Revista Médica Vald. 2016;
9. Cantón R, Loza E BF. Principios básicos de la farmacoterapia antiinfecciosa: concepto de sensibilidad y de resistencia, CMI y FC/FD. Mecanismos de resistencia. Selección y uso racional de antimicrobianos. Terapéutica farmacológica de los trastornos infecciosos y parasitarios sistémicos Madrid:Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos; 2012; pp 1-30. Madrid; 2012;1–30.
10. Grupo de Trabajo de Vigilancia de las IRAS.Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE). PROTOCOLO GENERAL DE VIGILANCIA Y CONTROL DE MICROORGANISMOS MULTIRRESISTENTES O DE ESPECIAL RELEVANCIA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA (Protocolo-MMR) [Internet]. 2016 [cited 2019 May 4]. Available from: http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-procedimientos/pdf_2016/Protocolo-MMR.pdf
11. Troncoso C, Pavez M, Santos A, Salazar R, Barrientos L, Troncoso C, et al. Structural and Physiological Implications of Bacterial Cell in Antibiotic Resistance Mechanisms. Int J Morphol [Internet]. Sociedad Chilena de Anatomía; 2017 Dec [cited 2019 May 12];35(4):1214–23. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000401214&lng=en&nrm=iso&tlng=en
12. Jimeno A, Alcalde MM, Blázquez A. Detección de un brote epidémico por Pseudomonas aeruginosa multirresistente productora de metalo-beta-lactamasa. Rev Clínica Española [Internet]. 2011 Apr [cited 2019 May 12];211(4):187–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014256511000518>
13. Dr. Moisés Morejón García Consejo Científico Ministerio de Salud. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas. Extended spectrum Beta-lactamase (ESBL). Revista Cubana de Medicina [Internet]. Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas; 2013 [cited 2019 May 12];52(4):272–80. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232013000400006
14. Ardite JA. RESISTENCIA A LA VANCOMICINA EN EL GÉNERO Enterococcus [Internet]. [cited 2019 Jul 1]. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/envancor.pdf>
15. Palop Larrea V, Melchor Penella A, Martínez Mir I. Reflexiones sobre la utilización de antibióticos en atención primaria. Atención Primaria [Internet]. Elsevier Doyma; 2003 Jan 1 [cited 2019 Mar 24];32(1):42–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0212656703788556>
16. Gobernado M. Reflexiones sobre resistencia bacteriana. Junio [Internet]. Prous Science, S.A.-Sociedad Española de Quimioterapia; 2003 [cited 2019 Mar 24];16(2):158–60. Available from: <http://www.seq.es/seq/0214-3429/16/2/158.pdf>
17. Ecdc. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. 2017 [cited 2019 Apr 18]; Available from: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EARS-Net-report-2017-update-jan-2019.pdf>
18. Hammerum AM, Heuer OE. Human Health Hazards from Antimicrobial-Resistant Escherichia coli of Animal Origin. Clin Infect Dis [Internet]. Narnia; 2009 Apr 1 [cited 2019 Apr 18];48(7):916–21. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/597292>

19. Blanc V, Mesa R, Saco M, Lavilla S, Prats G, Miró E, et al. ESBL- and plasmidic class C β -lactamase-producing *E. coli* strains isolated from poultry, pig and rabbit farms. *Vet Microbiol* [Internet]. Elsevier; 2006 Dec 20 [cited 2019 Apr 18];118(3–4):299–304. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113506003105?via%3Dihub>
20. GESER N, STEPHAN R, KUHNERT P, ZBINDEN R, KAEPPELI U, CERNELA N, et al. Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamase–Producing Enterobacteriaceae in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland. *J Food Prot* [Internet]. International Association for Food Protection ; 2011 Mar 1 [cited 2019 Apr 18];74(3):446–9. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X.JFP-10-372>
21. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J* [Internet]. 2019 Feb [cited 2019 Mar 17];17(2). Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2019.5598>
22. Universidad CES. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. LG, Motta Delgado PA, Cerón Urbano MF, Chimonja Coy FA. Resistance of Salmonella to conventional antimicrobials for their treatment. *CES Med Vet y Zootec* [Internet]. Universidad CES, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; 2012 [cited 2019 Mar 18];7(1):116–29. Available from: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072012000100010
23. Spain. Ministerio de Sanidad y Consumo. A, Mazón Ramos A, Martín Salas C, Urriaga Domínguez M, Inza Elia M. E. SALMONELOSIS NO TIFOIDEA EN UN ÁREA DE SALUD DE NAVARRA, ESPAÑA. *Revista Española de Salud Pública* [Internet]. Ministerio de Sanidad y Consumo; 2002 [cited 2019 Mar 18];76(1):49–56. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1135-57272002000100006
24. Wiuff C, Lykkesfeldt J, Svendsen O, Aarestrup F. The effects of oral and intramuscular administration and dose escalation of enrofloxacin on the selection of quinolone resistance among Salmonella and coliforms in pigs. *Res Vet Sci* [Internet]. W.B. Saunders; 2003 Dec 1 [cited 2019 Mar 24];75(3):185–93. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528803001127?via%3Dihub>
25. Díaz Pérez M, Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Fundamental features on the Enterococcus genus as a very important pathogen at present time MSc. *Rev Cubana Hig Epidemiol* [Internet]. Editorial Ciencias Médicas; 2010 [cited 2019 Apr 18];48(2):147–61. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032010000200006
26. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. M del C, Torres Manrique C. Enterococo, ¿ un patógeno emergente en nuestros hospitales? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, ISSN 0213-005X, Vol 25, N° 8, 2007, págs 500-502* [Internet]. Doyma; 1983 [cited 2019 Apr 18];25(8):500–2. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3129052>
27. AARESTRUP FM, KRUSE H, TAST E, HAMMERUM AM, JENSEN LB. Associations Between the Use of Antimicrobial Agents for Growth Promotion and the Occurrence of Resistance among *Enterococcus faecium* from Broilers and Pigs in Denmark, Finland, and Norway. *Microb Drug Resist* [Internet]. 2000 Jan 28 [cited 2019 Apr 18];6(1):63–70. Available from: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2000.6.63>
28. De Leener E, Martel A, De Graef EM, Top J, Butaye P, Haesebrouck F, et al. Molecular analysis of human, porcine, and poultry Enterococcus faecium isolates and their erm(B) genes. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. American Society for Microbiology (ASM); 2005 May [cited 2019 Apr 18];71(5):2766–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870371>
29. Anáhuac U, Norte M, Vázquez-López R, Abelardo Álvarez-Hernández D, Sofía Garza-Mayén G. Quinolones. Nowadays perspectives and mechanisms of resistance [Internet]. [cited 2019 Jul 17]. Available from: www.sochinf.cl
30. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. J, Campos J. Quinolone use and resistance. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. Doyma; 2005 Apr 1 [cited 2019 Jul 17];22(4):201–3. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-uso-quinolonas-resistencia-13059048>
31. Miranda García MC. Extended spectrum beta-lactamase - positive Escherichia coli. Resistance. *Sanid Mil* [Internet]. Ministerio de Defensa; 2013 Dec [cited 2019 Jul 4];69(4):244–8. Available from: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1887-85712013000400003&lng=en&nrm=iso&tlng=en
32. Rojo V, Vázquez P, Reyes S, Puente Fuertes L, Cervero M. [Risk factors and clinical evolution of carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae infections in a university hospital in Spain. Case-control study]. *Rev Esp Quimioter* [Internet]. Sociedad Española de Quimioterapia; 2018 Oct [cited 2019 Jul 4];31(5):427–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30229644>
33. Lapierre L, Toro C, Martín BS. Estudio de la resistencia a antimicrobianos en cepas de Enterococcus spp, aisladas de aves y cerdos de producción. *Av en Ciencias Vet* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2019 Apr 18];25(1–2). Available from: <https://revistaderechoeconomico.uchile.cl/index.php/ACV/article/view/18284>