¿Tiene influencia el ayuno en la cantidad de enterobacterias y de BLEE (Betalactamasas de espectro extendido) - *E. coli* en las canales de Gallus gallus en matadero?

B. GONZALEZ[1*], L. ELLERBROEK[2], T. ALTER[3] y N. LANGKABEL[1]

[1] Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, AG Fleischhygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin Königsweg 67, Gebäude 21/22, 14163 Berlin; [2] Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft, Referat 314, Fleischhygiene, Lebensmittelhygiene, Wilhelmstraße 54, 10117 Berlin; [3] Institut für Lebensmittelsicherheit und –hygiene, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin Königsweg 69 Gebäude Haus 36, 14163 Berlin, Deutschland.

[*]**Autor corresponsal: Belen.GonzalezSantamarina@fu-berlin.de**

El control y la disminución de la resistencia a antibióticos en la producción animal es un tema que en los últimos años ha cobrado gran importancia debido a su repercusión en la salud pública. Por este motivo se ha llevado a cabo en Alemania un proyecto multidisciplinar (EsRAM), para el estudio de este fenómeno a lo largo de toda la cadena del pollo de engorde. Una de las partes más críticas es el matadero, donde el contenido intestinal y fecal durante el faenado puede llevar a la contaminación de las canales y posteriormente al consumidor. Para reducir esta contaminación se realiza de manera habitual el ayuno en las aves antes de su sacrificio. El motivo de este estudio es determinar si hay una influencia del tiempo de ayuno, en este caso 6, 8 y 10h, en la carga de Enterobacterias (EB) y Enterobacterias resistentes a Cefotaxima (EB-C) asi como en la cantidad de *E.coli* productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Además se ha investigado si la refrigeración de las canales tiene también influjo en estos parámetros. Cada tiempo de ayuno fue muestreado 4 veces, en total 474 secciones de piel de cuello antes y después del refrigerado. En el caso de EB, no hay diferencia entre los tiempos de ayuno en la carga microbiológica antes del refrigerador (4,13-3,92 $\log_{10}$ CFU/ml). Pero tras él, se encuentra una diferencia de un 1 $\log_{10}$ CFU/ml en las aves con 8 y 10 horas de ayuno. Los valores de EB-C antes del refrigerador no varían entre los tres tiempos de ayuno (2,43-2,70 $\log_{10}$ CFU/ml) y tras la refrigeración la diferencia es menor de 1 $\log_{10}$ CFU/ml (0,05- 0,55 $\log_{10}$ CFU/ml), donde de nuevo el mayor contraste se encuentra en las 10 horas. En el caso de BLEE-*E.coli*, han sido positivas 34% de la pruebas (151/474) y de ellas el 60% (90/151) se han encontrada antes del refrigerador. Entre los tiempos de ayuno de 6, 8 y 10 horas el porcentaje de BLEE-*E.coli* ha sido 42%, 35% y 29% respectivamente.

En conclusión, los tiempos de ayuno estudiados no tienen influencia sobre EB, EB-C y BLEE-*E.c oli,* aun teniendo en cuenta la diferencia encontrada tras 10 horas de ayuno. Pero la refrigeración si tiene influencia en la reducción de la carga de EB y BLEE-*E.coli.* Por ultimo esta problemática tiene que seguir investigándose para poder tener resultados más claros que sirvan para la reducción de las bacterias productoras de beta-lactamasas en Gallus gallus.

Palabras clave: ayuno; Enterobacterias; BLEE- *E. coli*; Gallus gallus; canales

Introducción

La evolución y el aumento de las resistencias a antibióticos, en especial de BLEE (Betalactamasas de espectro extendido) durante los últimos 20 años (PATERSON y BONOMO 2005), hace indispensable tanto el estudio como el control de este fenómeno. En el caso de la Unión Europea, la decisión de la Comisión 2013/652/EU establece el control de las bacterias (*Salmonella* spp. *E. coli y C. jejuni*) productoras de enzimas resistentes a antibióticos (betalactamasas de espectro ampliado, betalactamasas AmpC y carbapenemasas). Y se establece *E. coli* como indicador comensal de la resistencia del resto de las bacterias patógenas (ANONIMO, 2013). En esta misma decisión se especifican las poblaciones a muestrear cada dos años. Una de la más importante es la de pollos de engorde, con una prevalencia de BLEE- *E. coli* en al EU de un 3,6% (ANONIMO 2016), aunque esta puede ser mucho mayor en otros estudios, llegando a alcanzar un 88,6% (REICH et al. 2013) o incluso un 94% (LEVRESTEIN-VAN HALL et al. 2011). Por otra parte se ha demostrado la transmisión de la resistencia a humanos, como en la publicación de LEVRESTEIN-VAN HALL et al. (2011), donde el 39% de los BLEE-*E.coli* encontrados en humanos tenían genes asociados a los previamente aislados en pollos. Incluso estos mismos genes se han encontrado en personas que consumen carne ecológica (COHEN STUART et al. 2012) o que son vegetarianos (JOHNSON et al. 2007).

Por ello se ha de desarrollado en Alemania el proyecto financiado por el Ministerio Federal Alemán de Agricultura y Alimentación, llamado EsRAM („Entwicklung stufenübergreifender Reduktionsmaßnahmen für antibiotikaresistente Erreger beim Mastgeflügel“(desarrollo de medidas para la reducción de agentes resistentes a antibióticos en aves de engorde)), que pretende encontrar medidas para la disminución de bacterias productoras de BLEE a lo largo de toda la cadena de pollos de engorde, en el que participan diferentes universidades y organismos. Es este caso, nuestro proyecto se centra en el matadero, y la contaminación cruzada producida por el contenido intestinal y fecal de las aves durante el faenado de las canales. El ayuno antes del sacrificio es uno de los métodos utilizados para reducir esta contaminación, cuyo tiempo recomendado es de entre 8 y 12 horas (NORTHCUTT 2010). Por ello, en este estudio se han tomado tres tiempos de ayuno, para así determinar si estos, tienen influencia en la presencia y contaminación de BLEE-*E.coli* en las canales de Gallus gallus antes y después del refrigerado.

Materiales y métodos

La recogida de muestras se realizó entre Junio del 2016 y Abril del 2017 en un matadero al noreste de Alemania. El periodo de recogida de las muestras se dividió en dos etapas: invierno 2016-2017 y verano 2017, durante las cuales se muestrearon tres tiempos de ayuno: 6, 8 y 10 horas. En total 12 tomas de muestras, dos por tiempo de ayuno y etapa.

En cada muestreo se recogieron un total de 40 pruebas: 20 secciones de cuello de las canales antes de su entrada en la sala de refrigerado y 20 secciones del mismo tejido tras la refrigeración. Las muestras se tomaron de manera aleatoria entre los especímenes de la partida muestreada, las cuales pertenecían a diferentes canales antes y después de la refrigeración. Se realizaron dos estudios paralelos, el primero fue el estudio cuantitativo de Enterobacterias (EB) sensibles y resistentes a Cefotaxima (EB-C) (Cefalosporina de tercera generación) antes y después del paso por la sala de refrigerado. Y en segundo lugar el estudio cualitativo de *E. coli* productor de BLEE.

Estudio cuantitativo de EB y EB-C

La muestras de cuello, se homogenizaron con caldo de Luria (dilución 1:10) y se inocularon en platos del medio de cultivo selectivo MacConkey con Cefotaxima (1 mg/L) y sin Cefotaxima mediante el método de drop-plating. Tras un tiempo de incubación de 24 horas, las colonias encontradas en ambas placas fueron contadas.

Estudio cualitativo BLEE-*E. coli*

Las muestras de cuello homogenizadas en caldo de Luria fueron incubadas durante 24 horas a 37 grados centígrados. Tras el enriquecimiento, las pruebas se cultivaron en el medio selectivo MacConkey con Cefotaxima (1mg/L), mediante la inoculación con un asa de platino. Las colonias con morfología sospechosa de ser *E. coli,* tanto en estas placas como en las pertenecientes al estudio cuantitativo fueron confirmadas por medio de MALDI-TOF. Tras la confirmación, se realizó la técnica de difusión en agar con los antibióticos Cefoxitina (30µg), Ceftazidima (30µg), Cefotaxima (30µg) Cefotaxima con ácido Clavulánico (40µg) y Meropenem (10µg), para seleccionar las colonias de *E. coli* sospechosas de producir BLEE, siguiendo los estándares del CLSI (the Clinical and Laboratory Standards Institute). Por último la confirmación de la producción de BLEE se analizará por medio de PCR en tiempo real y los resultados serán mostrados en la presentación de este estudio en el simposio.

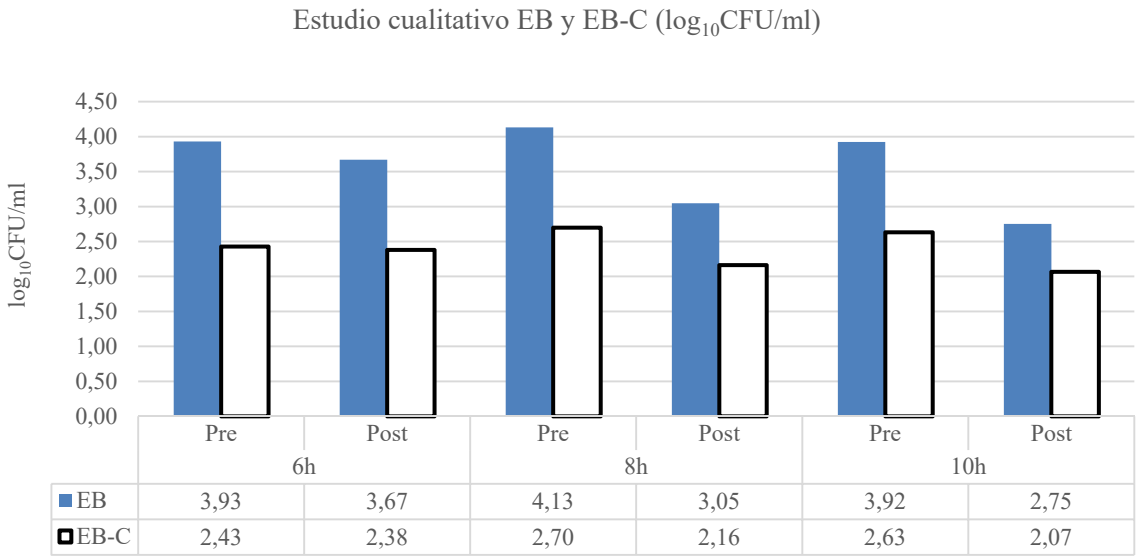
Resultados y discusión

Estudio cuantitativo de EB y EB-C

Los resultados se han calculado como la media de los cuatro muestreos recogidos por tiempo de ayuno. En la figura 1 se muestra que la cantidad de colonias de EB encontradas antes del refrigerado que se mueven entre 3,92-4,13 $\log_{10}$ CFU/ml. Tras el paso de las canales por el refrigerado los valores encontrados son de entre 2,75-3,67 $\log_{10}$ CFU/ml. Estos datos se pueden comparar con los estudios realizados por GÖKSOY et al. (2004) y ZWEIFEL et al. (2015) donde los valores antes del refrigerado fueron entre 3,67-3,77 $\log_{10}$ CFU/ml y 2,9-3,3 $\log_{10}$ CFU/ml respectivamente. Y tras el refrigerado entre 3,81-3,91 $\log_{10}$ CFU/ml y 3-3,5 $\log_{10}$ CFU/ml respectivamente. En nuestro estudio antes y después del refrigerado la diferencia oscila entre 0,26-1,17 $\log_{10}$ CFU/ml. El intervalo más alto se encuentra tras 10 horas de ayuno, mientras que en los estudios comparados la diferencia no llega nunca a ser mayor que 1$\log_{10}$ CFU/ml e incluso en algunos casos el valor después de la refrigeración es ligeramente superior a antes del refrigerado.

La cantidad encontrada de EB-C es menor tanto antes como después del refrigerado en comparación con los EB. En la figura 1 se puede apreciar que antes del refrigerado el número de colonias oscila entre 2,70-2,43 $\log_{10}$ CFU/ml, mientras que tras el enfriamiento de las canales, el valor varía entre 2,16-2,1 $\log_{10}$ CFU/ml. La diferencia entre los valores antes y después de la refrigeración van entre 0,05-0,56 $\log_{10}$ CFU/ml, con la menor diferencia en 6 horas. PACHOLEWICZ et al. (2015) descubre que tras el refrigerado la cantidad de EB disminuye entre 0,55-1,09 $\log_{10}$ CFU/ml, y el valor final en la canales es de entre 2,4- 5,8 $\log_{10}$ CFU/ml.

Figura 1. Estudio cuantitativo Enterobacterias sensibles y resistentes a Cefotaxima



Estudio cualitativo BLEE- *E. coli*

De un total de 474 pruebas, en un 55% (263/474) se identificaron *E. coli*. De las cuales 151, es decir un 34% (151/474) del total de la muestras o lo que es lo mismo, un 57% (151/263) de las colonias identificadas como *E. coli,* son sospechosas de producir BLEE. En el caso de otros estudios la prevalencia de BLEE-*E. coli* es más alta. Por ejemplo en la investigación llevada a cabo por PACHOLEWICZ et al. (2015) la prevalencia es del 81,6 %, en REICH et al. (2013) 88,6% y en LEVRESTEIN-VAN HALL et al. (2011) llega a ser de un 94%.

Si comparamos los dos tipos de pruebas recogidas (Tabla 1.), más de la mitad de BLEE -*E. coli*, un 60% (90/151) se encontraron en la piel de cuello antes de la refrigeración, y el resto, un 40% (61/151) tras el refrigerado. Esto indica una disminución en la cantidad de BLEE-*E. coli* después del paso de las canales por el refrigerador.

Si estos datos los comparamos entre los diferentes tiempos de ayuno (Tabla 1.), es en 6h donde se encuentran más BLEE-*E. coli,* un 42%. En 8 y 10 horas el porcentaje es menor, un 35% y un 29% respectivamente.

Con estos resultados podemos decir que las diferencias en el ayuno solo se distinguen tras 6 horas donde el porcentaje de BLEE-*E. coli* encontrado es mayor que en 8 y 10 horas y que hay diferencia entre los el numero encontrado antes y después del refrigerado.

Tabla 1. Resultados estudio cualitativo *E. coli* productoras de BLEE

		Piel prerefrigerado	**Piel postfrigerado**	**Total**	**% BLEE -*E. coli* tiempo de ayuno**
6h	*E. coli*	59	43	119	42%
	BLEE-*E. coli*	39	21	63	
8h	*E. coli*	50	42	109	35%
	BLEE-*E. coli*	24	25	53	
10h	*E. coli*	39	25	77	29%
	BLEE-*E. coli*	27	15	44	
Total BLEE-E. coli		90	61	151	
% BLEE-E. coli		60%	40%	100%	

En conclusión los tiempos de ayuno estudiados no tienen influencia sobre EB, EB-C y BLEE-*E.Coli,* aun teniendo en cuenta la diferencia encontrada tras 10 horas de ayuno. Por otra parte la refrigeración si tiene influencia sobre la reducción de la carga de EB y BLEE-*E.coli.* Teniendo en cuenta el número de muestreos realizados, se necesitan seguir investigando esta problemática para poder tener resultados más claros que sirvan para la reducción de las bacterias productoras de betalactamasas en Gallus gallus.

Referencias

ANÓNIMO (2013): Decisión 2013/652/UE de ejecución de la Comisión de 12 de noviembre de 2013 sobre el seguimiento y la notificación de la resistencia de las bacterias zoonóticas y comensales a los antibióticos. Diario Oficial de la Unión Europea 14.11.2013, L 303, 23-39

ANÓNIMO (2016): Scientific report of EFSA and ECDC: The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal, **14** (2), 4380-4587

COHEN STUART J., VAN DEN MUNCKHOF T., VOETS G., SCHARRINGA J., FLUIT A. and HALL M.L. (2012): Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. International Journal of Food Microbiology, **154** (3), 212-214

GÖKSOY E. Ö., KIRKAN S. y KÖK F. (2004): Microbiological Quality of Broiler Carcasses during Processing in Two Slaughterhouses in Turkey. Poultry Science, **83**, 1427–1432

JOHNSON J.R., SANNES M.R., CROY C., JOHNSTON B., CLABOTS C., KUSKOWSKI M. A., BENDER J., SMITH K.E., WINOKUR P. L. y BELONGIA E. A. (2007): Antimicrobial Drug–Resistant Escherichia coli from Humans and Poultry Products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004**.** Emerging Infectious Diseases 2007, **13**(6), 838–846

LEVERSTEIN-VAN HALL M.A., DIERIKX C.M., COHEN STUART J., VOETS G.M., VAN DEN MUNCKHOF M.P., VAN ESSEN-ZANDBERGEN A., PLATTEEL T., FLUIT A.C., VAN DE SANDE-BRUINSMA N., SCHARINGA J,. BONTEN M.J., MEVIUS DJ; NATIONAL ESBL SURVEILLANCE GROUP (2011): Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. Clinical Microbiology and Infection, **17** (6), 873-880.

NORTHCUTT, J. K. (2000): Factors influencing optimal feed withdrawal duration. The University of Georgia Cooperative Extension Service, Bulletin 1187

PACHOLEWICZ E., LIAKOPOULOS A., SWART A., GORTEMAKER B., DIERIKX C., HAVELAAR A., y SCHMITT H. (2015): Reduction of extended-spectrum-β-lactamase- and AmpC-β-lactamase-producing Escherichia coli through processing in two broiler chicken slaughterhouses. International Journal of Food Microbiology **215**, 57–63

PATERSON D.L. y BONOMO R.A. (2005): Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clinical Microbiology Reviews 2005, **18**(4), 657-686

REICH A., ATANASSOVA V. y KLEIN G. (2013): Extended-spectrum ß-Lactamase- and AmpC-producing Enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. Emerging Infectious Diseases 2013, **19** (8), 1253-1259

ZWEIFEL C., ALTHAUS D. y STEPHAN R. (2015): Effects of slaughter operations on the microbiological contamination of broiler carcasses in three abattoirs. Food Control, **51**, 37-42