

Informe final publicable de proyecto ¿Que estamos comiendo? Búsqueda de mecanismos de resistencia en alimentos congelados.

Código de proyecto ANII: FMV_3_2020_1_162024

01/09/2023

BADO VAZQUEZ, María Inés (Responsable Técnico - Científico)

COPPOLA FON, Nadia Alexandra (Investigador)

CORDEIRO GARCÍA, Nicolás (Investigador)

FERREIRA ACOSTA, Federica (Investigador)

IRIARTE ODINI, Andrés (Investigador)

PAPA EZDRA, Romina (Investigador)

VARELA PENSADO, Gustavo (Investigador)

VIGNOLI CABRERA, Ever Rafael (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE MEDICINA (Institución Proponente) \ \ INSTITUTO DE HIGIENE

Resumen del proyecto

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema que afecta la salud humana, ambiental y animal. Los microorganismos multirresistentes (MMR) pueden transitar entre la población humana y animal a través de alimentos, agua y medio ambiente. Previamente reportamos la presencia de MMR en pollitos de un día importados de Brasil. Nos propusimos la búsqueda de mecanismos de resistencia a antibióticos críticos para la salud humana en muestras de alimentos de pollos congelados importados de este país.

Se estudiaron 80 muestras de alimento congelado de pollo identificándose mediante metagenómica un importante porcentaje de Bacterias pertenecientes al Phylum Firmicutes siendo las principales familias descritas Bacillaceae, Lactobacillaceae y Paenibacillaceae, y dentro de éstas los géneros, Bacillus y Leuconostoc, entre otros. Mientras que la presencia de Proteobacterias fue baja (0,1-1,5%), y las familias más representadas fueron Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Aeromonadaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae, a expensas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, entre otras. Asimismo, se detectaron genes de resistencia a beta-lactámicos, cloranfenicol, eritromicina, fosfomicina, lincomicina, macrólidos, amonio cuaternario, estreptomicina, tetraciclina y vancomicina.

La presencia de genes RAM críticos para la salud humana en alimentos congelados importados estarían sorteando las políticas de restricción del uso de antibióticos en salud humana y producción animal en Uruguay.

Ciencias Médicas y de la Salud / Ciencias de la Salud / Enfermedades Infecciosas / Microbiología

Palabras clave: Resistencia antimicrobiana / Alimento / Secuenciación /

Introducción

Los antibióticos son imprescindibles para el tratamiento de enfermedades potencialmente mortales, pero su uso excesivo en la medicina humana y en animales de producción llevaron al surgimiento de microorganismos multirresistentes a drogas (MMR) debido a la producción de diversos mecanismos de resistencia.¹ Así, la resistencia antimicrobiana (RAM) es uno de los desafíos a combatir mundialmente implicando: la salud humana y animal, la seguridad ambiental y el desarrollo. Asimismo, los MMR transitan entre la población y animal a través de alimentos, agua y medio ambiente, movilizados por el comercio, transporte humano y animal, y a través de los animales destinados a la alimentación (APA).¹ Por este motivo, la RAM y la inocuidad alimentaria son dos de los tres pilares que sustentan el concepto impulsado por la OMS de "Una Salud".^{1,2} Es así, que durante el 2019, ingresa a la lista de problemas sanitarios a resolver por la OMS, debido a su constante crecimiento.^{1,3}

En la salud humana, este problema se refleja en el incremento de infecciones por MMR para las cuales escasean opciones terapéuticas, lo que lleva al aumento de la morbimortalidad, estadías hospitalarias y costos asistenciales.^{3,4}

Se estima que la falta de medidas inmediatas para contener la diseminación de la RAM, aumentara la mortalidad asociada a MMR de 700.000 a 10.000.000, con un costo de US\$100 trillones para el 2050.⁵ Actualmente, existen diversos programas como el establecido por el CDC en su "Campaña de prevención de la resistencia a los antimicrobianos" donde incita a realizar campañas mundiales de concientización, prevención de la diseminación de infecciones, reducción innecesaria del uso de antibióticos y reforzar la vigilancia e investigación, entre otros.^{3,6}

Sin embargo, el mayor consumo de antibióticos ocurre a nivel animal, alcanzando en algunos países el 80% del consumo total, estimándose consumos mayores para el 2030.⁷

Esto acarrea al menos dos problemas directos, dificultades terapéuticas para el tratamiento de las infecciones por MMR en el ámbito veterinario y, por otro, en el que nos centraremos, la selección y transmisión de MMR o genes de resistencia a humanos asociados a los APA.^{1,8}

Se estima que el 15% de los casos de enfermedades infecciosas emergentes están asociadas a la transmisión por alimentos.^{9,10} Además, la globalización promueve la comercialización de alimentos y productos básicos contribuyendo a la propagación de patógenos, al igual que los genes de resistencia.¹¹

Las infecciones transmitidas por alimentos debido a enteropatógenos resistentes, son un riesgo para los seres humanos debido al posible fracaso terapéutico. No obstante, la microbiota animal resistente también plantea un riesgo, ya que puede portar genes de resistencia potencialmente transferibles a patógenos humanos.^{10,12}

El aumento de la RAM asociada a alimentos se refleja en la aparición de enteropatógenos resistentes como: *Salmonella* spp resistentes a oximino-cefalosporinas y fluoroquinolonas, y *Escherichia coli*, resistente a oximino-cefalosporinas. Estos patógenos alimentarios fueron clasificados, junto a otros, por el CDC durante el 2013 como amenazas para la

Además del impacto directo sobre la salud humana, estos microorganismos pueden causar pérdidas económicas a nivel de producción animal, como lo observado en Noruega donde las ventas de pollo disminuyeron (20%) debido a la presencia de *Escherichia coli* resistente en dicha carne.¹⁴

A nivel mundial, han aparecido varios estudios sobre la búsqueda de RAM en alimentos para consumo, encontrándose en carne de pollo mecanismos de resistencia a: beta-lactámicos (SHV-2/CTX-M-15/CMY-2), aminoglucósidos (AadA2), cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas (Sul1), trimetoprim (DfrA5) y tetraciclinas (TetA).^{15,16,17,18,19,21}

Asimismo, los aislamientos de la venta al por menor tienden a ser más resistentes que los aislamientos de mataderos,¹⁶ donde la contaminación es cruzada debido a pollos de engorde sacrificados el mismo día, o con microbiota en el ambiente del matadero.²⁰

Para revertir esta situación, la OMS, FAO y OIE establecieron conjuntamente mejorar la salud y bienestar a través de la prevención de riesgos y disminución de los efectos ocasionados en la interfaz humana-animal-entorno bajo el programa "Una Salud", donde debe existir una coordinación multisectorial.^{1,3}

Con el fin de detectar la aparición y propagación de MMR, estas organizaciones recomiendan elaborar programas de vigilancia antimicrobiana que integren los datos de los aislamientos originados en los humanos, APA, y venta de carne al por menor.²¹ Actualmente, menos del 40% de los países poseen programas de control y prevención de infecciones. En Europa, la venta de antibióticos para uso animal disminuyó un 8%, reduciendo así la carga de RAM en bacterias de origen animal.^{22,7}

En los países que inician programas de vigilancia, los alimentos de origen animal de venta al por menor son considerados de segunda prioridad, pues representan una vía de exposición humana.²¹

Dada la magnitud del problema y las prácticas relacionadas a la seguridad alimentaria es necesario un enfoque global donde distintos actores desempeñan un papel en la preservación de la actividad de los antibióticos en la cadena alimentaria.

En Uruguay se han tomado medidas de restricción del uso de antibióticos, tanto en salud humana como en producción animal. En estos últimos, se prohíbe el uso de promotores de crecimiento o que animales bajo tratamiento no sean considerados para la producción de alimentos de consumo humano.^{23,24} Nuestro grupo de trabajo, ha realizado estudios de detección de mecanismos de resistencia en humanos y animales de granja, así como en reproductores de granja importados, sin embargo, se desconoce la presencia de estos en los alimentos, ya que solamente son estudiados en profundidad frente a brotes alimentarios.^{25,26} Es importante considerar a los alimentos como vehículos de enteropatógenos y también de bacterias portadoras de genes de resistencia que al ser ingeridas son capaces de transferir los mismos a la microbiota humana,²⁷ donde la colonización por MMR puede persistir durante años.^{28,29,30}

Actualmente, el CDC y FDA realizan vigilancia alimentaria utilizando secuenciación de genoma completo estableciendo la Red GenomeTrakr, compartiendo la información de patógenos transmitidos por alimentos entre laboratorios.¹¹ Consecuentemente, la necesidad de analizar los riesgos de RAM transmitida por alimentos.

El Laboratorio de Resistencia Antibiótica (LRA) del Depto. de Bacteriología y Virología centra sus trabajos en la detección de mecanismos de RAM en bacilos gram negativos y en estudios de epidemiología molecular de microorganismos multirresistentes (MMR). Hemos realizado varios estudios a partir de muestras clínicas y colonización en adultos y niños internados, así como caracterización de mecanismos de resistencia en patógenos de origen alimentario como *Salmonella* entérica y MMR provenientes de ganado lechero, gallinas ponedoras, pollitos importados de un día de vida y, últimamente, cerdos. Detectamos genes de RAM a antibióticos definidos como de importancia crítica para la salud humana, según la OMS, como ser: cefalosporinas de tercera generación y carbapenems (blaCTX-M/PER/SHV/TEM/NDM/VIM/KPC/OXA/CMY-2); fluoroquinolonas (qnrA/B/D/E/S/VC y aac(6')Ib-cr); aminoglucósidos (aac(6')Ib/aadA2/aadB/rmtC/rmtD/rmtG); colistin (mcr1/9); y fosfomicina (fosA3). Asimismo, hemos caracterizado distintos entornos genéticos, incluyendo los plásmidos involucrados. ^{8,31,32,33,34,35,36,37,38}

Junto al Depto. de Microbiología (IIBCE), hemos determinado la presencia de genes de resistencia en *E.coli* procedente de ganado bovino, no detectado hasta el momento resistencia transferible a colistina.³⁹

En colaboración con el DLSP-MSP, determinamos genes de resistencia transferibles a fluoroquinolonas (qnrB2/19) y oximino-cefalosporinas (blaCTX-M-8/14/CMY-2/SHV-2), y caracterizamos los plásmidos en aislamientos humanos de *Salmonella* enterica a nivel nacional.⁴⁰

Participamos en la formación de estudiantes de Maestría en Salud Animal de la Facultad de Veterinaria, donde hemos

estudiado la RAM en E.coli en sistemas de producción avícola, suinos y terneros de establecimientos lecheros nacionales. Analizamos 261 animales, 44/261 presentaron aislamientos resistentes a oximino-cefalosporinas mediados por blaCTX-M-2/8/14/15/55/PER-2/SHV/CMY-2, donde el mayor nivel de resistencia se observó en cerdos. En cajas de pollitos bebes de un día de vida provenientes de Brasil, los niveles de resistencia fueron mayores, encontrándose blaCTX-M-2/8/15/55/CMY-2, qnrB2/3/19, qnrE1, aac(6')Ib, rmtG, fosA3, y el primer aislamiento de mcr-9 en Uruguay.^{41,42}

También, formamos parte de la RED de laboratorios que estudian RAM, que participaron en la elaboración del "Plan Nacional de contención de la RAM de Uruguay", presentado por el Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (MGAP) y conformamos un núcleo interdisciplinario de la UDELAR junto a Facultad de Química, Veterinaria e IIBCE denominado "Abordaje interdisciplinario de la resistencia antimicrobiana en medicina veterinaria".^{43,2}

Descripción del problema al cual el proyecto plantea dar solución:

La RAM permite la sobrevivencia de las bacterias frente a los antibióticos, siendo favorecida por el uso excesivo o incorrecto de los mismos en los sectores de la salud humana y animal.⁴⁸

En Estados Unidos y Espacio Económico Europeo, 2/3 del uso de antimicrobianos están destinados a la producción de alimentos los cuales culminan desechados en el medio ambiente.⁴⁴

Existe evidencia que asocian el uso de antibióticos en producción animal y el desarrollo de RAM en patógenos clínicamente importantes en la salud humana, dificultando mundialmente el acceso a alimentos seguros para su consumo.⁴³

Como ya se ha señalado, la OMS exigió a sus países miembros desarrollar y aplicar un plan co-integrado de acción nacional "Una Salud" para el 2017. Uruguay elaboró el "Plan Nacional de contención de la RAM" con enfoque en salud animal y cadenas productoras de alimentos, elaborado por el MGAP, donde un grupo técnico y diversas organizaciones, donde encontramos al LRA, contribuyó para su desarrollo y revisión.^{43,44}

En Uruguay existe un gran consumo de carne, que también implica el principal rubro de exportación nacional con gran trascendencia económica. Estudios de RAM en bovinos durante el 2006 demostraron bajos niveles de resistencia, pero, para el 2012 los mismos fueron mayores.⁴³

En el contexto de conocer la RAM en pollitos bebes de un día de vida importados desde Brasil, realizamos un muestreo de las heces encontrada en las cajas en las cuales arribaban a Montevideo. Las muestras fueron tamizadas para la búsqueda de enterobacterias resistentes a antibióticos, considerados de importancia crítica por la OMS. Se analizaron ocho cajas, provenientes de ocho embarques diferentes durante el año 2019, identificándose 32 aislamientos no repetidos. Como se mencionó anteriormente, se detectaron múltiples genes de resistencia a oximino-cefalosporinas, quinolonas, aminoglucósidos, fosfomicina y polimixinas. Dentro de estos, destacamos la presencia de la metilasa RmtG, la cual confiere resistencia a todos los aminoglucósidos de uso clínico habitual y el ingreso a nuestro país del gen de resistencia a colistin, mcr-9. Esto establece una alerta máxima desde el punto de vista sanitario. Adicionalmente, mediante tipificación molecular, observamos que tres aislamientos fueron ingresados al país en tres ocasiones diferentes. Es importante destacar que tanto rmtG y mcr9 no han sido descritos en Uruguay previo a éste estudio, por lo que estos animales serían una vía de ingreso para los mismos, los cuales evaden las medidas sanitarias locales incluidas en los planes de contención de RAM.⁴¹

Según la FAO, Uruguay importó durante el 2013, 1000 toneladas de carne de pollo de Brasil, de lo cual se desprende la importancia de poder confirmar o descartar los hallazgos encontrados, por nuestro laboratorio en los pollitos de un día de vida importados del mismo país, en dicho alimento.⁴⁵

Es por ello, que nos proponemos realizar la búsqueda de dichos mecanismos de resistencia en alimento congelado de pollo proveniente de Brasil.

Por último, pero no menos importante, también nos propusimos continuar con la formación de recursos humanos, del equipo existente y de nuevos integrantes, que se especialicen en la detección de genes de resistencia antimicrobiana, así como la caracterización de sus plataformas genéticas y vías de movilización, y avanzar sobre la secuenciación completa de genomas y detección mediante metagenómica de microorganismos resistentes permitiendo la formación de una plataforma multidisciplinaria de estudios de resistencia antimicrobiana en la UDELAR. Este punto es particularmente pertinente, dado que hemos comenzado a formar RRHH especializados en el tema de RAM en el ámbito veterinario lo cual permitirá ampliar el abordaje multidisciplinario del problema.

Metodología/diseño del estudio

En trabajos previos confirmamos que la estrategia diseñada para la detección de microorganismos resistentes en animales, ha sido efectiva.⁴⁶

Para ello, nos propusimos muestrear, durante 8 meses, Nuggets de pollo provenientes de Brasil, a partir de 5 marcas

comerciales disponibles para su consumo en supermercados.

Brevemente, las muestras fueron conservadas en condiciones de refrigeración y procesadas antes de las 24 h desde su recolección. Luego, de una mezcla del alimento con caldo Luria Bertani y homogeneización, mediante la utilización de un stomacher dentro de una bolsa de plástico estéril, las mismas fueron incubadas durante 18-24 h a 37°C como fase de pre-enriquecimiento no selectivo, para luego ser procesadas como se detalla a continuación.⁴⁷

Las mismas se sembraron en placas de agar Mc Conkey Lactosa suplementadas con: ceftriaxona (1ug/ml); ciprofloxacina (0,25 ug/ml); y colistin (3 ug/ml). Además de una siembra control en una placa de Mc Conkey Lactosa sin antibiótico y medio no selectivo Trypticase Agar Soja. Se seleccionaron hasta 5 morfologías coloniales de cada placa capaces de crecer en estas condiciones, y posteriormente fueron identificadas mediante espectrofotometría de masas MALDI-TOF.^{31,39}

Posteriormente, en base a las placas donde hayan crecido los microorganismos, se estudió la sensibilidad antibiótica mediante disco difusión de Kirby-Bauer en agar Mueller-Hinton. Los antibióticos seleccionados fueron: ampicilina, cefuroxime, amoxicilina-ácido clavulánico, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, enrofloxacin, amikacina, gentamicina y trimetoprim-sulfametoxazol. Además, se determinó la de concentración inhibitoria mínima a colistin.⁴⁶

Luego, se realizó PCR a tiempo final para la búsqueda de mecanismos de resistencia a colistin (Mcr1-9), oximino-cefalosporinas (variantes AmpC), y fluoroquinolonas (QnrA-E/ Aac(6')Ib-cr).^{31,39,48}

Asimismo, se llevaron a cabo ensayos de transferencia horizontal de genes mediante conjugación, utilizando como cepa receptora E.coli J53-2 (resistente a rifampicina, ornitina descarboxilasa negativa).⁴⁸

Como se mencionó anteriormente, el proyecto planteaba como objetivo principal la búsqueda de mecanismos de resistencia a antibióticos críticos (ACs) en alimento congelado. Varias de las actividades planteadas se basaron en los posibles resultados obtenidos. Sin embargo, dado los escasos aislamientos resistentes a dichos antibióticos, la búsqueda de estos mecanismos por vías convencionales, así como ensayos de electroforesis en campo pulsado o de conjugación se vieron limitados. Una de las técnicas planteadas inicialmente para mitigar la posible falta de detección de genes resistentes a ACs por vías convencionales era la realización de secuenciación y análisis mediante metagenómica. Una vez finalizada la recolección de muestras, comenzamos con el procesamiento de éstas para su secuenciación.

Se utilizó un kit de extracción de ADN genómico a partir de muestras de alimentos, las cuales se cuantificaron fluorométricamente mediante Qubit (ThermoFischer). Algunas muestras debieron ser concentradas mediante centrifugación al vacío para alcanzar la concentración solicitada por el servicio de secuenciación, Macrogen Inc. Corea.

Los genomas fueron secuenciados en el servicio mencionado, donde fueron secuenciados mediante shotgun y los reads analizados con el pipeline de SqueezeMeta, el cual permite el co-ensamblaje de metagenomas estimando las abundancias de genes relacionados y la recuperación de genomas individuales mediante procedimientos de binning, y luego mediante utilización del programa R Studio, se determinaron los taxones y funciones metabólicas.⁴⁹

Resultados, análisis y discusión

Se procesaron 80 muestras de alimento congelado provenientes de Brasil, las cuales correspondían a 5 marcas distintas ubicadas en supermercados disponibles para su compra.

A partir de las muestras procesadas se identificaron 19 aislamientos de Enterobacteriales capaces de crecer en medios suplementados con antibióticos. Los microorganismos correspondieron a: 6 *C. freundii*, 2 *S. marcescens*, 3 *E. coli*, 1 *E. vulneris*, 2 *E. asburiae*, 1 *E. cloacae*, 1 *E. kabei*, 2 *K. oxytoca* y 1 *K. varicolla*. Tabla 1 y 2.

Los aislamientos correspondientes al género Enterobacter, se caracterizan por poseer una beta-lactamasa de tipo AmpC cromosómica de expresión inducible o constitutiva, la cual les confiere resistencia a cefalosporinas de segunda y tercera generación, aminopenicilinas y resistencia a inhibidores de beta-lactamasas como ser ácido clavulánico. Esto explica la razón por la cual crecieron en medios suplementados con ceftriaxona y el perfil de susceptibilidad antibiótica observado. Se realizó la búsqueda de esta enzima para confirmar su expresión mediante un test sinergia utilizando ceftazidime, ácido borónico y ceftriaxona, la cual fue positiva. Por otro lado, se les realizó test de sinergia para la búsqueda de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) siendo el resultado negativo.

Asimismo, *E. vulneris* presenta a nivel cromosómico la enzima AmpC, la cual suele ser de baja expresión. Se realizó búsqueda de BLEE y test de sinergia mediante ácido borónico, siendo solamente el resultado positivo para enzimas de clase C. Pese a que esta especie presenta AmpC cromosómica, se asocia principalmente a enzimas AmpC de tipo plasmídico, por lo que se realizaron ensayos de conjugación, siendo los resultados negativos.

Por otra parte, se obtuvieron 16 aislamientos capaces de crecer en medio suplementado con colistin (3ug/ml). Tabla 2.

10 aislamientos presentaron resistencia a ampicilina, atribuibles a la presencia de AmpC cromosómica o beta-lactamasas de espectro ampliado. Además, dado su crecimiento en placas de Mc Conkey Lactosa suplementado con colistin (3ug/ml),

se estudió su sensibilidad mediante el colistin agar test (CAT, CLSI 2021), siendo dos de los aislamientos resistentes con una CIM mayor o igual a 4 ug/ml. Estos aislamientos fueron procesados para la búsqueda de resistencia transferible a colistin del tipo mcr, mediante la utilización del protocolo propuesto por Gonzales Escalante E. (2020), siendo negativo. Asimismo, dado resultados previos por el equipo de trabajo, se realizó la búsqueda mediante PCR a tiempo final para las variantes mcr1-9, siendo los resultados negativos. Estas resistencias pueden atribuirse a mecanismos de resistencia cromosómica como ser mutaciones en los genes presentes en el sistema regulatorio de PhoPQ-PmrAB, o modificaciones en el LPS, hiperproducción de la cápsula polisacáridica o presencia de bombas de expulsión activa.

Tres aislamientos presentaron resistencia a ciprofloxacina y enrofloxacin, para lo cual se realizará la búsqueda de genes qnr y aac(6')Ib-cr, no detectándose resistencia transferible en estos casos.

Por otro lado, se identificaron 8 bacilos Gram negativos no fermentadores; 5 *P. putida*, 2 *P. fulva* y 1 *P. moteilli* a partir de medios suplementados con ceftriaxona y colistin. Su crecimiento en medios suplementados con ceftriaxona, se debe a la resistencia natural que presentan estos microorganismos a dicho antibiótico. Se realizaron estudios de susceptibilidad antibiótica a ceftazidime, cefepime, ciprofloxacina, enrofloxacin, gentamicina y amikacina, siendo todos los aislamientos sensibles. Además, se estudió la sensibilidad a colistina mediante CAT, siendo uno de los aislamientos resistente a dicho antibiótico con una CIM mayor o igual a 4 ug/ml.

Este aislamiento fue procesado para la búsqueda de resistencia transferible a colistin del tipo mcr, siendo positivo para el screening con EDTA/colistin. En este caso se realizó la búsqueda mediante PCR de genes mcr variantes del 1 al 9, siendo todas negativas. Para este aislamiento queda pendiente la secuenciación completa de genoma para lograr identificar el mecanismo de resistencia involucrado en este caso, dado que este antibiótico integra la lista de antibióticos de importancia crítica de máxima prioridad según la OMS.

Además, se realizaron ensayos de conjugación para ver si este mecanismo de resistencia era movilizable pero no se logró su transferencia, siendo una posibilidad de que el mecanismo sea cromosómico o se ubique en un plásmido no conjugativo.

Continuando, dado el bajo número de aislamientos detectados por métodos convencionales se procedió a la realización de búsqueda de microorganismos y sus mecanismos de resistencia mediante la realización de secuenciación metagenómica directamente a partir de la muestra. Para ello, se enviaron 14 muestras a secuenciar, de las cuales 8 pasaron los requisitos para ser procesadas por el servicio.

Dada la falta de experiencia en el equipo en el proceso de datos metagenómicos, se realizó la puesta a punto del pipeline de SqueezeMeta y su posterior procesamiento para la obtención de datos.

De éstos se pudo constatar una importante presencia de Firmicutes (>45%); las principales familias descritas fueron Bacillaceae, Lactobacillaceae y Paenibacillaceae, y dentro de éstas los géneros, *Bacillus* y *Leuconostoc*, entre otros. Figura 1 y 2.

El elevado porcentaje de microorganismos obtenidos pertenecen al filo Firmicutes, el cual comprende bacterias Gram positivas. Esto explica la falta de crecimiento en medios McConkey Lactosa (medios selectivos y diferenciales) utilizados usualmente en el laboratorio para el crecimiento de bacterias Gram negativas (objetivo de nuestro trabajo).

La presencia de Proteobacterias fue baja (0,1-1,65%), las familias más representadas fueron Enterobacteriaceae, Moraxellaceae, Aeromonadaceae, Vibrionaceae y Pseudomonadaceae, a expensas de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, entre otras. Figura 1 y 3.

En las muestras donde no fue posible el aislamiento de bacterias Gram negativas, los porcentajes de Proteobacterias detectados fue muy bajo, lo que explica el escaso desarrollo en los medios de cultivos (porcentaje 0.01-0.015). Mientras que en las muestras que presentaron crecimiento bacteriano, este fue mayor, pudiendo alcanzar un porcentaje de abundancia del 1.65%.

Asimismo, utilizando AMRfinder fue posible determinar los genes de resistencia presentes en las muestras. Se detectaron genes de resistencia a beta-lactámicos (bla, blaP, bla2, blaBPU y blaCTX-M), cloranfenicol (cat86), eritromicina (mefA), fosfomicina (fosB), lincomicina (lnuG, lsaD), macrólidos (mphK y ermD), amonio cuaternario (qacH), estreptomycin (aadK), tetraciclina (tet) y vancomicina (vanR y S). Tabla 3

Los principales mecanismos de resistencia detectados correspondieron a bombas de expulsión activa, genes mef(A), mphK, tet(45), tet(L), tet(M) y tet(A(P)).

La mayoría de los genes señalados presentaron cobertura y mayor porcentaje de similitud a genes de resistencia antimicrobiana de microorganismos Gram positivos, principalmente *Bacillus* spp según la base de datos de ncbi.nlm.nih.gov.

Dada la abundancia de microorganismos Gram positivos era esperable que los genes de resistencia detectados correspondiesen a mecanismos presentes en estos. Tal es el caso de la presencia de genes de resistencia a lincosaminas, macrólidos, estreptograminas y glicopéptidos, antibióticos activos sobre Gram positivos, usualmente utilizados en la

práctica clínica para su tratamiento.

Por otro lado, se destaca la detección de blaCTX-M, una BLEE usualmente detectada en bacilos Gram negativos presentes en humanos y animales de granja según reportes previos realizados por nuestro equipo de trabajo, además de ser uno de los mecanismos de resistencia a beta-lactámicos más relevantes epidemiológicamente a nivel mundial dada su presencia en elementos genéticos móviles. Si bien este mecanismo de resistencia no fue detectado por los métodos convencionales, el mismo pudo detectarse mediante metagenómica. Esto puede deberse al bajo número de Proteobacterias presentes en las muestras.

Conclusiones y recomendaciones

En este trabajo nos planteamos la detección de mecanismos de resistencia a antibióticos críticos para la salud humana en alimento congelado proveniente de Brasil. Si bien hipotetizamos que los niveles de resistencia serían similares a los encontrados en pollos bebes de un día de vida provenientes del mismo país, esto no fue así. Una de las posibles razones es el procesamiento de los alimentos para que la carga bacteriana sea baja para cumplir con los requisitos establecidos para su consumo, principalmente bacilos Gram negativos.

De todas formas, se detectó la presencia de genes RAM críticos para la salud humana en alimentos congelados importados, lo cual estaría sorteando las políticas de restricción del uso de antibióticos en salud humana y producción animal en Uruguay.

Por último, se logró la formación de personal en el procesamiento de secuencias metagenómicas, poniendo a punto metodologías de trabajos no antes realizadas por el equipo de trabajo, lo cual permitió establecer una plataforma para continuar con el estudio multidisciplinario de resistencia antimicrobiana en Una Salud.

Referencias bibliográficas

1. Organización Panamericana de la Salud. Plan de acción sobre la resistencia a los antimicrobianos antimicrobianos. 2015:1-3.
2. Approach OH. Application of a One Health Approach.
3. WHO. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. Bulletin of the World Health Organization. 2014;61(3):383-394. doi:10.1007/s13312-014-0374-3
4. Roberts RR, Hota B, Ahmad I, et al. Hospital and Societal Costs of Antimicrobial-Resistant Infections in a Chicago Teaching Hospital: Implications for Antibiotic Stewardship. *Clinical Infectious Diseases*. 2009;49(8):1175-1184. doi:10.1086/605630
5. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations the Review on Antimicrobial Resistance. 2016;(May). doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
6. Resistance PA. Campaign to Prevent Antimicrobial Resistance Clinicians hold the solution?! Emergence of Antimicrobial Resistance.
7. http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/docs/amr_factsheet.pdf.
8. Lista OMS de Antimicrobianos de Importancia Crítica para la medicina Humana.
9. Jane Parmley, Zee Leung, David Léger, Rita Finley, Rebecca Irwin, Katarina Pintar, Frank Pollari, Richard Reid-Smith, David Waltner-Toews, Mohamad Karmali and RE. ONE HEALTH AND FOOD SAFETY—THE CANADIAN EXPERIENCE: A HOLISTIC APPROACH TOWARD ENTERIC BACTERIAL PATHOGENS AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE - Improving Food Safety Through a One Health Approach - NCBI Bookshelf. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK114511/>. Accessed May 19, 2020.
10. Alimentarias Z. Resistencia a los antimicrobianos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 2017;43(1).
11. Chen C, Yan X, Wang S, Jackson CR. Application of Metagenomic Technologies for Antimicrobial Resistance and Food Safety Research and Beyond ?. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-801214-7.00020-X
12. Lammie SL, Hughes JM. Antimicrobial Resistance , Food Safety , and One Health?: The Need for Convergence. doi:10.1146/annurev-food-041715-033251
13. Global Foodborne Infections Network, Formerly Known as WHO Global Salm-Surv (GFN). Atlanta, GA: US Dep. Health Hum. Serv. <http://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/international/gfin.htm>.
14. Value of an aggregate index in describing the impact of trends in antimicrobial resistance for *Escherichia coli*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4353267/>. Accessed May 19, 2020.
15. Projahn M, Tippelskirch P Von, Semmler T, Guenther S, Alter T, Roesler U. Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing- *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* during scalding and defeathering of broiler carcasses. *Journal Of Food Microbiology*. 2019;77(May 2018):185-191. doi:10.1016/j.fm.2018.09.010
16. Schwaiger K, Huther S, Hölzel C, Kämpf P, Bauer J. International Journal of Food Microbiology Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria , Germany. *International Journal of Food Microbiology*. 2012;154(3):206-211. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.014
17. Messele YE, Abdi RD, Yalew ST, Tegegne DT. Molecular determination of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from raw meat in Addis Ababa. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2017:1-9. doi:10.1186/s12941-017-0233-x
18. Chaisatit C, Tribuddharat C, Pulsrikarn C, Dejsirilert S. Molecular Characterization of Antibiotic-Resistant Bacteria in Contaminated Chicken Meat Sold at Supermarkets in Bangkok , Thailand. 2012:527-534.
19. Shang K, Wei B, Jang H, Kang M. Phenotypic characteristics and genotypic correlation of antimicrobial resistant (AMR) *Salmonella* isolates from a poultry slaughterhouse and its downstream retail markets. *Food Control*. 2019;100(January):35-45. doi:10.1016/j.foodcont.2018.12.046
20. Özpınar H, Tekner H, Sarıcı B, Çakmak B. Phenotypic characterization of ESBL- and AmpC- type beta- lactamases in Enterobacteriaceae from chicken meat and dairy products. 2017;(33):267-272.
21. Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group. 2013.
22. Who Guidelines on Use of Medically Important Antimicrobials in Food-Producing Animals.
23. <https://www.proa.hc.edu.uy/>. Programa de Optimización de Antimicrobianos (PROA) del Hospital de Clínicas.
24. Decreto N° 98/011. <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/98-2011>. Accessed May 19, 2020.
25. Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria en Uruguay . Notificación Semanal. :24.
26. Pérez L, Apezteguía L, Piñeyría C, et al. Síndrome urémico hemolítico con compromiso renal leve debido a una cepa de

- Escherichia coli* productora de toxina Shiga [Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC)] O145. *Revista Argentina de Microbiología*. 2014;46(2):103-106. doi:10.1016/S0325-7541(14)70056-2
27. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nature reviews Microbiology*. 2011;9(4):233-243. doi:10.1038/nrmicro2536
 28. Harris AD, McGregor JC, Furuno JP. What infection control interventions should be undertaken to control multidrug-resistant gram-negative bacteria? *Clin Infect Dis*. 2006;43 Suppl 2(1537-6591 (Electronic)):S57-S61. doi:10.1086/504479
 29. Vollaard EJ, Clasen HAL. MINIREVIEW Colonization Resistance. 1994;38(3):409-414. doi:10.1128/AAC.38.3.409
 30. Kirkland KB. Bacterial Colonization: Can We Live With It? *Clinical Infectious Diseases*. 2009;48(10):1382-1384. doi:10.1086/598195
 31. Bado I, Seija V, Gonzalez-Zorn B, et al. Molecular Characterization of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First rmtC Gene in the Species. *Microbial Drug Resistance*. 2018;24(7):1012-1019. doi:10.1089/mdr.2017.0300
 32. Garcia-Fulgueiras V, Araujo L, Bado I, et al. Allodemic distribution of plasmids co-harboring bla CTX-M-15 / aac(6?)-Ib-cr/ qnrB in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum ?-lactamases in Uruguay's paediatric hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017;9:68-73. doi:10.1016/j.jgar.2017.01.008
 33. Robino L, Telechea H, Speranza N, et al. Risk factors for the acquisition of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in hospitalized children. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2013;7(4):361-364. doi:10.3855/jidc.3014
 34. Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, et al. CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;6(2010):5-9. doi:10.1016/j.jgar.2016.02.001
 35. Bado I, Papa-Ezdra R, Cordeiro N, et al. Detection of qnrVC6, within a new genetic context, in an NDM-1-producing *Citrobacter freundii* clinical isolate from Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2018;14. doi:10.1016/j.jgar.2018.02.023
 36. Papa Ezdra R, Bado I, Cordeiro N, et al. VIM-2-producing *Pseudomonas* spp. in Uruguay: Sequence types, pulsotypes, and class 1 integrons including new variable regions featuring blaVIM-2 and blaGES-7. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(9):5620-5622. doi:10.1128/AAC.00388-16
 37. Ram J, Márquez C, Vignoli R. First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical. *Revista Argentina de Microbiología*. doi:10.1016/j.ram.2019.10.003
 38. Bado I, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, et al. First human isolate of *Salmonella enterica* serotype enteritidis harboring bla<inf>CTX-M-14</inf>in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(4). doi:10.1128/AAC.05530-11
 39. Umpiérrez A, Bado I, Oliver M, et al. Zoonotic potential and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in neonatal calves in Uruguay. *Microbes and Environments*. 2017;32(3). doi:10.1264/jsme2.ME17046
 40. Cordeiro NF, Nabón A, García-Fulgueiras V, et al. Analysis of plasmid-mediated quinolone and oxyimino-cephalosporin resistance mechanisms in Uruguayan *Salmonella enterica* isolates from 2011–2013. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2016;6:165-171. doi:10.1016/j.jgar.2016.06.002
 41. Coppola N, Cordeiro N, Trenchi G, Ávila P, Zunino P, Bado I VR. Chicken Run. *ASM Microbe* 2020.
 42. Coppola N, Ávila P, Trenchi G, Freire B, Umpiérrez A, Cordeiro N, Castro G, Casaux ML, Fraga M, Zunino P, Bado I VR. Rebellion on the farm. *ASM Microbe* 2020.
 43. Bennett N, Bentancur A, Fernandez F, Kurioka M. Plan Nacional de contención de la Resistencia Antimicrobiana de Uruguay. 2017.
 44. Cuentas TE de. Actuación contra la resistencia a los antimicrobianos: Pese a los avances en el sector animal, esta amenaza sanitaria sigue siendo un reto para la UE. 2019.
 45. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>.
 46. N. Cópola, N Cordeiro, G. Trenchi, P. Ávila, P. Zunino, I. Bado RV. Genes de resistencia antibiótica transferibles en enterobacterias recuperadas de pollitos de un día importados de Brasil. II Congreso de Biociencias. 2019.
 47. Coque M, Angel M, Romo M, Mansilla EC. Procedimientos En Microbiología Clínica Recomendaciones de La Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Técnicas Microbiológicas de Detección de Microorganismos Multirresistentes En Animales, Alimentos y Muestras Ambientales.; 2016.
 48. Bado I, Cordeiro NF, Robino L, et al. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum ?-lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010;36(5). doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.06.042
 49. Tamames J and Puente-Sánchez F (2019) SqueezeMeta, A Highly Portable, Fully Automatic Metagenomic Analysis

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)