



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus* spp. y *Escherichia coli* de origen alimentario procedentes de España y Colombia

Autor/es

LILIANA MORALES LAVERDE

Director/es

CARMEN TORRES MANRIQUE

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



***Fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos en cepas de
Staphylococcus spp. y Escherichia coli de origen alimentario procedentes de
España y Colombia***, de LILIANA MORALES LAVERDE

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2018

© Universidad de La Rioja, 2018
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Trabajo Fin de Máster

Fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos en cepas de *Staphylococcus spp.* y *Escherichia coli* de origen alimentario procedentes de España y Colombia

Autor:

Liliana Andrea Morales Laverde

Tutor: Carmen Torres Manrique

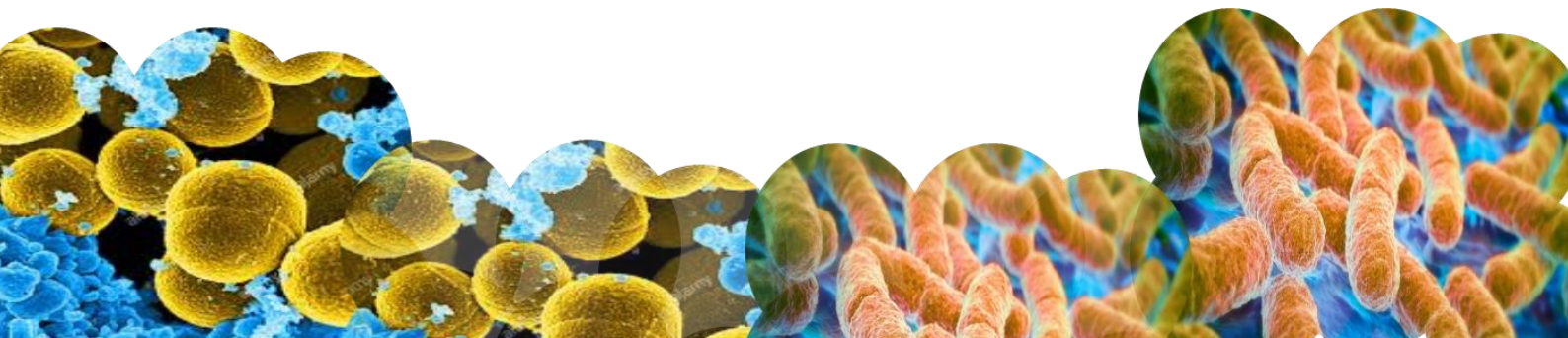
MÁSTER

Máster en Química y Biotecnología

Escuela de Máster y Doctorado



AÑO ACADÉMICO: 2017/2018



A Dios porque es fiel a sus promesas

A mis padres por creer en mí y apoyarme incondicionalmente

A mis hermanos, Herwin y Laura, mi principal motivación

Este apartado es un reconocimiento a quienes directa o indirectamente, han aportado en el desarrollo de este TFM.

En primer lugar, quiero agradecer a la AUIP, la Universidad de La Rioja y el Gobierno de La Rioja, por otorgarme la beca que me permitió estar en Logroño y cursar el Máster en Química y Biotecnología en la Universidad de La Rioja; no todas las personas tienen oportunidades como esta, que en mi caso, además de aportar a mi crecimiento personal, me ha impulsado a seguir creyendo en mí y en mis sueños.

Por supuesto a Carmen Torres, mi tutora, mi mayor gratitud por abrir las puertas de su grupo de investigación para que yo realizara este TFM, gracias por estar siempre pendiente de mí, enseñarme y guiarme durante todo el proceso. También, quiero agradecer de manera especial a mi profesora de pregrado Giovanna Rincón y a mis colegas, María Fernanda y María José, por su esfuerzo y aporte en este proyecto, en el aislamiento y envío de las cepas de *E. coli* que fueron incluidas en este estudio.

Gracias a todos mis compañeros del laboratorio, por estar siempre dispuestos a ayudar y compartir sus conocimientos, ha sido una experiencia muy agradable trabajar con ustedes, me han hecho sentir parte del equipo y han convertido el laboratorio en mi segundo hogar. También a mi tutora de prácticas, Yolanda Sáenz, y a las chicas del CIBIR en especial María, Carmen y Lidia, por recibirme; la experiencia en este centro ha sido un aporte importante para la realización de este proyecto y la reafirmación de mi interés en el campo de investigación.

A todas las personas que he conocido en España, gracias, se han convertido en grandes amigos, sin su compañía este Máster y el amor que siento por Logroño no habría sido lo mismo. Por último, a mis amigos de Colombia y familia, que incluso con siete horas de diferencia horaria no han permitido que me sienta sola, han creído en mí y me han dado ánimo y fuerzas cuando más lo he necesitado.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 El descubrimiento de la penicilina y la resistencia a los antibióticos.....	5
1.2 Género <i>Staphylococcus</i>	8
1.3 Resistencia a los antibióticos en estafilococos.....	8
1.4 Factores de virulencia de <i>S. aureus</i> y <i>cluster</i> de evasión del sistema inmune humano (IEC)	10
1.5 Resistencia a metilina en <i>S. aureus</i> (SARM) y CC398. Importancia en seguridad alimentaria	12
1.6 Enterobacterias productoras de BLEE.....	13
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo general.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 Medios de cultivo	19
3.1.1 Agar Brain Heart Infusion (BHI) (CONDA).....	19
3.1.2 Caldo BHI + NaCl 6,5 % (CONDA).....	19
3.1.3 Manitol Salt Agar (MSA) (CONDA).....	19
3.1.4 Oxacillin Resistance Screening Agar Base (ORSAB) (OXOID).....	20
3.1.5 Agar Mueller Hinton (MH) (CONDA)	20
3.1.6 Agar cromocult suplementado con cefotaxima	21
3.1.7 Leche deshidratada	21
3.2 Obtención de las cepas	21
3.2.1 Aislamiento de <i>Staphylococcus</i> spp	21
3.2.2 Aislamiento de <i>E. coli</i>	22

3.3 Identificación de las cepas	23
3.3.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	23
3.3.2 Preparación de las cepas para la identificación	23
3.4 Determinación del fenotipo de resistencia.....	24
3.7 Electroforesis.....	27
3.8 Secuenciación.....	28
3.9 Genotipo de resistencia	28
3.9.1 Genotipo de resistencia en <i>Staphylococcus</i> spp	28
3.9.2 Genotipo de resistencia en <i>E. coli</i>	31
3.9.2 Detección de factores de virulencia en <i>S. aureus</i>	33
3.10 Análisis gen <i>scn</i> del IEC en <i>S. aureus</i>	34
4. RESULTADOS	37
4.1 Cepas de SCP y SCN aisladas de muestras cárnicas	37
4.1.1 <i>S. aureus</i>	38
4.1.2 SCN	41
4.1.3 <i>E. coli</i>	43
5. DISCUSIÓN.....	47
6. CONCLUSIONES	55
7. REFERENCIAS.....	57

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de los mecanismos de acción de los antibióticos y mecanismos de resistencia	10
Tabla 2. Resumen de los factores de virulencia y su función en la patogenicidad de <i>S. aureus</i> 11	
Tabla 3. Clasificación de las BLEE según los sistemas de Ambler y Bush-Jacoby-Medieros..	15
Tabla 4. Composición agar BHI.....	19
Tabla 5. Composición agar BHI + NaCl 6,5%.....	19
Tabla 6. Composición agar MSA.....	20
Tabla 7. Composición agar ORSAB	20
Tabla 8. Composición agar MH	21
Tabla 9. Antibióticos evaluados para SCP y SCN, concentración de antibióticos e interpretación CLSI 2017 y 2018.	25
Tabla 10. Antibióticos evaluados para <i>E. coli</i> , concentración de antibióticos e interpretación según CLSI 2018.....	26
Tabla 11. Reactivos, concentración y volumen empleados en las reacciones de PCR.	27
Tabla 12. Genes de resistencia analizados en las cepas de SCP y SCN y condiciones de la reacción de PCR.....	28
Tabla 13. Genes BLEE analizados en <i>E. coli</i> y condiciones de las reacciones de PCR.....	31
Tabla 14. Cebadores y condiciones de PCR para los genes codificantes de factores de virulencia	33
Tabla 15. Condiciones de reacción PCR para la detección del gen <i>scn</i>	34
Tabla 16. Condiciones de PCR para la tipificación del gen <i>spa</i> en <i>S. aureus</i>	34
Tabla 17. Aislamiento de <i>S. aureus</i> en las 33 muestras analizadas.	37
Tabla 18. Distribución de las cepas aisladas según la especie aislada.	37
Tabla 19. Resultados del antibiograma de <i>S. aureus</i> aislados de muestras cárnicas	38
Tabla 20. Resumen resultados obtenidos fenotipo de resistencia cepas de <i>S. aureus</i>	40
Tabla 21. Resumen resultados obtenidos fenotipo de resistencia cepas de <i>S. aureus</i>	41
Tabla 22. Resumen fenotipo de resistencia cepas SCN.....	42
Tabla 23. Resultados del fenotipo y genotipo de resistencia en cepas SCN.....	42
Tabla 24. Resultados de los estudios de sensibilidad en <i>E. coli</i>	43
Tabla 25. Resumen caracterización fenotipo de resistencia y genes tipo BLEE cepas de <i>E. coli</i> 45	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ensayos relativos al descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming.....	5
Figura 2. Ejemplo del proceso de adquisición de resistencia a antimicrobianos.....	6
Figura 3. Formas de diseminación de bacterias resistentes (BR) o sus genes en diferentes nichos ecológicos.	7
Figura 4. Distribución y tipo de muestras empleadas.	22
Figura 5. Esquema de preparación de la placa para la identificación por MALDI-TOF.....	24
Figura 6. Esquema test de doble disco determinación de fenotipo BLEE.	25
Figura 7. Prevalencia de <i>S. aureus</i> y SARM según el tipo de muestra analizada.	39

ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico
AC	Asociado a la comunidad
AG	Asociado a la ganadería
AH	Asociado a ambientes hospitalarios
AMC	Amoxicilina-ácido clavulánico
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLEE	β-lactamasas de espectro extendido
°C	Grado Celsius
CC	Complejo clonal
CAZ	Ceftazidima
CHL	Cloranfenicol
CLI	Clindamicina
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
HCCA	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
ERI	Eritromicina
FOX	Cefoxitina
g	Gramo
GEN	Gentamicina
I+D	Investigación y desarrollo
ITU	Infecciones del tracto urinario
IEC	<i>Cluster</i> de evasión del sistema inmune
IMI	Imipenem

L	Litro
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser</i>
MH	Müller-Hinton Agar
MSA	<i>Manitol Salt Agar</i>
µL	Microlitro
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloruro de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORSAB	<i>Oxacillin Resistance Screening Agar Base</i>
P	Penicilina
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
SA	<i>S. aureus</i>
SARM	<i>S. aureus</i> resistente a meticilina
Seg	Segundo
SCIN	Inhibidor del complemento estafilocócico
SCN	<i>Staphylococcus</i> coagulasa positivo
SCP	<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativo
SXT	Trimetoprim-sulfametoxazol
TOB	Tobramicina
TOF	<i>Time-Of-Flight</i>
TSST	Toxina del Síndrome de <i>Shock</i> Tóxico
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

La resistencia a antibióticos es un problema de salud pública que se ha visto agravado por el amplio uso de los mismos en clínica humana y veterinaria, en animales destinados al consumo y en agricultura. Existen diferentes formas en que los microorganismos y sus genes pueden diseminarse; los alimentos constituyen un vehículo para este propósito. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* productoras de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) presentan una especial relevancia en salud pública. En este TFM se ha estudiado la resistencia a los antibióticos, desde el punto de vista fenotípico y genotípico, en bacterias que son colonizadores habituales del hombre y animales, pero también patógenos oportunistas que pueden ser transferidos por la cadena alimentaria. En este trabajo se ha realizado la caracterización de cepas de *Staphylococcus* coagulasa-positivo (SCP) y coagulasa-negativo (SCN), y de cepas de *E. coli* (posibles productoras de BLEE), provenientes de alimentos de productos cárnicos de España y Colombia, respectivamente. Se ha detectado *S. aureus* y SARM en el 49% y 36% de las 33 muestras de alimentos analizadas, existiendo una asociación importante con los alimentos derivados del cerdo (94%). El 84,6% de las cepas SARM y el 71,4% de las *S. aureus* sensibles a meticilina (SASM) pertenecían al complejo clonal CC398 (mayoritariamente *spa*-tipo-t011). También, se observaron complejos clonales diferentes a CC398 con *spa* t8151 y t8598, en los que se detectaron genes de virulencia como *pvl* y *eta*; no se detectó el gen *snc* del sistema IEC, sugiriendo un origen animal de los linajes. Asimismo, se encontró una gran variedad de especies de SCN como contaminantes de las muestras analizadas, siendo la especie *S. warneri* la segunda más frecuente (20%) después de *S. aureus* (44%). Se analizaron 34 cepas *E. coli* de alimentos de Colombia, detectándose producción de BLEEs del tipo CTX-M en el 82% de las mismas, siendo CTX-M-55 la variante más frecuente (73%). Además, se observó una alta prevalencia de *E. coli* CMY-2 en cepas BLEE-negativas pero resistentes a cefotaxima. Los resultados de este estudio indican que los alimentos cárnicos estudiados son un reservorio natural de bacterias como SARM y *E. coli* productoras de BLEE, representando una posible fuente

de diseminación de las mismas, sus genes de resistencia y factores de virulencia al hombre.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a public health problem that has been aggravated by the widespread use of them in human and veterinary clinics, in food-producing animals and in agriculture. There are different ways in which microorganisms and their genes can spread and food is a vehicle for this purpose. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolates are of particular relevance in public health. In this work, the resistance to antibiotics has been studied from the phenotypic and genotypic point of view, in bacteria that are commensals for humans and animals, but also opportunistic pathogens and they can enter into the food chain. In this study, the genetic characterization of coagulase-positive (CPS) and coagulase-negative staphylococci (CNS) as well as of cefotaxime-resistant *E. coli* strains recovered of meat products from Spain and Colombia, respectively, was carried out. *S. aureus* and MRSA have been detected in 49% and 36% of the 33 food samples analyzed from Spain, and there was an important association with pork-derived foods (94%). Up to 84.6% of the MRSA strains and 71.4% of the methicillin-susceptible *S. aureus* strains belonged to the CC398 clonal complex (mostly *spa*-type-t011). Clonal complexes other than CC398 were observed associated to *spa*-t8151 and t8598, in which *pvl* and *eta* virulence genes were detected. The *snc* gene of the IEC system (immune-evasion cluster) was not detected among *S. aureus* strains, suggesting an animal origin of them. Likewise, a great variety of CNS species were found as contaminants of the analyzed food samples, with the *S. warneri* species being the second most frequent (20%), after *S. aureus* (44%). Thirty-four cefotaxime-resistant *E. coli* strains of Colombian meat samples were analyzed, and ESBL production of the CTX-M type was detected in 82% of them, with CTX-M-55 being the most frequent variant (73%). In addition, a high prevalence of *E. coli* CMY-2-positive was observed in ESBL-negative but resistant to cefotaxime-resistant strains. The results of this study indicate that the meat foods studied are frequently contaminated by MRSA and ESBL-producing, *E. coli* strains,

representing a possible source of dissemination of these bacteria and their resistance and virulence genes to humans.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El descubrimiento de la penicilina y la resistencia a los antibióticos

El descubrimiento de la penicilina representa un antes y después en la historia de la medicina, como dijo el mismo Alexander Fleming al ser consciente de lo que había logrado; este primer antibiótico revolucionó la forma en que las infecciones eran percibidas. “*Cuando me desperté justo después del amanecer del 28 de septiembre de 1928, ciertamente no planeaba revolucionar toda la medicina al descubrir el primer antibiótico o asesino de bacterias del mundo, Pero supongo que eso fue exactamente lo que hice*”-Alexander Fleming (Tan & Tatsumura 2015).

Alexander Fleming se encontraba realizando experimentos con cepas de *Staphylococcus spp.* En uno de sus experimentos, el científico dejó la placa de cultivo abierta y esta se contaminó con una cepa de *Penicillium sp.* Al observar esta contaminación, se percató de que la placa presentaba una zona en la que la bacteria no crecía, acontecimiento que relacionó con la producción de una sustancia capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria. Tiempo después se purificó el compuesto que se denominó penicilina (Tan & Tatsumura 2015). En la Figura 1 se observan los resultados de los experimentos de Alexander Fleming, donde se evidencia la actividad antimicrobiana de la penicilina. Además, se observa una menor sensibilidad a la penicilina de las bacterias Gram negativas, mientras que las Gram positivas son más susceptibles.

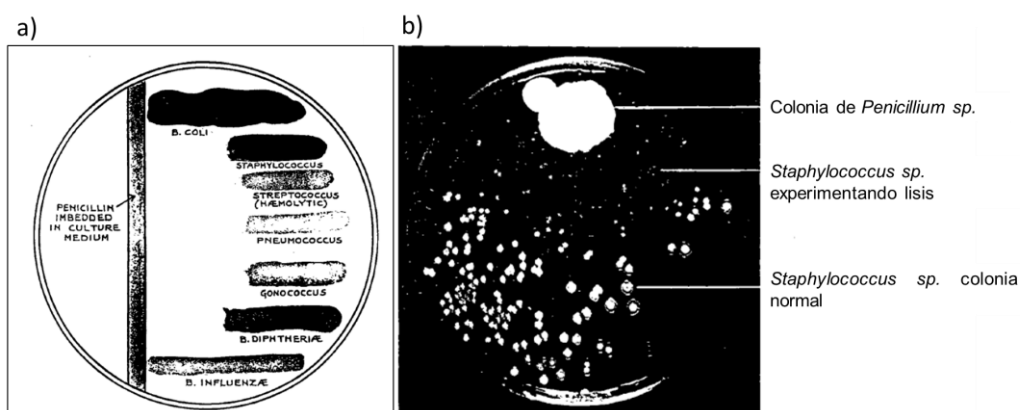


Figura 1. Ensayos relativos al descubrimiento de la Penicilina por Alexander Fleming a) Efecto antimicrobiano de la penicilina frente a diferentes géneros de bacterias; b) Colonia de *Staphylococcus sp.* experimentando lisis debido a la producción de la penicilina por una cepa de *Penicillium sp.* Adaptado de: (Fleming 1929)

Sin embargo, la era de oro de los antibióticos no duró mucho tiempo; desde 1945 el mismo Alexander Fleming y Howard Walter Florey dieron su primera advertencia sobre la resistencia a los antibióticos cuando aceptaron el Premio Nobel por el descubrimiento de la penicilina (Nathan & Cars 2014). Aunque la aparición de la resistencia en las cepas de *S. aureus* estimuló el desarrollo de nuevos antibióticos como la estreptomicina, la tetraciclina, la eritromicina y el cloranfenicol en la década de 1950, a medida que estos nuevos antibióticos se desarrollaron, también apareció resistencia a ellos (Nathan & Cars 2014).

En la actualidad, los principales microorganismos causantes de infecciones son resistentes a muchos de los antibióticos convencionales, convirtiéndose en un problema de salud pública de dimensión global debido a la facilidad con que adquieren y diseminan estos mecanismos la resistencia (Figura 2) (Foster 1996; Boswihi & Udo 2018).

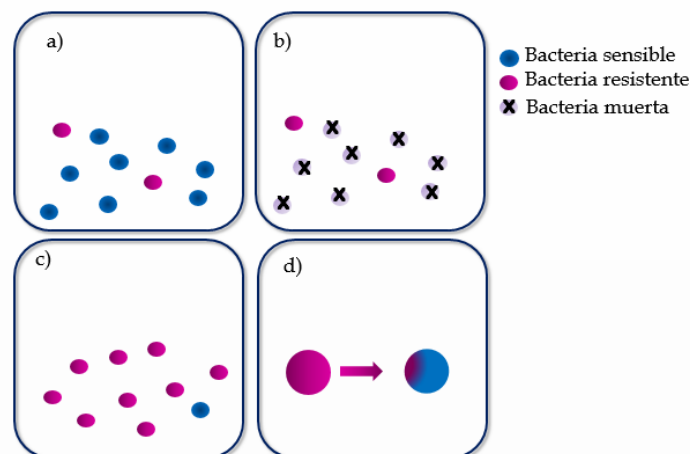


Figura 2. Ejemplo del proceso de adquisición de resistencia a antimicrobianos: a) en una infección puede haber gran cantidad de bacterias sensibles y pocas resistentes; b) al utilizar antimicrobianos, las cepas sensibles, causantes de la infección, mueren al igual que aquellas cepas que hacen parte de la microbiota y que ejercen una función protectora, quedando solo las bacterias resistentes; c) al no tener competencia, las bacterias resistentes se reproducen en mayor cantidad; d) y pueden transmitir los genes de resistencia a otras bacterias sensibles. Adaptado de <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>

Aunque la resistencia a los antibióticos suele asociarse al ámbito clínico, muchos de los antimicrobianos utilizados en animales destinados a la alimentación, así como en la producción de plantas, son idénticos o están relacionados estructuralmente con los antimicrobianos utilizados en seres humanos (Ojer-usoz et al., 2017).

Estudios sobre la epidemiología de los mecanismos de resistencia a antimicrobianos y el papel de la transferencia horizontal de los genes determinantes de la resistencia, sugieren que el uso de antimicrobianos en animales, destinados al consumo, selecciona microorganismos resistentes, que luego son diseminados entre animales, su medio ambiente y a los seres humanos por contacto directo o a través de la cadena alimenticia (Figura 3) (Ojer-usoz et al., 2017; WHO 2017).

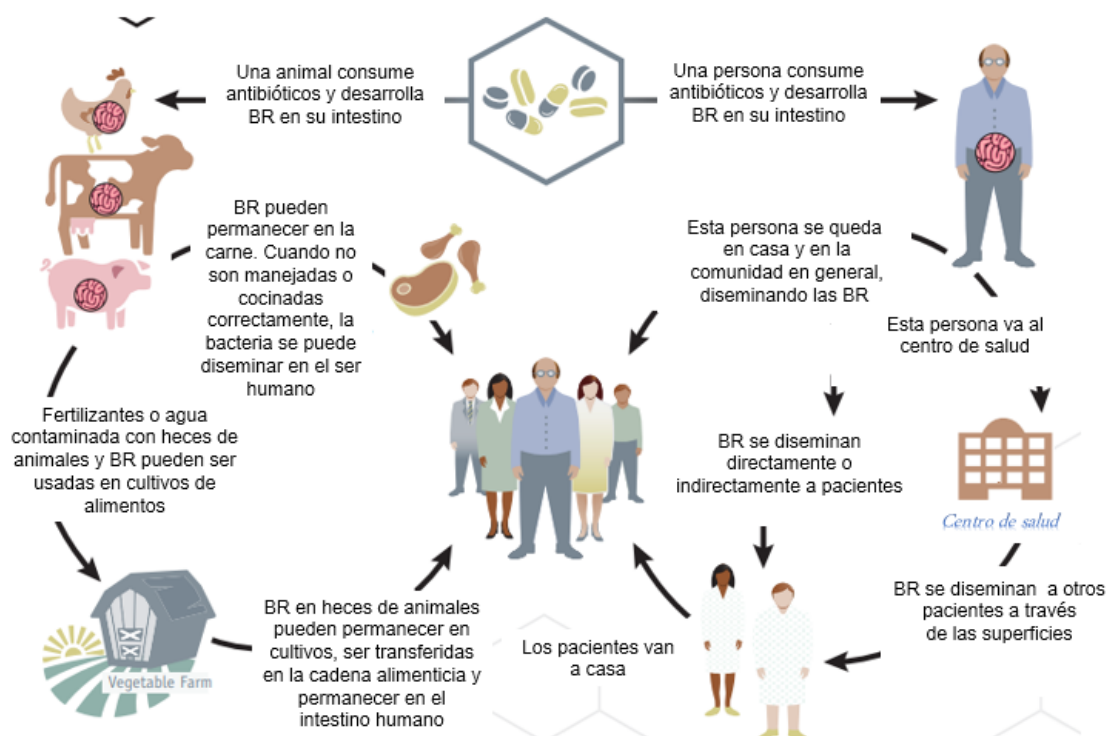


Figura 3. Formas de diseminación de bacterias resistentes (BR) o sus genes en diferentes nichos ecológicos. Adaptado de: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/2-2013-508.pdf>

Varias organizaciones importantes como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA), el Centro de Control y Prevención de Enfermedades y el Foro Económico Mundial, han centrado sus esfuerzos en la problemática de la resistencia a antibióticos bajo el concepto **“One Health”**, una estrategia mundial, que consiste en promover la colaboración interdisciplinar en el cuidado de la salud de personas, animales y medio ambiente entendiendo que todas se encuentran relacionadas (Nathan & Cars 2014).

En 2017, la OMS hizo pública una lista con el propósito de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como parte

de sus actividades para hacer frente a esta problemática. En esta lista, se clasifican las bacterias en función de su prioridad, en las categorías crítica (prioridad 1), elevada (prioridad 2) y media (prioridad 3). Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, resistentes a los carbapenémicos o productoras de β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) se encuentran agrupadas en la categoría crítica, mientras que las bacterias como *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM), con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina en la categoría elevada (WHO 2017).

1.2 Género *Staphylococcus*

Las bacterias de este género son cocos Gram positivos que se caracterizan por observarse al microscopio formando pares, cadenas cortas o agrupaciones en “racimos de uvas”, debido a su división en dos planos. Son catalasa positiva, característica que permite diferenciarlos de bacterias de otros géneros. Pueden clasificarse según su capacidad de producir la enzima coagulasa en positivos o negativos; entre los *Staphylococcus* coagulasa positivos (SCP) se encuentran *S. aureus*, *S. intermedius*/*S. pseudintermedius* o *S. delphini*, mientras que las demás especies constituyen los *Staphylococcus* coagulasa negativos (SCN) (Foster 1996).

Las especies de SCP y SCN forman parte de la microbiota de mucosas y piel en seres humanos y otros mamíferos; sin embargo, pueden ser patógenos oportunistas, que en ocasiones causan enfermedades dependiendo del estado inmunológico del huésped. *S. aureus* es la especie más patógena, posee diferentes mecanismos de virulencia que le permiten causar infecciones leves o graves y, junto con *S. epidermidis*, infecciones asociadas a dispositivos médicos permanentes. *S. saprophyticus* causa infecciones del tracto urinario, especialmente en las niñas, y otras especies (como *S. lugdunensis*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. schleiferi*, *S. intermedius*) son patógenos oportunistas infrecuentes (Foster 1996).

1.3 Resistencia a los antibióticos en estafilococos

Desde la introducción de la penicilina en el arsenal terapéutico, las cepas de estafilococos, principalmente *S. aureus*, se han caracterizado por

tener una rápida adaptabilidad a los antibióticos asociada a la transferencia y adquisición de gran variedad de mecanismos de resistencia, ya sea horizontal o verticalmente. Así, la resistencia a múltiples antibióticos es cada vez más común, al igual que la emergencia de cepas de SARM (Foster 2018).

Los antibióticos β -lactámicos tienen en común un anillo heterocíclico de cuatro átomos, tres de carbono y uno de nitrógeno. Actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana e interfieren en la síntesis del peptidoglicano mediante un bloqueo en la última etapa de su producción (transpeptidación). Además, activan la autolisina bacteriana endógena que destruye el peptidoglicano (Foster 2018). La resistencia a estos antibióticos es una de las más comunes tanto en SCP como en SCN y se produce debido a la producción de una enzima codificada por el gen *blaZ*, capaz de inactivar el anillo β -lactámico. La resistencia a la meticilina está mediada por el gen *mecA* y el gen *mecC* (descubierto recientemente) (Lozano 2012); estos genes codifican una proteína de unión a penicilina PBP2 diferente (PBP2A o PBP2C), que tiene una menor afinidad por este grupo de antibióticos. Aunque el término SARM se refiere solo a la resistencia a la meticilina, es muy común que se encuentre asociada con resistencia a otros antibióticos (Foster 2018).

También, en los últimos años se han presentado casos de cepas SARM resistentes a vancomicina, que resultan en infecciones invasivas serias que se vuelven intratables por la vancomicina. Estos microorganismos pueden presentar con frecuencia resistencia a otras familias de antibióticos como los macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas y aminoglucósidos (Foster 2018). En la Tabla 1 se resumen los mecanismos de acción de estos antibióticos, así como los mecanismos de resistencia frente a distintas familias de antibióticos en *Staphylococcus*.

Tabla 1. Resumen de los mecanismos de acción de los antibióticos y mecanismos de resistencia (Foster 1996; Lozano 2012; Foster 2018)

Antimicrobiano	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Base genética
Penicilina	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	serina β -lactamasa (<i>bla_Z</i>)	transposon Tn552 o Tn552 integrado en plásmido o cromosoma
Meticilina/Oxacilina	Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	Gen <i>mecA</i> o <i>mecC</i> que codifica PBP2a homóloga de PBP2, o PBP2c, respectivamente	Nuevo locus cromosómico (<i>SCCmec</i>) adquirido de fuente desconocida
Vancomicina y otros glicopeptidos	Unión al dipéptido D-Ala4-D-Ala5 del lípido II y previene la transglicosilación y transpeptidación catalizada por PBP2 y PBP2a	Expulsión de la célula-modificación del ribosoma	Plásmido con gen <i>van</i> -Nuevo locus cromosómico adquirido de fuente desconocida
Tetraciclina	impiden la unión del aminoacil-tRNA al sitio A del ribosoma bacteriano	Eflujo activo, protección ribosomal e inactivación enzimática.	Genes <i>tet</i> en el cromosoma o en plásmidos
Cloranfenicol	Inhibición de la actividad de la enzima peptidiltransferasa	Inhibición de cloranfenicol acetiltransferasas	Genes <i>cat</i> , <i>cfr</i> y <i>fex</i> en plasmidos, transposones o casetes cromosómicos
Macrolidos y lincosamidas	Unión reversible a la subunidad 50S del ARN mediante la formación de puentes de hidrógeno.	modificación de la diana-eflujo-inactivación	Genes <i>erm</i> y <i>cfr-msr</i> , <i>vga</i> , <i>mef</i> y <i>lsa-lnu</i> , <i>vat</i> , <i>vga</i> y <i>mph</i>
Aminoglucósidos	Unión irreversible a la subunidad 30S del ribosoma, bloqueando la síntesis proteica.	Alteraciones en el ribosoma, modificación enzimática	Genes <i>aph(2'')-aac(6')</i> , <i>ant(4')(4'')</i> , <i>aph(3')</i>

1.4 Factores de virulencia de *S. aureus* y cluster de evasión del sistema inmune humano (IEC)

Las infecciones causadas por *S. aureus* pueden clasificarse en superficiales, como abscesos localizados e infecciones cutáneas; toxiinfecciones por trasmisión alimentaria, síndrome de la piel escaldada y shock tóxico; sistémicas, como endocarditis, osteomielitis, neumonía, abscesos cerebrales, meningitis y bacteriemia (Al-mebairik et al., 2016). La patogenicidad de *S. aureus* está determinada por su capacidad de producir factores de

virulencia que le proporcionan la capacidad de colonizar, adherirse a las superficies, invadir o evadir el sistema inmunitario, desarrollar resistencia a múltiples antibióticos y causar toxicidad (Ahmadrajabi et al., 2017). Entre los factores de virulencia más importantes, se encuentran las leucocidinas, la toxina causante del síndrome de *shock* tóxico (TSST), las enterotoxinas, las toxinas exfoliativas y las hemolisinas; la función en la patogenicidad de *S. aureus* y los genes implicados en su expresión se resumen en Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los factores de virulencia y su función en la patogenicidad de *S. aureus* (Lozano 2012).

Factor de virulencia		Función	Gen codificante
Leucocidina de Pantón-Valentine	PVL	Destrucción leucocitaria y necrosis tisular.	lukS-PV/lukF-PV
Toxina del síndrome de Shock Tóxico	TSST	Síndrome de Shock Tóxico; asociado al uso de tampones.	<i>Tst</i>
Enterotoxinas	SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER Y SEU	Responsables de toxiinfecciones alimentarias. Algunas son termoestables y resistentes a enzimas digestivas.	<i>sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser y seu</i>
Toxinas exfoliativas	A, B y D de origen humano y C de origen animal.	Síndrome de piel escaldada e impétigo	<i>eta, etb, etc, etd</i>
Hemolisinas	Alfa, beta, gamma, delta y gamma variante	Ruptura de las membranas celulares	<i>hla, hlb, hld, hlg, hlg-2</i>

Por otra parte, los linajes genéticos de *S. aureus* que se encuentran adaptados al ser humano, con frecuencia contienen los genes del *cluster* de evasión del sistema inmune humano (IEC). Estos genes le dan la capacidad de evadir la respuesta inmune innata y adaptativa y causar infecciones en el ser humano (Thammavongsa et al., 2015). El sistema IEC contiene los genes *scn*, *chp*, *sak* y *sea* o *sep*, que tienen diferentes funciones para lograr la supervivencia de *S. aureus* (Benito et al., 2014). El gen *scn*, es un gen imprescindible para la evaluación del sistema IEC, permite contrarrestar la defensa inmune del huésped por la excreción del inhibidor del complemento estafilocócico de 85 residuos (SCIN). Este gen, inhibe las convertasas del

complemento central, bloqueando la conversión de la molécula C3 a C3b y reduciendo la fagocitosis después de la opsonización (Jongerijs et al., 2007).

La secuenciación de las cepas de *S. aureus* aisladas tanto de humanos como de animales ha revelado que solo ciertos genes del IEC se conservan entre cepas e incluso no se detectan entre linajes asociados a los animales (Benito et al., 2014). El sistema IEC, y especialmente la presencia clave del gen *scn*, está mayoritariamente presente en las cepas aisladas de humanos y se encuentra ausente en las provenientes de animales, por lo que podría ser un marcador de origen de las cepas (McCarthy & Lindsay 2013; Benito et al., 2014).

1.5 Resistencia a meticilina en *S. aureus* (SARM) y CC398. Importancia en seguridad alimentaria

SARM es uno de los principales agentes causantes de infecciones asociadas a ambientes hospitalarios (SARM-AH) y ha surgido como responsable de infecciones asociadas a la comunidad no hospitalarias (SARM-AC). En los últimos años se ha reportado el aislamiento de cepas asociadas al ganado (SARM-AG), animales salvajes y alimentos derivados, así como de profesionales que trabajan en la cría de animales o en producción de alimentos. Estos estudios han proporcionado información sobre su origen, diversificación y diseminación (Lozano et al., 2009; Li et al., 2015; Thammavongsa et al., 2015; Sergelidis & Angelidis 2017).

Las cepas SARM se agrupan en complejos clonales (CC), en los cuales se encuentran adscritas diferentes secuencias tipo (ST); esta agrupación se basa en sus características moleculares según el entorno al que se encuentran asociados. Aunque las cepas de *S. aureus* suelen tener huéspedes específicos, algunos CC tienen un tropismo más amplio (Wang et al., 2018). Los complejos CC1, CC9, CC97, CC133 o CC398, se encuentran asociados a cepas SARM-AG y han causado gran interés debido a su capacidad de rápida expansión clonal (Benito et al., 2014).

El CC398, fue inicialmente reportado en cerdos y personas en estrecho contacto con animales de granja como veterinarios y porcicultores; ha sido

identificado como la cepa SARM-AG más pandémica en Europa y América del Norte. Aunque el cerdo es su principal reservorio, se asocia a infecciones en ambientes libres de animales e incluso ambientes hospitalarios, indicando una alta capacidad de adaptación de este complejo en el ser humano (Wang et al., 2018). Su origen no está claro, pero se ha sugerido que proviene de la variante SASM CC398 de origen humano (OIE 2011).

Las cepas que pertenecen al linaje CC398 se presentan con un número variado de *spa* tipos, se caracterizan por ser resistentes principalmente a meticilina y tetraciclina; además de tener capacidad de adquirir múltiples determinantes de resistencia a antimicrobianos de otras familias de antibióticos (Benito et al., 2014). Asimismo, ciertos estudios evidencian que existe una disminución de factores de virulencia asociada con el fenotipo de multirresistencia en estas cepas (Argudín et al., 2011).

1.6 Enterobacterias productoras de BLEE

Como se ha mencionado en apartados anteriores, las enterobacterias productoras de BLEE son hoy en día uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial. Estas bacterias suelen ser comensales y se encuentran formando parte de la microbiota normal en el intestino de seres humanos y animales. Sin embargo, algunas cepas pueden llegar a ser patógenos importantes causando enfermedades graves. *E. coli* es la bacteria Gram negativa que causa con más frecuencia sepsis e infecciones del tracto urinario (ITU), y asimismo la que más se encuentra asociada a producción de enzimas tipo BLEE (Ojer-usoz et al., 2017).

Las cepas de *E. coli* causantes infecciones expresan con más frecuencia factores de virulencia tales como adhesinas, toxinas, sistemas de adquisición de hierro, biofilm e invasinas, que las cepas comensales del intestino humano o animal, así como mecanismos que les permiten adaptarse a los agentes antimicrobianos (Johnson et al., 2018; Ojer-usoz et al., 2017).

Las BLEE son β -lactamasas que confieren resistencia bacteriana a las penicilinas, cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación, y aztreonam, pero no a las cefamicinas o carbapenémicos. Estas enzimas tienen

la capacidad de hidrolizar e inactivar el anillo β -lactámico y son inhibidas por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico (Paterson & Bonomo, 2005). Derivan de modificaciones aminoacídicas de enzimas con menor espectro, TEM-1, TEM-2, ubicadas en plásmidos y SHV-1, ubicadas en el cromosoma. En los últimos años, las enzimas del tipo CTX-M, relacionadas con β -lactamasas cromosómicas de la bacteria *Kluyvera*, han emergido de manera muy importante. Otras enzimas tipo BLEE son BEL, BES, SFO, TLA, PER y VEB (Rivera et al., 2015).

Las BLEEs del tipo CTX-M se pueden englobar en 5 subgrupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 y CTX.M-9 y CTX-M-25; la mayoría hidroliza con mayor rapidez la cefotaxima que la ceftazidima y, a diferencia de las enzimas TEM y SHV, son inhibidas mejor por el tazobactam que por el ácido clavulánico (Rivera et al., 2015). Hasta la década de los noventa las BLEE más prevalentes en el mundo eran las de tipo TEM y SHV, asociadas principalmente a brotes de origen hospitalario causados por *Klebsiella pneumoniae*. Sin embargo, a partir del año 2000 la enzima tipo CTX-M se convirtió en una de las BLEE más frecuentes, a la vez que *E. coli* productor de CTX-M emergió como un importante uropatógeno de la comunidad (Blanco et al., 2016). Del mismo modo, diversos estudios han reportado una amplia diseminación de *E. coli* productor de BLEEs, no solo en el ámbito clínico, sino también en muestras de alimentos, animales destinados al consumo y aguas de diferentes países, representando un riesgo importante en la transmisión de estas bacterias al ser humano, ya sea por contacto directo o a través de la alimentación (Alonso et al., 2017; Maamar et al., 2015; Ben et al., 2015, entre otros).

En general, las BLEE se clasifican según las propuestas de Ambler o Bush-Jacoby-Medieros, basadas en su sistema molecular y funcional respectivamente. La más empleada es la clasificación de Ambler que las divide en los grupos A, B, C y D según su secuencia aminoacídica. En la Tabla 3 se resume la clasificación según los dos sistemas (Somalo 2013).

Tabla 3. Clasificación de las BLEE según los sistemas de Ambler y Bush-Jacoby-Medieros. Adaptado de Somalo 2013.

Clasificación molecular	Clasificación Funcional	Sustratos preferidos	Inhibición por		β -lactamasas representativas
			CVL o TZ	EDTA	
A (serin penicilinasas)	2a	Penicilinas	+	-	PC1 (<i>S. aureus</i>)
	2b (penicilinasas)	Penicilinas, C1G	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2BE (β -lactamasas de amplio espectro)	Penicilinas, C1G-C4G, monobactámicos	+	-	SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-MS
	2br	Penicilinas	-	-	TEM-39, SHV-10, SHV-72
	2c	Penicilinas, carbenicilina	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4, CARB-3
	2e	C1G-C4G	+	-	CepaA, FEC-1
	2f (serin-carbapenemasas)	Carbapenémicos	Variable	-	KPC-2, IMI-q, SE;-1
B (metalo- β -lactamasas)	3a (metalo- β -lactamasa)	Carbapenémicos	-	+	IMI-1, VIM-1, Cer-A, IND-1, L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1,
	3b (metalo- β -lactamasa)	Carbapenémicos	-	+	CphA, Sfh-1
	1	Cefalosporinas	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
C (cefalosporinasas)	1e	Cefalosporinas	-	-	GC1, CMY-32
	2d (cloxacilinasas)	Cloxacilina	Variable	-	OXA-1 a OXA-10
D (oxacilinasas)	2de	C1G-C4G	Variable	-	OXA-11 a OXA-15
	2df (carbapenemasas)	Carbapenémicos	Variable	-	OXA-23, OXA-48

CVL: ácido clavulánico; TZ: tazobactam

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Caracterizar el fenotipo y genotipo de resistencia de cepas de *Staphylococcus* (SCP y SCN) y de *E. coli* aisladas de productos cárnicos provenientes de España y Colombia.

2.1 Objetivos específicos

- Procesar, aislar e identificar cepas de SCP y SCN en muestras de alimentos de origen animal obtenidas en mercados de La Rioja.
- Estudiar los fenotipos de resistencia a los antibióticos en los aislados de SCP y SCN obtenidos y determinar la prevalencia de cepas SARM.
- Estudiar los genotipos de resistencia a antibióticos de las cepas SCP y SCN obtenidos, así como los genes de virulencia en las cepas *S. aureus*.
- Determinar las líneas genéticas de los aislados de *S. aureus* y su posible relación con un origen humano o animal.
- Estudiar la prevalencia β -lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en cepas de *E. coli* obtenidas de muestras alimentarias de origen aviar de Colombia.
- Analizar los genes de resistencia por PCR y secuenciación, en función de los fenotipos obtenidos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Medios de cultivo

3.1.1 Agar Brain Heart Infusion (BHI) (CONDA)

Medio de cultivo nutritivo que permite el crecimiento de diferentes tipos de microorganismos incluidos patógenos.

Tabla 4. Composición agar BHI

Composición	g/L
Infusión cerebro de ternera	7,5
Infusión corazón de vaca	10,0
Peptona	10,0
Dextrosa	2,0
Cloruro sódico	5,0
Fosfato disódico	2,5
Agar bacteriológico	15,0

3.1.2 Caldo BHI + NaCl 6,5 % (CONDA)

Medio de cultivo selectivo-diferencial que permite el crecimiento de microorganismos tolerantes a la sal. Empleado para favorecer el crecimiento de las cepas de SCP y SCN e inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas.

Tabla 5. Composición agar BHI + NaCl 6,5%

Composición	g/L
Infusión cerebro de ternera	7,5
Infusión corazón de vaca	10,0
Peptona	10,0
Dextrosa	2,0
Cloruro sódico	70,0
Fosfato disódico	2,5

3.1.3 Manitol Salt Agar (MSA) (CONDA)

Medio de cultivo selectivo-diferencial que inhibe parcialmente el crecimiento de microorganismos diferentes de los estafilococos. Así mismo, permite la diferenciación de SCP de los SCN a partir de su capacidad para fermentar el manitol. El indicador de cambio de pH es el rojo fenol que vira a amarillo en medio ácido. Los SCP forman colonias de color amarillo, mientras que los SCN se observan formando colonias rosadas.

Tabla 6. Composición agar MSA

Composición	g/L
Extracto de carne bovina	1,0
Digerido pancreático de caseína	5,0
Digerido péptico de tejido animal	5,0
D-manitol	10,0
Cloruro sódico	75,0
Rojo fenol	0,025
Agar	15,0

3.1.4 Oxacillin Resistance Screening Agar Base (ORSAB) (OXOID)

Medio selectivo que permite el aislamiento de microorganismos resistentes a la oxacilina. Se usa para el aislamiento de *S. aureus* (SARM), ya que una alta concentración de cloruro sódico y cloruro de litio inhiben el crecimiento de microorganismos no estafilocócicos. Este medio permite diferenciar los SCP (SARM) de los SCN mediante la coloración de las colonias por la capacidad de fermentar el manitol.

Tabla 7. Composición agar ORSAB

Composición	g/L
Peptona	11,0
Extracto de levadura	9,0
Extracto de carne de vaca	1,0
Oxacilina	0,002
D-manitol	10,0
Cloruro sódico	55
Cloruro de litio	5
Azul de anilina	0,2
Agar	12,5

3.1.5 Agar Mueller Hinton (MH) (CONDA)

Medio de cultivo nutritivo que por su composición ha sido recomendado por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), para ser utilizado de forma rutinaria en la realización de antibiogramas en medio sólido.

Tabla 8. Composición agar MH

Composición	g/L
Extracto ternera	2,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	15,0

3.1.6 Agar cromocult suplementado con cefotaxima

Medio de cultivo cromógeno selectivo-diferencial para el aislamiento de *E. coli* y bacterias coliformes. Al ser suplementado con cefotaxima, permite seleccionar cepas con capacidad de resistencia para este antibiótico. Se basa en la capacidad de la β -D-galactosidasa, una enzima que es característica de las bacterias coliformes, para escindir el sustrato Salmon-GAL. La reacción produce colonias de coliformes de color rojo asalmonado. El recuento de *E. coli* se basa en la escisión de los sustratos X-glucurónido por la β -D-glucuronidasa y Salmon-GAL por la β -D-galactosidasa, una combinación enzimática que es característica de *E. coli*. Cuando hay *E. coli* presente se escinden los dos sustratos, lo que da lugar a colonias que adquieren un color entre azul oscuro y violeta en oposición al rojo asalmonado de otras colonias de bacterias coliformes. Las bacterias no coliformes aparecen como colonias incoloras o, con baja frecuencia, de color turquesa. La formulación contiene, como inhibidor de las bacterias gram-positivas, heptadecilsulfato sódico, que no tiene efectos negativos sobre el crecimiento de *E. coli*.

3.1.7 Leche deshidratada

Medio empleado para la conservación de las cepas a -80°C .

3.2 Obtención de las cepas

3.2.1 Aislamiento de *Staphylococcus spp*

Las cepas de SCP y SCN fueron aisladas a partir de 33 muestras de alimentos cárnicos derivados del cerdo, pavo y pollo. Las muestras fueron adquiridas semanalmente durante 4 semanas consecutivas (7-11 muestras por semana) de 7 carnicerías de un mercado de Logroño (La Rioja). Se transportaron directamente al laboratorio de Bioquímica y Biológica Molecular

de la UR para su procesamiento. En la Figura 4 se resume la distribución y los tipos de muestras empleadas.

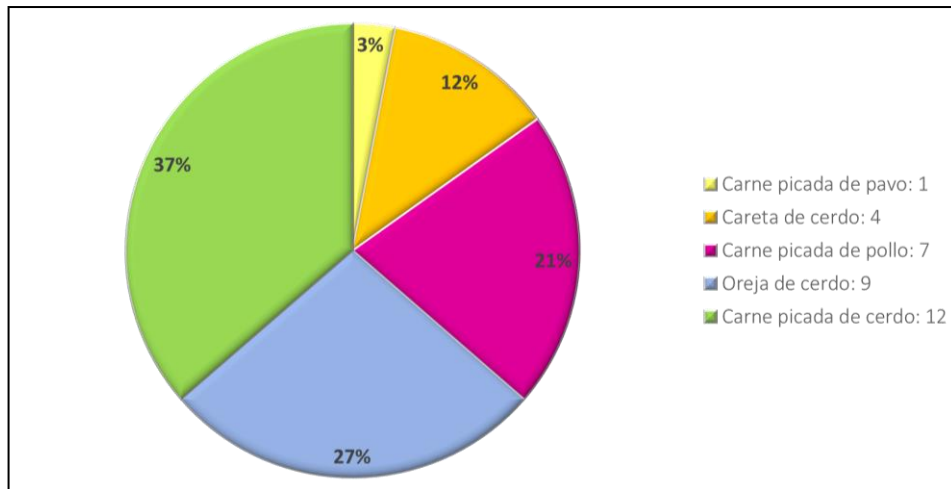


Figura 4. Distribución y tipo de muestras empleadas.

Para el procesamiento de las muestras se tomaron 0,5 g, en el caso de las muestras de carne picada, y se colocaron en 5mL de caldo BHI + NaCl al 6,5%. En cuanto a las muestras de oreja y careta, se pasó un hisopo estéril sobre la superficie de la muestra y luego se inoculó en el caldo BHI + NaCl al 6,5%. Después de 24 horas de incubación a 37°C, se revisó la turbidez para determinar la presencia de crecimiento. Se tomaron 1 μ L y 40 μ L y se extendieron en placas de agar MSA y medio ORSAB para el aislamiento de *Staphylococcus spp* y de SARM respectivamente. Se incubó 24 h a 37°C, se seleccionaron las colonias morfológicamente compatibles con SCP o SCN y se repicaron en medio BHI, para su posterior identificación.

3.2.2 Aislamiento de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* procedían de un estudio de 50 muestras de carne de pollo obtenidas en la ciudad de Barrancabermeja (Colombia). Dichas muestras fueron procesadas por el grupo de investigación de la Dra. Giovanna Rincón de la Universidad Industrial de Santander, Colombia, con la cual se ha establecido una colaboración científica. Se aislaron 34 cepas de 34 de las 50 muestras procesadas (una por muestra), las cuales crecieron en medios selectivos con cefotaxima y que por tanto eran potenciales cepas *E. coli* resistentes a dicho antibiótico. Dichas cepas fueron remitidas a la Universidad de La Rioja para ser caracterizadas en este TFM para determinar la producción

de BLEEs u otras β -lactamasas de interés. Tras la recepción de las cepas en la Universidad de La Rioja, fueron re-aisladas en agar BHI para su posterior identificación y caracterización.

3.3 Identificación de las cepas

3.3.1 Espectrometría de masas MALDI-TOF

Las cepas fueron identificadas mediante la técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF por sus siglas en inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time-Of-Flight*. El fundamento de esta técnica consiste en el bombardeo de las moléculas con una luz láser para producir la ionización de las mismas. Se utiliza un compuesto que tiene una alta absortividad (matriz), para evitar que los analitos reciban un exceso directo de energía que podría causar descomposición. El analizador de tiempo de vuelo (TOF) separa los iones dependiendo de su relación carga-masa (m/z) y mide el tiempo que tardan los iones en viajar a través de una región libre de campo. A partir del analizador, las proteínas y péptidos se ordenan según su abundancia relativa y masa en un espectro que constituye una “huella” individual para cada microorganismo. Este espectro, representa principalmente proteínas ribosomales y es posteriormente comparado con otras huellas peptídicas, presentes en una base de datos, para llevar a cabo la identificación (Shinghai et al., 2015).

3.3.2 Preparación de las cepas para la identificación

El proceso de preparación de la muestra para la identificación depende de la composición química de la pared celular. Así, los microorganismos Gram positivos necesitan un proceso de extracción previo a la identificación, mientras los Gram negativos pueden ser identificados por un método más directo (Figura 5).

La identificación de las cepas morfológicamente compatibles con SCP y SCN se realizó siguiendo el protocolo de extracción de MALDI Biotyper que se describe a continuación: se suspendió una colonia pura en 300 μ L de agua milliQ (ultrapura). Se adicionaron 900 μ L de etanol absoluto (Calidad HPLC), se mezcló y se centrifugó durante 2 min a 12.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante

y se centrifugó durante 2 min a 12.000 rpm. Con una pipeta, se eliminó el exceso de etanol y se dejó secar para su completa evaporación. Se resuspendió el sobrenadante en 15 μ L de ácido fórmico y se adicionó 15 μ L de acetonitrilo, se centrifugó nuevamente a durante 2 min a 12.000 rpm. Para finalizar, se puso 1 μ L del sobrenadante en los pocillos correspondientes de la placa, se dejó secar y se incorporó 1 μ L de la matriz Bruker HCCA (α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid), a cada pocillo.

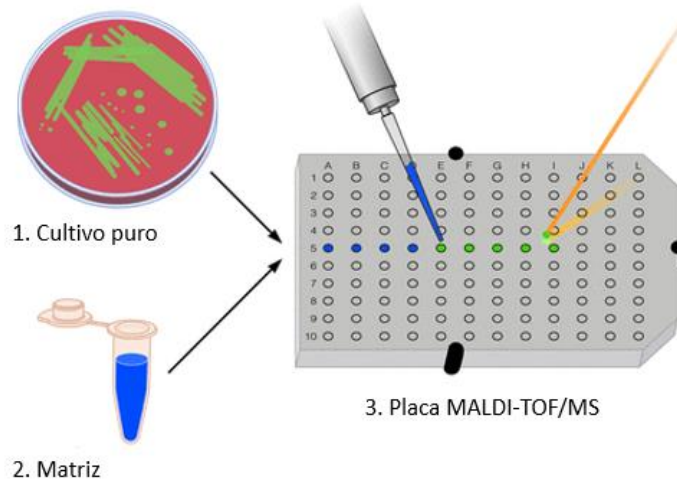


Figura 5. Esquema de preparación de la placa para la identificación por MALDI-TOF. Adaptado de Clark et al., 2013.

Para la identificación de las cepas de *E. coli*, se utilizó el protocolo de extracción de transferencia directa extendido de MALDI Biotyper. Se tomó una pequeña cantidad del microorganismo y se expandió homogéneamente en el pocillo correspondiente de la placa. Se cubrió con 1 μ L ácido fórmico y se dejó secar a temperatura ambiente. Por último, se agregó 1 μ L la matriz Bruker HCCA a cada pocillo. El espectrómetro de masas utilizado fue el Biotyper CA system microflex LT/SH.

3.4 Determinación del fenotipo de resistencia

Se realizó la evaluación de la sensibilidad a antibióticos mediante el método de difusión en agar o Kirby Bauer. A partir de un cultivo puro de 24 h se tomó una colonia y se suspendió en 3 mL de solución salina estéril (0,9% NaCl) hasta obtener una turbidez equivalente a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Posteriormente, con un hisopo estéril se extendió homogéneamente la suspensión en una placa de agar MH y se colocaron los discos de antibióticos

a evaluar; las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. Se midió el diámetro del halo de inhibición en mm y se interpretó el resultado de acuerdo con los criterios del CLSI 2017 y 2018.

Para las cepas de SCP y SCN se evaluó la sensibilidad a penicilina (P), cefoxitina (FOX), tetraciclina (TE), eritromicina (ERI), clindamicina (CLI), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB) y cloranfenicol (CHL). En la Tabla 9 se especifican las cargas y los criterios de interpretación según el CLSI.

Tabla 9. Antibióticos evaluados para SCP y SCN, concentración de antibióticos e interpretación CLSI 2017 y 2018.

Antibiótico	Carga (µg/disco)	Halo de inhibición (mm)		
		S	I	R
Penicilina (P)	10*	≥29		≤28
Cefoxitina (FOX)	30	≥22		≤21
Tetraciclina (TE)	30	≥19	15-18	≤14
Eritromicina (ERI)	15	≥23	14-22	≤13
Clindamicina (CLI)	2	≥21	15-20	≤14
Gentamicina (GEN)	10	≥15	13-14	≤12
Tobramicina (TOB)	10	≥15		≤12
Cloranfenicol (CHL)	30	≥18		≤15

*en unidades/disco

En cuanto a las cepas de *E. coli*, se determinó el fenotipo BLEE mediante la técnica de doble disco que consistió en el empleo de discos de cefalosporinas de amplio espectro, cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ), más un inhibidor de BLEE que en este caso fue el amoxicilina-ácido clavulánico (AMC). La presencia de fenotipo BLEE se determinó según la sinergia evidenciada por el ensanchamiento del halo de inhibición (García, Pardos de la Gandara, & Catillo, 2010). En la Figura 6 se observa el esquema de doble disco empleado en este trabajo.

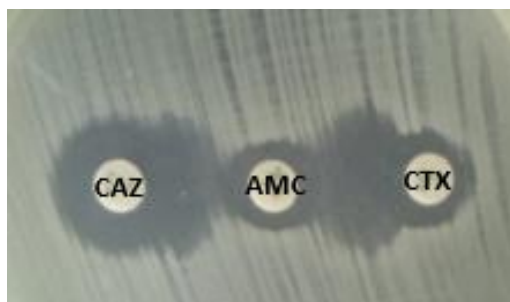


Figura 6. Esquema test de doble disco determinación de fenotipo BLEE.

Adicionalmente, se evaluó la resistencia de las cepas a los antibióticos cefoxitina (FOX), imipenem (IMP), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT),

gentamicina (GEN), tetraciclina (TE), ciprofloxacina (CIP) y cloranfenicol (CHL). En la Tabla 10 se resumen las cargas y los criterios de interpretación según el CLSI.

Tabla 10. Antibióticos evaluados para *E. coli*, concentración de antibióticos e interpretación según CLSI 2018

Antibiótico	Carga ($\mu\text{g}/\text{disco}$)	Halo de inhibición (mm)		
		S	I	R
Cefoxitina (FOX)	30	≥ 18	13-17	≤ 14
Cefotaxima (CTX)	30	≥ 26	23-25	≤ 22
Ceftazidima (CAZ)	30	≥ 21	18-20	≤ 17
Imipenem (IMP)	10	≥ 23	20-22	≤ 19
Trimetopim-sulfametoxazol (SXT)	25	≥ 16	11-15	≤ 10
Gentamicina (GEN)	10	≥ 15	13-14	≤ 12
Tetraciclina (TE)	30	≥ 15	13-14	≤ 11
Ciprofloxacina (CIP)	5	≥ 31	21-30	≤ 20
Cloranfenicol (CHL)	30	≥ 18	13-17	≤ 12

3.5 Determinación del genotipo de resistencia a antibióticos, genes de virulencia y tipificación de los aislados

3.5.1 Extracción de DNA

La obtención del DNA de las cepas de SCP y SCN se llevó a cabo mediante el empleo de lisostafina y proteinasa K. La lisostafina es una endopeptidasa capaz de hidrolizar puentes de pentaglicina presentes en la pared de los estafilococos (de Freire et al., 2010). Por su parte, la proteínasa K digiere las proteínas e inactiva las nucleasas de los ácidos nucleicos (Gozalez et al., 2011).

A partir de un cultivo puro de 24 h, se suspendió una colonia en 45 μL de agua miliQ y 5 μL lisostafina (1 mg/mL), se mezcló por vortex y se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 45 μL de agua miliQ, 150 μL de Tris-HCL (0,1 M pH 8) y 5 μL de proteinasa K, se mezcló e incubó a 60 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. Por último, la mezcla se hirvió durante 5 min a 100 $^{\circ}\text{C}$, se centrifugó a 12.000 rpm por 3 min y el sobrenadante se almacenó a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

La extracción del DNA en las cepas de *E. coli* se hizo mediante la técnica de hervido que se basa en la lisis de la membrana celular debido a la

exposición a altas temperaturas. Primero, se tomó una colonia de un cultivo puro de 24 h y se suspendió en 800 µL de agua miliQ. Se incubó la suspensión a 100 °C durante 8 min, se mezcló con vórtex y se centrifugó a 12.000 rpm durante 2 min. El sobrenadante se conservó a 4 °C para su uso posterior.

3.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica permite la amplificación de un fragmento del DNA mediante el empleo de cebadores. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células (Tamay de Dios et al., 2013). En este trabajo se utilizó la técnica PCR para detectar los genes implicados en el fenotipo de resistencia de las cepas SCP, SCN y *E. coli*, para realizar la tipificación del gen *spa*, la detección de clon CC398, la búsqueda de factores de virulencia y la detección del gen de evasión del sistema del complemento en las cepas de *S. aureus*. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador T3000 thermocycler (Biometra). En la Tabla 11 se describen los reactivos empleados en la PCR.

Tabla 11. Reactivos, concentración y volumen empleados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración	Volumen*	Concentración final
Primer forward (Sigma-Aldrich)	25 µM	1 µL	0,5 µM
Primer reverse(Sigma-Aldrich)	25 µM	1 µL	0,5 µM
Tampón de reacción NH ₄ (Bioline)	10X	5 µL	1X
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	1.5 µL	1.5 mM
dNTPs (Sigma-Aldrich)	2.5 mM	1 µL	0,05 mM
BIOTAQ [™] DNA polimerasa (Bioline)	5 U/ µL	0.15 µL	1.5 U
DNA	_____	5 µL	_____
Agua MiliQ estéril	_____	10,35	_____

*Volumen por 25 µL.

3.7 Electroforesis

Los productos de los genes, obtenidos mediante la técnica de PCR, fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa al 1% con TBE 1X a 75-100V durante 45 min. Para la visualización de los fragmentos de DNA, se adicionó Midori Green, que emite fluorescencia con luz ultravioleta; las bandas

fueron visualizadas en el transiluminador ChemiDoc MP *Imaging System* de BIO-RAD, y fotografiadas utilizando el captador de imágenes.

3.8 Secuenciación

Los productos de PCR fueron enviados a la empresa *Cogenics* (Reino Unido) que utiliza un sistema automático ABI Prism 3730 *Genetic Analyser* (*Applied Biosystems*). Las secuencias obtenidas fueron analizadas por la estudiante de Máster en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de La Rioja.

3.9 Genotipo de resistencia

3.9.1 Genotipo de resistencia en *Staphylococcus spp*

Se realizó la detección del genotipo de resistencia de las cepas de SCP y SCN, evaluando los posibles genes implicados en el fenotipo de resistencia. Las secuencias de los *cebadores*, así como los protocolos de reacción empleados se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Genes de resistencia analizados en las cepas de SCP y SCN y condiciones de la reacción de PCR.

Cebadores	Condiciones			Referencia (Tamaño)
<i>blaZ</i> F: CAGTTCACATGCCAAAGAG R: TACTCTTGGCGGTTTC	94 °C	3 min	1 ciclo	Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 (772 pb)
	94 °C	1 min	30 ciclos	
	50 °C	1 min		
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>mecA</i> F: GGGATCATAGCGTCATTATTC R: AACGATTGTGACACGATAGCC	94 °C	5 min	1 ciclo	CRL-AR, 2009 (527pb)
	94 °C	30 seg	30 ciclos	
	55 °C	30 seg		
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>tetK</i> F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC R: GCAAACCTCATTCCAGAAGCA	94 °C	1 min	1 ciclo	Aarestrup <i>et al.</i> , 2000 (697 pb)
	94 °C	1 min	30 ciclos	
	55 °C	2 min		
	72 °C	2 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	

MATERIALES Y MÉTODOS

<i>tetM</i>	94 °C	1 min	1 ciclo	Aarestrup <i>et al.</i> , 2000 (576 pb)
F: GTTAAATAGTGTCTTGGAG	94 °C	1 min		
R: CTAAGATATGGCTCTAACAA	55 °C	2 min	30 ciclos	
	72 °C	2 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>tetL</i>	94 °C	1 min	1 ciclo	Aarestrup <i>et al.</i> , 2000 (456 pb)
F: CATTGGTCTTATTGGATCG	94 °C	1 min		
R: ATTACACTCCGATTTCCGG	50 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>ermA</i>	93 °C	1 min	1 ciclo	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996 (645 pb)
F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	93 °C	1 min		
R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAG	52 °C	1 min	35 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>ermC</i>	93 °C	1 min	1 ciclo	Sutcliffe <i>et al.</i> , 1996 (642 pb)
F: TCAAAACATAATATAGATAAA	93 °C	1 min		
R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	52 °C	1 min	35 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>msrA</i>	95 °C	3 min	1 ciclo	Wondrack <i>et al.</i> , 1996 (399 pb)
F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC	93 °C	30 seg		
R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT	55 °C	2 min	35 ciclos	
	72 °C	1,5 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>InuA</i>	94 °C	2 min	1 ciclo	Lina <i>et al.</i> , 1999 (322 pb)
F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	94 °C	30 seg		
R:GCTTCTTTTAAAATACATGGTATTTTTCGATC	57 °C	30 seg	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>InuB</i>	94 °C	5 min	1 ciclo	Bozdogan <i>et al.</i> , 1999 (322 pb)
F: GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	94 °C	45 seg		
R:GCTTCTTTTAAAATACATGGTATTTTTCGATC	54 °C	45 seg	35 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	

MATERIALES Y MÉTODOS

vgaA	94 °C	3 min	1 ciclo	Lozano, 2012 (322 pb)
F: AGTGGTGGTGAAGTAACACG	94 °C	1 min		
R: GGTTCAATACTCAATCGACTGAG	56 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
cfr	94 °C	3 min	1 ciclo	Kehrenberg <i>et al.</i> , 2006 (746 pb)
F: TGAAGTATAAAGCAGGTTGGGAGTCA	94 °C	1 min		
R: ACCATATAATTGACCACAAGCAGC	56 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
optrA	94 °C	5 min	1 ciclo	Wang <i>et al.</i> , 2015 (1395 pb)
F: AGGTGGTCAGCGAACTAA	94 °C	1 min		
R: ATCAACTGTTCCCATTCA	48 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	7 min	1 ciclo	
fexA	94 °C	5 min	1 ciclo	Kehrenberg <i>et al.</i> , 2005 (1272 pb)
F: GTACTTGTAGGTGCAATTACGGCTGA	94 °C	1 min		
R: CGATCTGAGTAGGACATAGCGTC	48 °C	2 min	34 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	7 min	1 ciclo	
fexB	94 °C	7 min	1 ciclo	Liu <i>et al.</i> , 2012 (816 pb)
F: TTCCCACTATTGGTGAAAGGAT	94 °C	1 min		
R: GCAATTCCCTTTTATGGACGTT	55 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
catpC221	94 °C	3 min	1 ciclo	Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 (434 pb)
F: ATTTATGCAATTATGGAAGTTG	94 °C	1 min		
R: TGAAGCATGGTAACCATCAC	50 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
catpC194	94 °C	3 min	1 ciclo	Schnellmann <i>et al.</i> , 2006 (570 pb)
F: CGATTTTAGTATAACCACAGA	94 °C	1 min		
R: GCCAGTCATTAGGCCTAT	50 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	

<i>ant(4')-Ia</i>	94 °C	3 min	1 ciclo	Van de Klundert et al., 2006 (165 pb)
F: GCAAGGACCGACAACATTTTC	94 °C	30 seg		
R: TGGCACAGATGGTCATAACC	60 °C	45 seg	32 ciclos	
	72 °C	2 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>acc(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	94 °C	3 min	1 ciclo	Van de Klundert et al., 2006 (220 pb)
F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA	94 °C	30 seg		
R: CACTATCATAACCACTACCG	60 °C	45 seg	32 ciclos	
	72 °C	2 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	

3.9.2 Genotipo de resistencia en *E. coli*

En las cepas de *E. coli* que presentaron fenotipo BLEE positivo, se determinó la presencia de genes codificantes de dichas β -lactamasas de clase *bla*CTX-M, *bla*SHV y *bla*TEM. Asimismo, en las cepas de *E. coli* resistentes a cefotaxima pero con fenotipo BLEE-negativo, se estudió la presencia de la cefamicinasa CMY-2 (β -lactamasa plasmídica de tipo AmpC). Además, se realizó una PCR como *screening* de la presencia del gen *mcr-1* implicado en la resistencia a colistina mediada por plásmido en enterobacterias. Las condiciones de reacción, así como los cebadores empleados se especifican en la Tabla 13.

Tabla 13. Genes BLEE analizados en *E. coli* y condiciones de las reacciones de PCR.

Cebadores	Condiciones			Referencia (Tamaño)
<i>bla</i>CTX-M Universal	94 °C	3 min	1 ciclo	Batchelor et al., 2005 (697 pb)
F: CGATGTGCAGTACCAGTAA	94 °C	30 seg		
R: TTAGTGACCAGAATCAGCGG	52 °C	30 seg	35 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	5 min	1 ciclo	
<i>bla</i>CTX-M-3G (Grupo 1)	94 °C	7 min	1 ciclo	Pagani et al., 2003 (1017 pb)
F: GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	94 °C	50 seg		
R: CCGTTTCCGCTATTACAAAC	50 °C	40 seg	35 ciclos	
	68 °C	1 min		
	68 °C	5 min	1 ciclo	

<i>blaCTX-M-9G (Grupo 9)</i>	94 °C	3 min	1 ciclo	Simarro <i>et al.</i> , 2000 (856 pb)
F: GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	94 °C	45 seg		
R: ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC	62 °C	45 seg	35 ciclos	
	72 °C	45 seg		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>blaCMY-2</i>	95 °C	1 min	1 ciclo	Stapleton <i>et al.</i> , 1999 (1800 pb)
F: GATTCCTTGACTCTTCAG	95 °C	30 seg		
R: TAAAACCAGTTCCCAGATAGC	53 °C	30 seg	30 ciclos	
	72 °C	30 seg		
	72 °C	3 min	1 ciclo	
<i>blaTEM</i>	94 °C	3 min	1 ciclo	Belaouaj <i>et al.</i> , 1994 (1200 pb)
F: ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	94 °C	1 min		
R: ACGCTCAGTGAACGAAAAC	60 °C	1 min	30 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>blaSHV</i>	96 °C	1 min	1 ciclo	Pitout <i>et al.</i> , 1998 (885 pb)
F: TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	96 °C	15 seg		
R: GCAAACCTATTCCAGAAGCA	52 °C	15 seg	24 ciclos	
	72 °C	2 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>CLR-5 (mcr-1)</i>	94 °C	15 min	1 ciclo	Liu <i>et al.</i> , 2016 (309 pb)
F: CGGTCAGTCCGTTTGTTTC	94 °C	30 seg		
R: CTTGGTCCGTCTGTAGGG	58 °C	90 seg	25 ciclos	
	72 °C	60 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	

Los productos de PCR de las cepas positivas para BLEE tipo *blaCTX-M* y *blaSHV* fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas se analizaron por medio de diferentes herramientas informáticas:

Se empleó la herramienta *Nucleic Acid Sequence Massager* (<http://www.attotron.com/cybertory/analysis/seqMassager.html>) para el formateo de las secuencias y *EMBOSS Needle* (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html) para obtener la secuencia de consenso a partir del alineamiento de las secuencias sentido (*forward*) y antisentido (*reverse*). Para determinar las variantes de BLEEs, se realizó una primera comparación de la secuencia consenso con aquellas

depositadas en la base de datos del GenBank empleando la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Una vez detectadas las variantes con mayor grado de homología, la identificación definitiva se llevó a cabo mediante el alineamiento de la secuencia consenso con las secuencias de referencia descritas en la base de datos de la Clínica Lahey, específica de β -lactamasas (*Lahey Studies*, <https://www.lahey.org/studies/>).

3.9.2 Detección de factores de virulencia en *S. aureus*

Se determinó la presencia del gen *luk-PV* que codifica la Leucocidina de Pantón Valentine (PVL), los genes codificantes de las toxinas exfoliativas A y B y el gen codificante de la toxina de shock tóxico (TSST). Los protocolos se resumen en la Tabla 14.

Tabla 14. Cebadores y condiciones de PCR para los genes codificantes de factores de virulencia

Cebadores	Condiciones			Referencia (Tamaño)
<i>luk-PV</i>	94 °C	5 min	1 ciclo	Lina <i>et al.</i> , 1999 (443 pb)
F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAAGTGTATTGGATAGCAAAGC	94 °C 60 °C 72 °C	30 seg 30 seg 1 min	30 ciclos	
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>eta</i>	94 °C	5 min	1 ciclo	Jarraud <i>et al.</i> , 2002 (190 pb)
F: ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT R: TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	94 °C 60 °C 72 °C	30 seg 30 seg 1 min	30 ciclos	
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>etb</i>	94 °C	5 min	1 ciclo	Jarraud <i>et al.</i> , 2002 (612 pb)
F: CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC R: AGTGAACCTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	94 °C 60 °C 72 °C	30 seg 30 seg 1 min	30 ciclos	
	72 °C	10 min	1 ciclo	
<i>tst</i>	94 °C	5 min	1 ciclo	Jarraud <i>et al.</i> , 2002 (180pb)
F: TTCACTATTTGTAAAAGTGTGACACCCACT R: TACTAATGAATTTTTTATCGTAAGCCCTT	94 °C 60 °C 72 °C	30 seg 30 seg 1 min	30 ciclos	
	72 °C	10 min	1 ciclo	

3.10 Análisis gen *scn* del IEC en *S. aureus*

Como marcador del IEC se analizó la presencia del gen *scn*. Las condiciones de la PCR se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de reacción PCR para la detección del gen *scn*

Cebadores	Condiciones			Referencia (Tamaño)
<i>scn</i>	94 °C	3 min	1 ciclo	Van Wamel <i>et al.</i> , 2006
F: AGCACAAGCTTGCCAACATCG	94 °C	30 seg		(257 pb)
R: TTAATATTTACTTTTTAGTGC	53 °C	30 seg	30 ciclos	
	72 °C	2 min		
	72 °C	6 min	1 ciclo	

3.10 Tipificación del gen *spa* y determinación del complejo CC398

El gen *spa* codifica en las cepas de *S. aureus* una proteína de superficie conocida como proteína A. Dicha proteína se encuentra presente tanto en las cepas sensibles a la meticilina como en las resistentes. La región X de la proteína A es un marcador de locus único que se utiliza en la tipificación *spa* (Ogihara *et al.*, 2018). La tipificación de este gen se llevó a cabo mediante la amplificación y posterior secuenciación del gen *spa*. La secuencia fue analizada por medio del software *Ridom Staph Type*. Además, se realizó una PCR para determinar si las cepas correspondían al complejo clonal CC398; los cebadores y las condiciones se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Condiciones de PCR para la tipificación del gen *spa* en *S. aureus*

Cebadores	Condiciones			Referencia (Tamaño)
<i>Spa</i>	95 °C	10 min	1 ciclo	Harmsen <i>et al.</i> , 2003
F: AGACGATCCTTCGGTGAGC	95 °C	45 seg		(Variable pb)
R: GCTTTTGCAATGTCATTTACTG	60 °C	45 seg	30 ciclos	
	72 °C	1,5 seg		
	72 °C	10 min	1 ciclo	
CC398	95 °C	12 min	1 ciclo	Stegger <i>et al.</i> , 2003
F: AGGGTTTGAAGGCGAATGGG	95 °C	30 seg		(296pb)
R: CAGTATAAAGAGGCGAATGGG	61 °C	30 seg	35 ciclos	
	72 °C	1 min		
	72 °C	10 min	1 ciclo	

4. RESULTADOS

4.1 Cepas de SCP y SCN aisladas de muestras cárnicas

Se estudió un total de 33 muestras de derivados cárnicos. En el 94% de las muestras analizadas se aisló al menos una cepa de *Staphylococcus spp.*, obteniéndose un total 31 muestras contaminadas con *S. aureus*. De estas, en 16 se identificó *S. aureus* (48,5%) y se aisló al menos una cepa de SCN junto con una cepa de *S. aureus* en 7 de ellas (21,2%) (Tabla 17).

Tabla 17. Aislamiento de *S. aureus* en las 33 muestras analizadas.

Tipo de muestra (Nº)	Nº muestras con <i>Staphylococcus</i>	Nº muestras con <i>S. aureus</i>	Nº <i>S. aureus</i> aislados	Nº SCN aislados
Carne picada de cerdo (12)	12	4	4	11
Oreja de cerdo (9)	9	7	9	6
Careta de cerdo (4)	4	4	6	2
Carne picada de pollo (7)	5	1	1	5
Carne picada de pavo (1)	1	0	0	2
Total muestras (33)	31	16	20	26

Se obtuvo un total de 46 cepas del género *Staphylococcus spp.*, 20 de estas correspondían a SCP (43,5%), todos de la especie *S. aureus*, y 26 a SCN (56,5%), entre los que se encontraban las especies *S. warneri*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. xylosum*, *S. pasteurii* y *S. chromogenes*. En la Tabla 18 se presenta la distribución de cepas de *Staphylococcus spp.* en las muestras estudiadas.

Tabla 18. Distribución de las cepas aisladas según la especie aislada.

Especies	N cepas aisladas	% cepas aisladas
<i>S. aureus</i>	20	43,5
<i>S. warneri</i>	9	19,6
<i>S. epidermidis</i>	3	6,5
<i>S. saprophyticus</i>	3	6,5
<i>S. lentus</i>	2	4,3
<i>S. sciuri</i>	2	4,3
<i>S. xylosum</i>	2	4,3
<i>S. pasteurii</i>	2	4,3
<i>S. chromogenes</i>	1	2,2
<i>S. fleurettii</i>	1	2,2
<i>S. hominis</i>	1	2,2
Total	46	100

4.1.1 *S. aureus*

Las cepas de *S. aureus* fueron las que se encontraron con mayor frecuencia (48,5%), a estas se les realizó análisis fenotípico, genotípico, estudio de factores de virulencia, determinación de la presencia del IEC y tipificación del gen *spa*. Solo una de las cepas de *S. aureus* (5%) fue sensible a todos los antibióticos evaluados, mientras que las otras 19 presentaron resistencia a uno o más antibióticos (95%).

El 65% de los aislados de *S. aureus* fueron SARM y el 35% SASM. Las mayores frecuencias de resistencia fueron detectadas para penicilina y tetraciclina (85% y 75%, respectivamente). También, se observó resistencia a clindamicina (45%), eritromicina (40%), cloranfenicol (25%), tobramicina (10%), gentamicina (5%), y en una de las cepas se observó resistencia inducible a clindamicina. En la Tabla 18 se presentan los resultados del antibiograma para las cepas *S aureus* (SCP).

Tabla 19. Resultados del antibiograma de *S. aureus* aislados de muestras cárnicas

Cepa	Especie	Halo de inhibición en mm y categoría según CLSI 2017/2018							
		P	FOX	TE	ERI	CLI	GEN	TOB	CHL
X74	<i>S. aureus</i>	30 S	21 R	8 R	22 I	22 I	17 S	18 S	23 S
X42	<i>S. aureus</i>	14 R	19 R	8 R	<6 R	<6 R	16 S	18 S	11 R
X62	<i>S. aureus</i>	36 S	20 R	8 R	32 S	20 I	24 S	24 S	26 S
X45	<i>S. aureus</i>	10 R	<6 R	22 S	25 S	26 S	16 S	18 S	26 S
X47	<i>S. aureus</i>	14 R	18 R	<6 R	<6 R	<6 R	17 S	9 R	8 R
X65	<i>S. aureus</i>	15 R	18 R	8 R	28 S	8 R	16 S	17 S	26 S
X48	<i>S. aureus</i>	13 R	18 R	8 R	<6 R	<6 R	16 S	18 S	24 S
X67	<i>S. aureus</i>	18 R	18 R	8 R	32 S	10 R	8 R	8 R	28 S
X91	<i>S. aureus</i>	15 R	19 R	7 R	32 S	14 R	24 S	24 S	30 S
X80	<i>S. aureus</i>	12 R	11 R	28 S	28 S	30 S	22 S	22 S	26 S
X81	<i>S. aureus</i>	15 R	22 S	7 R	28 S	30 S	24 S	24 S	26 S
X92	<i>S. aureus</i>	19 R	18 R	7 R	28 S	12 R	24 S	24 S	28 S
x93	<i>S. aureus</i>	19 R	26 S	8 R	<6 R	<6 R	26 S	28 S	12 R
x349	<i>S. aureus</i>	42 S	30 S	28 S	28 S	30 S	22 S	22 S	24 S
x357	<i>S. aureus</i>	13 R	22 S	7 R	<6 R	<6 R	28 S	28 S	26 S
x351	<i>S. aureus</i>	13 R	17 R	<6	<6 R	<6 R	24 S	26 S	24 S

x358	<i>S. aureus</i>	13 R	24 S	8 R	30 S	28 S	22 S	24 S	24 S
x352	<i>S. aureus</i>	11 R	18 R	7 R	32 S	30 S	22 S	24 S	10 R
x356	<i>S. aureus</i>	13 R	22 S	7 R	8 R	30 S	22 S	24 S	10 R
x354	<i>S. aureus</i>	18 R	30 S	26 S	<6 R	30 S	20 S	24 S	22 S

P: penicilina; FOX: cefoxitina; TE: tetraciclina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; CHL: cloranfenicol; S: sensible; I: resistencia intermedia; R: resistente.

De las muestras positivas para *S. aureus*, el 94 % correspondían a carne de cerdo siendo la careta de cerdo la muestra en la que hubo una mayor prevalencia (100%), mientras la cepa de *S. aureus* aislada de carne de pollo fue la única que no presentó resistencia a los antibióticos evaluados. En la Figura 7 se observa la prevalencia de *S. aureus* y SARM en las muestras analizadas. Cabe destacar que en las muestras de cerdo se detectó un nivel de contaminación por SARM que osciló entre el 33% (carne picada de cerdo) y el 78-100% (careta y oreja de cerdo). El nivel de contaminación en carne de pollo fue mucho menor, detectándose solo SASM, pero no SARM.

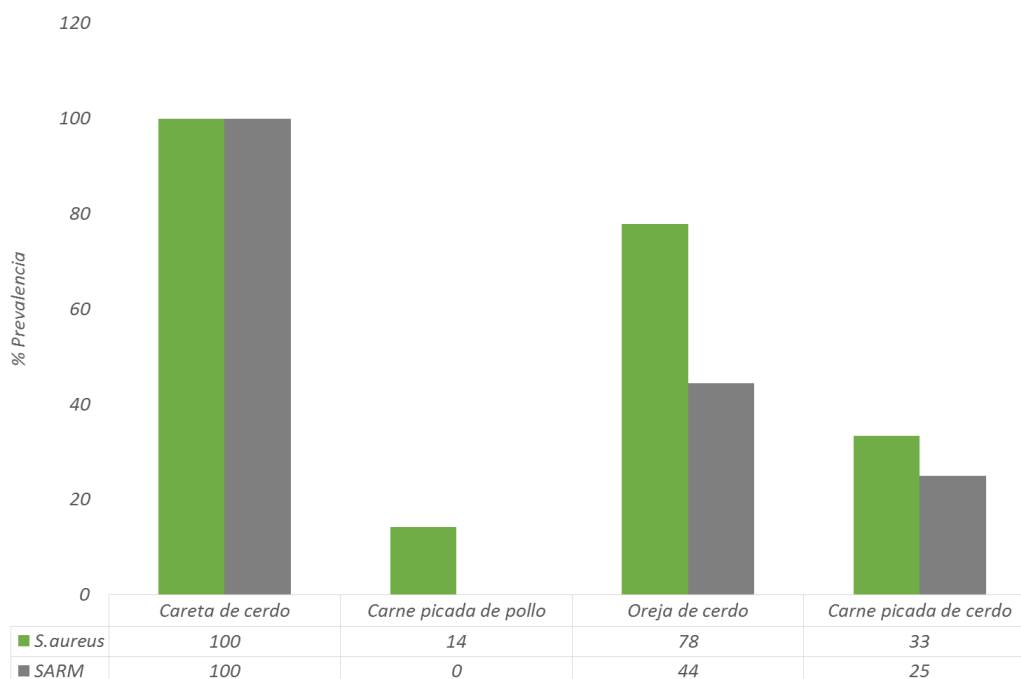


Figura 7. Prevalencia de *S. aureus* y SARM según el tipo de muestra analizada.

En casi todas las cepas fue posible detectar el gen implicado en el fenotipo de resistencia. No se detectaron los genes responsables de la resistencia a clindamicina en la cepa x65 y a cloranfenicol en la cepa x352, a pesar de que se testó por PCR la presencia de los genes de resistencia, a

dichos antibióticos, más frecuentes en *Staphylococcus* (*InuA*, *InuB* y *vga*, y *fexA*, *fexB*, *catpC194* *catpC221* y *catpC223*, respectivamente).

En todas las cepas SARM se detectó el gen *mecA* como responsable de la resistencia a meticilina, mientras que para las cepas resistentes a penicilina se detectó el gen *blaZ*, codificante de una β -lactamasa. En las cepas resistentes a tetraciclina, se observó la presencia de como mínimo el gen *tetM*, la combinación *tetM/K* y con menor frecuencia (15%) los genes *tetM/K/L*. Los resultados se resumen en la Tabla 20.

Tabla 20. Resumen resultados obtenidos fenotipo de resistencia cepas de *S. aureus*

Cepa	Especie	Origen	Fenotipo de Resistencia	Genes detectados
X74	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	FOX, TE y ERI	<i>mecA</i> , <i>tetM/K</i> , <i>ermC</i> y <i>msrA</i>
X42	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, FOX, TE, ERI, CLI y CHL	<i>mecA</i> , <i>tetM/K</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>fexA</i>
X62	<i>S. aureus</i>	Cerdo (picada)	FOX, TE	<i>mecA</i> y <i>tetM/K</i>
X45	<i>S. aureus</i>	Cerdo (picada)	P, FOX	<i>mecA</i>
X47	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, FOX, TE, ERI, CLI, TOB, CHL	<i>mecA</i> , <i>tetM/K/L</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> , <i>ant4</i> y <i>fexA</i>
X65	<i>S. aureus</i>	Cerdo (careta)	P, FOX, TE, CLI*	<i>mecA</i> y <i>tetM/K/L</i>
X48	<i>S. aureus</i>	Cerdo (careta)	P, FOX, TE, ERI y CLI	<i>mecA</i> , <i>tetM/K/L</i> , <i>ermC</i> , <i>msrA</i> y <i>vga</i>
X67	<i>S. aureus</i>	Cerdo (careta)	P, FOX, TE, GEN, TOB, CLI	<i>mecA</i> , <i>tetM/K</i> , <i>aph(2'')aac(6')</i> y <i>vga</i>
X91	<i>S. aureus</i>	Cerdo (careta)	P, FOX, TE, CLI	<i>mecA</i> , <i>tetM/K</i> y <i>vga</i>
X80	<i>S. aureus</i>	Cerdo (picada)	P, FOX	<i>mecA</i>
X81	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, TE	<i>blaZ</i> y <i>tetM/K</i>
X92	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, FOX, TE, CLI	<i>mecA</i> , <i>tetM/K</i> , <i>InuA</i> y <i>vga</i>
x93	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, TE, ERI, CLI, CHL	<i>blaZ</i> , <i>tetM/K</i> , <i>vga</i> y <i>fexA</i>
x349	<i>S. aureus</i>	Pollo (picada)	Sensible	No se analizó ningún gen
x357	<i>S. aureus</i>	Cerdo (careta)	P, TE, ERI, CLI	<i>blaZ</i> , <i>tetM/K</i> , <i>ermC</i> y <i>msrA</i>
x351	<i>S. aureus</i>	Cerdo (careta)	P, FOX, TE, ERI, CLI	<i>mecA</i> , <i>tetM/K/L</i> , <i>ermC</i> y <i>msrA</i>
x358	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, TE	<i>blaZ</i> y <i>tetM/K/L</i>
x352	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, FOX, TE, CHL*	<i>mecA</i> , <i>tetM/K</i>
x356	<i>S. aureus</i>	Cerdo (oreja)	P, TE, ERI, CHL	<i>blaZ</i> , <i>tetM/K</i> , <i>msrA</i> , <i>fexA</i>
x354	<i>S. aureus</i>	Cerdo (picada)	P, ERI, Test D (+)CLI	<i>blaZ</i> , <i>ermC</i> y <i>msrA</i>

*No se detectó gen responsable de la resistencia; P: penicilina; FOX: cefoxitina; TE: tetraciclina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; CHL: cloranfenicol. La muestra sombreada fue la única en la que no se observó resistencia a los antibióticos evaluados.

Las cepas fueron tipificadas según el gen *spa*, encontrando diferente *spa*-tipo, donde el t011 fue el más frecuente. Diecisiete de las cepas (85%)

fueron positivas para la PCR-específica del clon CC398. Mientras que tres de las cepas fueron negativas para esta línea genética; la cepa x349, con *spa* t8598 fue aislada de una muestra de carne picada de pollo. Esta fue completamente sensible a los antibióticos evaluados y adicionalmente, fue positiva para el gen *eta*, codificante de la toxina exfoliativa A. Así mismo, las otras dos cepas negativas x45 y x80, tuvieron el *spa* t8151 y fueron positivas para la Leucocidina de Pantón Valentine codificada por el gen *pvl*; en la cepa x74 se detectó en gen *tst* y en ninguna de las cepas se detectó el gen *etb* codificante de la toxina exfoliativa B. También se analizó el gen *scn* del *cluster* de evasión del sistema inmune humano, y en ninguna de las cepas fue detectado este gen (Ver Tabla 21).

Tabla 21. Resumen resultados obtenidos fenotipo de resistencia cepas de *S. aureus*

Cepa	<i>S. aureus</i>	Origen	Spa	CC	Genes de virulencia
X74	SARM	Cerdo (oreja)	t1451	398	<i>tsst</i>
X42	SARM	Cerdo (oreja)	t1606	398	
X62	SARM	Cerdo (picada)	t1451	398	
X45	SARM	Cerdo (picada)	t8151	-	<i>pvl</i>
X47	SARM	Cerdo (oreja)	t1606	398	
X65	SARM	Cerdo (careta)	t011	398	
X48	SARM	Cerdo (careta)	t4030	398	
X67	SARM	Cerdo (careta)	t011	398	
X91	SARM	Cerdo (careta)	t011	398	
X80	SARM	Cerdo (picada)	t8151	-	<i>pvl</i>
X81	SASM	Cerdo (oreja)	t011	398	
X92	SARM	Cerdo (oreja)	t011	398	
x93	SASM	Cerdo (oreja)	t011	398	
x349	SASM	Pollo (picada)	t8598	-	<i>eta</i>
x357	SASM	Cerdo (careta)	t011	398	
x351	SARM	Cerdo (careta)	t011	398	
x358	SASM	Cerdo (oreja)	t011	398	
x352	SARM	Cerdo (oreja)	t011	398	
x356	SASM	Cerdo (oreja)	t108	398	
x354	SASM	Cerdo (picada)	t5452	398	

Las cepas sombreadas fueron negativas para la PCR-específica del clon CC398.

4.1.2 SCN

De las 26 cepas aisladas y analizadas, un 35% presentó resistencia a penicilina, 23% a tetraciclina, 4% a clindamicina y 12% a eritromicina. Ninguna presentó resistencia a cefoxitina, gentamicina, tobramicina o cloranfenicol. En

la especie *S. warneri*, que representa el 35% de los SCN aislados, se observó una prevalencia de cepas resistentes a penicilina del 44%. Los resultados para cada especie se resumen en la Tabla 22.

Tabla 22. Resumen fenotipo de resistencia cepas SCN

Especie	Nº cepas	P ^R (%)	TE ^R (%)	CLI ^R (%)	ERI ^R (%)
<i>S. warneri</i>	9	4 (44 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. epidermidis</i>	3	2 (67 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (67 %)
<i>S. saprophyticus</i>	3	0 (0 %)	2 (67 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. lentus</i>	2	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. sciuri</i>	2	0 (0 %)	1 (50 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. xylosus</i>	2	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. pasteurii</i>	2	1 (50 %)	1 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. chromogenes</i>	1	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)	1 (100 %)
<i>S. fleurettii</i>	1	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>S. hominis</i>	1	1 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Total SCN	26	9 (35 %)	6 (23 %)	1 (4 %)	3 (12 %)

R: Resistentes

A cada una de las cepas resistentes se les realizó la determinación genotípica. Como gen responsable de la resistencia a penicilina, eritromicina y tetraciclina se detectaron los genes *blaZ*, *ermC* y *tetK/L* respectivamente. La Tabla 23 resume los análisis fenotípicos y genotípicos realizados a las cepas SCN.

Tabla 23. Resultados del fenotipo y genotipo de resistencia en cepas SCN

Cepa	Especie	Origen	Fenotipo de Resistencia	Genes detectados
X43	<i>S. fleurettii</i>	Cerdo (picada)		
X44	<i>S. warneri</i>	Cerdo (oreja)	P	<i>blaZ</i>
X63	<i>S. lentus</i>	Cerdo (picada)		
X64	<i>S. sciuri</i>	Cerdo (oreja)	TE	
X46	<i>S. xylosus</i>	Cerdo (oreja)		
X66	<i>S. epidermidis</i>	Cerdo (careta)	P	<i>blaZ</i>
X68	<i>S. saprophyticus</i>	Pavo (picada)		
X69	<i>S. warneri</i>	Pavo (picada)		
X70	<i>S. epidermidis</i>	Cerdo (picada)	P, ERI	<i>blaZ</i> , <i>ermC</i>
X71	<i>S. pasteurii</i>	Pollo (picada)	P, TE	<i>blaZ</i> , <i>tetK</i>
X78	<i>S. xylosus</i>	Cerdo (oreja)		
X79	<i>S. sciuri</i>	Cerdo (careta)		
X82	<i>S. saprophyticus</i>	Cerdo (picada)	TE	<i>tetK</i>
X83	<i>S. chromogenes</i>	Cerdo (oreja)	P, TE, ERI y CLI	<i>blaZ</i> , <i>tet/L</i> y <i>ermC</i>
X84	<i>S. warneri</i>	Pollo (picada)	P	<i>blaZ</i>
X85	<i>S. warneri</i>	Cerdo (picada)	P	<i>blaZ</i>
X86	<i>S. epidermidis</i>	Cerdo (oreja)	ERI	<i>ermC</i>

X87	<i>S. hominis</i>	Pollo (picada)	P	<i>blaZ</i>
X88	<i>S. warneri</i>	Pollo (picada)		
X89	<i>S. warneri</i>	Cerdo (picada)		
X90	<i>S. saprophyticus</i>	Cerdo (picada)	TE	<i>tetK</i>
x347	<i>S. warneri</i>	Pollo (picada)		
x348	<i>S. warneri</i>	Cerdo (picada)		
x350	<i>S. pasteurii</i>	Cerdo (picada)	TE	<i>tetK</i>
x355	<i>S. lentus</i>	Cerdo (picada)		
x353	<i>S. warneri</i>	Cerdo (picada)	P	<i>blaZ</i>

P: penicilina; FOX: cefoxitina; TE: tetraciclina; ERI: eritromicina; CLI: clindamicina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; CHL: cloranfenicol.

4.1.3 *E. coli*

En la Universidad de La Rioja, en este TFM, se identificaron mediante MALDI-TOF las 34 cepas aisladas en Colombia de 50 muestras de carne, y todas ellas fueron confirmadas como especie *E. coli*. Las cepas de *E. coli* fueron caracterizadas para determinar la producción de enzimas tipo BLEE, detectando el fenotipo BLEE en 27 de dichas cepas, lo que indica que el 54% de las muestras de alimentos de Colombia analizadas estaban contaminadas con *E. coli* BLEE-positivas (Tabla 24). Además, se evaluó la resistencia a carbapenémicos, sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas, aminoglucósidos y fenicoles. En la Tabla 24 se resumen los resultados obtenidos para cada cepa. Cabe destacar que la mayor parte de las cepas fueron resistentes a cefotaxima todas ellas fueron sensibles al imipenem (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados de los estudios de sensibilidad en *E. coli*

Cepa	BLEE	Halo de inhibición mm								
		CAZ	CTX	FOX	IMI	SXT	CIP	TE	GEN	CHL
x375	BLEE+	26 S	20 R	24S	30 S	<6 R	12 R	7 R	20	<6 R
x376	BLEE-	20 I	18 R	7 R	27 S	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R
x377	BLEE+	26 S	14 I	22 S	29 S	24 S	<6 R	20 S	8 R	<6 R
x378	BLEE+	22 S	18 R	20 S	30 S	24 S	24 I	18 S	<6 R	23 S
x379	BLEE+	24 S	14 R	23 S	29 S	<6 R	32 S	<6 R	14 I	14 I
x380	BLEE-	18 I	20 R	9 R	27 S	20 S	8 R	<6 R	20 S	28 S
x381	BLEE+	22 S	14 R	18 S	29 S	<6 R	18 R	<6 R	8 R	<6 R
x382	BLEE+	24 S	18 R	20 S	29 S	<6 R	20 R	7 R	17 S	<6
x383	BLEE+	26 S	14 R	22 S	32 S	25 S	<6 R	18 S	8 R	25 S
x384	BLEE+	22 S	14 R	22 S	29 S	<6 R	<6 R	<6 R	8 R	<6 R
x385	BLEE-	18 I	24 I	12R	26 S	9 R	26 S	7 R	18 S	30 S
x386	BLEE-	22 S	22 R	7 R	22 S	<6 R	<6 R	<6 R	17 S	<6 R
x387	BLEE+	24 S	14 R	24 S	26 S	26 S	27 I	20 S	17 S	26 S
x388	BLEE+	22 S	14 R	24 S	26 S	27 S	30 I	22 S	16 S	26 S

x389	BLEE+	24 S	16 R	23 S	29 S	27 S	30 I	21 S	18 S	27 S
x390	BLEE+	22 S	28 S	21 S	28 S	10 R	26 I	<6 R	17 S	13 I
x391	BLEE+	26 S	18 R	20 S	29 S	21 S	22 I	18 S	18 S	29 S
x392	BLEE+	32 S	18 R	19 S	30 S	20 S	30 I	8 R	8 R	<6 R
x393	BLEE+	24 S	20 R	22 S	30 S	12 I	30 I	22 S	22 S	30 S
x394	BLEE+	20 I	12 R	22 S	28 S	<6 R	26 I	<6 R	22 S	7 R
x395	BLEE+	28 S	16 R	24 S	30 S	24 S	<6 R	<6 R	8 R	<6 R
x396	BLEE+	22 S	14 R	24 S	31 S	12 I	24 I	<6 R	20 S	<6 R
x397	BLEE-	22 S	20 R	13 S	28 S	<6 R	26 I	<6 R	22 S	24 S
x398	BLEE-	20 I	18 R	7 R	29 S	28 S	30 I	<6 R	22 S	30 S
x399	BLEE+	24 S	18 R	24 S	28 S	20 S	26 I	<6 R	20 S	28 S
x400	BLEE+	22 S	18 R	28 S	28 S	18 S	18 R	<6 R	22 S	24 S
x401	BLEE-	18 I	18 R	8 R	29 S	26 S	16 R	<6 R	16 S	<6 R
x402	BLEE+	22 S	14 R	24 S	35 S	<6 R	26 I	8 R	16 S	<6 R
x403	BLEE+	20 I	24 I	28 S	29 S	28 S	28 I	<6 R	20 S	28 S
x404	BLEE+	32 S	24 I	30 S	30 S	24 S	22 I	7 R	24 S	20 S
x405	BLEE+	24 S	20 R	26 S	28 S	22 S	<7 R	8 R	20 S	18 S
x406	BLEE+	24 S	26 S	26 S	29 S	<6 R	26 I	7 R	<6 R	24 S
x407	BLEE+	20 S	24 I	24 S	30 S	18 S	23 I	22 S	20 S	9 R
X408	BLEE+	28 S	16 R	24 S	27 S	26 S	<6 R	18 S	22 S	26 S

CAZ: ceftazidima; CTX: cefotaxima; FOX: cefoxitina; IMI: imipenem; SXT: trimetropim-sulfametoxazol; CIP: ciprofloxacina TE: tetraciclina; GEN: gentamicina; CHL: cloranfenicol; S: sensible; I: resistencia intermedia; R: resistente.

En el análisis realizado a las 27 cepas con fenotipo BLEE-positivo se detectó los siguientes tipos de β -lactamasas:

- 1) β -lactamasa del grupo CTX-M en 22 cepas (81%); tras secuenciación de los amplicones de PCR se detectaron las variantes genéticas: CTX-M-55 (73%), CTX-M-65/90 (18%), CTX-32 (4,5 %) y CTX-M-8 (4,5%).
- 2) β -lactamasa de tipo SHV en 5 cepas (23%), que tras secuenciación se determinó que correspondía a la variante SHV-12
- 3) β -lactamasa de tipo TEM en tres cepas (14%), que se encontraban asociadas a las β -lactamasas del grupo CTX-M de las variantes CTX-M-55, CTX-M-65/90 y CTX-M-32.

En las 7 cepas cefotaxima-resistente pero fenotipo BLEE-negativo, se detectó el gen *bla*CMY-2 codificante de una β -lactamasa de tipo AmpC, generalmente mediada por plásmidos. Adicionalmente, se detectó la β -lactamasa tipo TEM asociada a CMY-2 en cuatro de estas cepas (57%). Los

fenotipos y genes de β -lactamasa detectados para las cepas BLEE-positivas y BLEE-negativas se resumen en la tabla 25.

Tabla 25. Resumen caracterización fenotipo de resistencia y genes tipo BLEE cepas de *E. coli*

Cepa	Fenotipo BLEE	Fenotipo R	Fenotipo I	Genes de resistencia
x375	BLEE+	CTX, SXT, CIP, TE, GEN, CHL		<i>blaCTX-M-55</i>
x378	BLEE+	CXT, TE, GEN	CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x379	BLEE+	CXT, SXT, TE	CIP, GEN, CHL	<i>blaCTX-M-55</i>
x381	BLEE+	CXT, SXT, CIP, TE, GEN, CHL		<i>blaCTX-M-55</i>
x382	BLEE+	CXT, SXT, CIP, TE, GEN, CHL		<i>blaCTX-M-55</i>
x387	BLEE+	CXT	CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x388	BLEE+	CXT	CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x389	BLEE+	CXT	CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x384	BLEE+	CXT, SXT, TE, CIP, TE, CHL		<i>blaCTX-M-55, blaTEM</i>
x391	BLEE+	CXT	CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x393	BLEE+	CXT		<i>blaCTX-M-55</i>
x394	BLEE+	CXT, SXT, TE, CHL	CAZ, CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x396	BLEE+	CXT, TE, CHL	SXT, CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x399	BLEE+	CXT, CIP	CIP	<i>blaCTX-M-55</i>
x405	BLEE+	TE		<i>blaCTX-M-55</i>
x408	BLEE+	CXT, CIP		<i>blaCTX-M-55</i>
x377	BLEE+	CIP, GEN, CHL	CXT	<i>blaCTX-M-65/90</i>
x383	BLEE+	CXT, CIP, GEN		<i>blaCTX-M-65/90</i>
x392	BLEE+	CXT, TE, GEN, CHL	CIP	<i>blaCTX-M-65/90</i>
x395	BLEE+	CXT, CIP, TE, GEN, CHL		<i>blaCTX-M-65/90, blaTEM</i>
x402	BLEE+	CXT, SXT, TE, CHL	CIP	<i>blaCTX-M-32, blaTEM</i>
x404	BLEE+	TE	CTX, CIP	<i>blaCTX-M-8*</i>
x390	BLEE+	SXT, TE	CIP, CHL	<i>blaSHV12</i>
x400	BLEE+	CAZ, CIP, TE		<i>blaSHV12</i>
x403	BLEE+	TE	CAZ, CTX, CIP	<i>blaSHV12</i>
x406	BLEE+	SXT, TE, GEN	CIP	<i>blaSHV12</i>
x407	BLEE+	CHL	CTX, CIP	<i>blaSHV12</i>
x376	BLEE-	CTX, FOX, SXT, CIP, TE, GEN, CHL	CAZ	<i>blaCMY-2, blaTEM</i>
x380	BLEE-	CXT, FOX, CIP, TE	CAZ	<i>blaCMY-2, blaTEM</i>
x385	BLEE-	FOX, SXT, TE	CAZ, CTX, CIP	<i>blaCMY-2</i>
x386	BLEE-	CXT, FOX, SXT, CIP, TE, CHL		<i>blaCMY-2, blaTEM</i>
x397	BLEE-	CXT, SXT, TE	CIP	<i>blaCMY-2, blaTEM</i>
x398	BLEE-	CXT, FOX, TE	CAZ, CIP	<i>blaCMY-2</i>
x401	BLEE-	CXT, FOX, CIP, TE, CHL	CAZ	<i>blaCMY-2</i>

*Fragmento corto

Por último, en este estudio se analizó la presencia del gen emergente de resistencia a colistina, *mcr-1*, no detectándose dicho gen en ninguna de las cepas de *E. coli* analizadas.

5. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, la preocupación por la aparición de cepas de *S. aureus* (con el fenotipo SARM) y de *E. coli* productora de β -lactamasas de tipo BLEE, resistentes a múltiples antibióticos, ha hecho que sean considerados por la OMS como microorganismos prioritarios Para su detección, seguimiento y control. Es preocupante que estas bacterias se encuentren presentes en diferentes ambientes, lo cual favorece su propagación, así como la de sus genes de resistencia y virulencia. En este TFM, se llevó a cabo una caracterización del fenotipo y genotipo de resistencia en cepas de SCP, SCN y *E. coli* aisladas en alimentos cárnicos de España y Colombia. Este trabajo se centró en determinar la evolución de la prevalencia de cepas de SARM ST398, la frecuencia y diversidad de especies de estafilococos presentes en los alimentos cárnicos y la detección de genes codificantes de β -lactamasas principalmente tipo BLEE en *E. coli*.

Desde la emergencia del linaje SARM CC398 en 2005, especialmente ligado al ganado porcino, su prevalencia ha ido en aumento. En este sentido, estudios realizados en el 2009 en nuestro grupo de investigación, permitió encontrar una baja frecuencia de detección de SARM ST398 en alimentos cárnicos de La Rioja, incluyendo en este caso alimentos de diversos orígenes, como es el pollo, cerdo, pavo y ternera (1,6%) (Lozano et al., 2009); un estudio posterior realizado en 2012, también realizado en nuestro grupo, encontró una prevalencia de *S. aureus* y SARM en carne de cerdo del 11,7% y 2,9% respectivamente y pudo demostrar la importancia del sistema IEC para poder determinar el posible origen humano o animal de las cepas aisladas (Benito et al., 2014). En el trabajo llevado a cabo en este TFM hemos pretendido determinar la evolución de SARM-ST398 en el tiempo, a través de este estudio llevado a cabo en 2018, especialmente en alimentos derivados del cerdo, y asimismo determinar la frecuencia de especies de SCN y sus fenotipos y genotipos de resistencia a antibióticos.

En este trabajo se ha observado una prevalencia de *S. aureus* y SARM del 50% y 36% respectivamente, lo cual representa un aumento importante de SARM en alimentos cárnicos en nuestra región (si se compara con los datos de

2009 y 2012). En este incremento detectado podría influir, al menos en parte, que entre las muestras analizadas se estudiaron muestras de oreja y careta de cerdo compradas de carnicerías, que potencialmente pueden estar más contaminadas con SARM, y que no estaban incluidas en los estudios anteriores; este tipo de alimentos se consumen con cierta frecuencia y forman parte de la gastronomía española.

Cabe destacar que el 84,6% de las cepas SARM y el 71% de las SASM pertenecían al CC398 con diferente *spa*-tipo, siendo el t011 el más frecuente. Mientras que el 15% de las SARM y el 14% de la SASM pertenecían a complejos clonales diferentes a ST398 con *spa* t8151 y t8598 respectivamente. Estos resultados son relevantes ya que indican una asociación del tipo de muestra estudiada con el aumento de la prevalencia de *S. aureus* y SARM ST398, concordando con lo reportado en la literatura ya que los cerdos son huéspedes naturales y el mayor reservorio del linaje CC398, encontrándose colonizados en un 90% por *S. aureus* (Linhares et al., 2015; Oppliger et al., 2012).

En este estudio, se detectó el gen *mecA* en todas las cepas resistentes a la meticilina. También, se evaluó la resistencia a los antibióticos no β -lactámicos incluyendo tetraciclinas, macrolidos, lincosamidas y aminoglucósidos. Se evidenció que tanto las cepas SARM como las SASM presentaron un fenotipo de multiresistencia típicamente observado en cepas ST398. De las 13 cepas SARM, 86% fueron resistentes a tetraciclina, 61,5% a clindamicina, 30% a eritromicina, 15,4 % a tobramicina, 15% a cloranfenicol, y 7,9 % a gentamicina. En cuanto a las 7 cepas SASM, 71% fueron resistentes a tetraciclina, 62% a clindamicina, 43% a eritromicina, 29 % a cloranfenicol y todas fueron susceptibles a aminoglucósidos.

Este fenotipo de multiresistencia presentado por las cepas de SARM y SASM coincide con el uso de antibióticos en animales para el tratamiento de infecciones o para su consumo como profilácticos, donde la tetraciclina es uno de los antibióticos más empleados en animales destinados al consumo (Landers et al., 2014). Para cada fenotipo se determinó el gen responsable del mecanismo de resistencia y solo en dos cepas, una resistente a clindamicina y

otra a cloranfenicol, no se detectaron los genes analizados, por lo que se debe seguir estudiando otros posibles mecanismos asociados a estos fenotipos. La resistencia a la tetraciclina fue la que se encontró con más frecuencia en las cepas SARM y SASM, y estuvo determinada como mínimo por el gen *tetM*, la combinación *tetM/K* y con menor frecuencia por los genes *tetM/K/L*.

Así mismo, los resultados relacionados con la presencia de genes de patogenicidad concuerdan con la literatura donde varios estudios han señalado una asociación entre la disminución de factores de virulencia en SARM CC398 asociado con la multiresistencia (Argudín et al., 2011). En este estudio se realizó la caracterización de producción de factores de virulencia; solo dos cepas SASM t8151, no asociadas a la línea genética ST398, fueron positivas para producción de PVL. Así mismo, en otra cepa SASM t8598 no relacionada con ST398 y aislada de carne de pollo se detectó el gen asociado al síndrome de shock tóxico. Ninguna de las cepas presentó la toxina exfoliativa tipo B y en solo una perteneciente al complejo clonal ST398 con *spa*-tipo t1451 se detectó el gen que codifica la toxina exfoliativa tipo A. Con respecto al gen *scn* del IEC, no se detectó en ninguna de las cepas, indicando que los linajes estudiados son de origen animal (Fowoyo & Ogunbanwo 2017; Benito et al., 2014).

De las 33 muestras estudiadas, solo en dos (6%) no fue posible aislar SCP o SCN. Esto demuestra que los estafilococos se encuentran presentes de manera habitual como parte de la microbiota en alimentos cárnicos de diferentes orígenes. La cepa de SCN que con mayor frecuencia se aisló fue *S. warneri* (35%); esta bacteria forma parte de la microbiota normal en el ser humano y animales, colonizando piel y membranas mucosas; además se encuentra frecuentemente en alimentos. *S. warneri* es un patógeno infrecuente en el ser humano: sin embargo, se han reportado casos de bacteriemias y otras infecciones asociadas a este microorganismo indicando que puede ocasionar infecciones importantes, especialmente en individuos inmunocomprometidos (Montanaro & Visa 2010).

La caracterización fenotípica permitió determinar que el 35% de las cepas de SCN presentaron resistencia a penicilina. Como se ha mencionado anteriormente, este antibiótico se empleó ampliamente en el pasado en el

tratamiento de infecciones causadas por estafilococos; sin embargo, la resistencia a penicilina por parte de las cepas SCN es cada vez mayor. En todos los aislados resistentes a penicilina, se detectó el gen *blaZ* como responsable de esta resistencia. No se encontró ningún aislado resistente a meticilina. El segundo antibiótico al que más presentaron resistencia fue la tetraciclina con un 23% de las cepas resistentes, siendo el responsable el gen *tetK*, solo o acompañado por *tetL*. Además, el 12% de las cepas fueron resistentes a eritromicina y el 4% a clindamicina.

Por otra parte, se determinó la prevalencia de *E. coli* productoras de BLEE tipo CTX-M, SHV y TEM en cepas aisladas de muestras de origen aviar destinadas para consumo humano, provenientes de Colombia. La producción avícola ocupa el segundo lugar respecto a actividades económicas agropecuarias en Colombia; no obstante, el estatus sanitario de la avicultura es incierto debido a la falta de monitoreo epidemiológico (Arenas et al., 2018).

La importancia de nuestro estudio se refleja en el aumento de publicaciones en los últimos años en diferentes países, incluidos España y Colombia, que muestran una prevalencia creciente en *Enterobacteriaceae* productoras BLEEs, carbapenemasas y especialmente una alta prevalencia de CTX-M-15 en España y otras regiones europeas especialmente en el ámbito clínico (Ojer-usoz et al., 2017). Además, otros estudios han observado la misma tendencia creciente de *E. coli* productora de BLEEs en animales, aguas y alimentos (Alonso et al., 2017; Maamar et al., 2015; Ben et al., 2015, entre otros). En Latinoamérica sin embargo, los estudios se encuentran muy limitados a la vigilancia de infecciones asociadas al ámbito clínico.

En estudios previos, nuestro grupo de investigación detectó *E. coli* productora de BLEE en el 25% de muestras derivadas del pollo procedentes de La Rioja; se detectaron mayoritariamente las variantes CTX-M-14 y SHV-12 (75%) y de forma minoritaria otras variantes (CTX-M-9, CTX-M-1, CTX-M-32 y TEM-52) (25%) (Somalo, S., 2013). En Colombia, la aparición de patógenos resistentes a antibióticos se encuentra bien documentado en ambientes clínicos y nosocomiales. También, se han descrito genes coexistiendo en reservorios animales y ambientales que confieren resistencia a aminoglucósidos, β -

lactámicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, linezolid y trimetoprim en patógenos de origen ambiental y animales de explotación pecuaria (Arenas et al., 2018) (Blanco et al., 2016).

En este TFM se encontró que el 68% de las muestras de pollo, de Colombia, analizadas eran portadoras de *E. coli* resistentes a cefotaxima. De estas cepas resistentes a cefotaxima, la mayor parte de ellas eran productoras de BLEEs (79,5%) y el resto eran productoras de cefamicinasas (tipo CMY-2). Se evidencia que las BLEE tipo CTX-M son las más frecuentes encontrando los subgrupos CTX-M-1, CTX-M-9 y CTX-M-8. Se detectaron las siguientes variantes: CTX-M 55 (47%), CTX-M65/90 (12 %), CTX-M-32 (2,9%) y CTX-M-8 (2,9%). También, se observó la presencia de BLEE tipo SHV-12 y de beta-lactamasas tipo TEM en un 15% y 21%, respectivamente. Con respecto al gen *mcr-1*, que se ha identificado en muestras de origen aviar no fue detectado en ninguna de las cepas analizadas en este estudio (Alonso et al., 2017),

Asimismo, se evidenció una alta prevalencia de β -lactamasas tipo CMY-2 (21%). *bla*CMY-2 es un gen AmpC mediado por plásmidos relacionado con el gen cromosómico *ampC* de *Citrobacter freundii*; confiere susceptibilidad reducida o resistencia a primera, segunda y tercera generación de cefalosporinas, así como a las penicilinas potenciadas y los inhibidores de la β -lactamasas, como el ácido clavulánico (Luke et al., 2009). Se ha sugerido que el uso agrícola de la ceftiofur, en animales productores de alimentos, ha aumentado la transmisión a través de los alimentos del gen *bla*CMY-2, resultando en el aumento de la resistencia a la ceftriaxona en enterobacterias (Heider et al., 2009).

La presión selectiva debido al uso indiscriminado de antibióticos es un hecho. Su uso como inductores de engorde (todavía permitido en algunos países aunque prohibido en la Unión Europea) y profilaxis tiene relevancia si se considera el hacinamiento en el que se encuentran los animales. En Colombia, aunque el uso de antibióticos en agricultura y ganadería está reglamentado y supervisado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA), el Instituto Nacional de Salud y el Ministerio de Salud y Protección Social, no está

reglamentado su uso con fines veterinarios y no es necesaria la formulación para su empleo (Arenas et al., 2018). Lo anterior ha llevado a que por falta de conocimiento los criadores de animales empleen estos productos de forma abusiva, generando un impacto en la adaptación de estos microorganismos y la adquisición de genes de resistencia, aspectos que deben ser valorados y controlados.

6. CONCLUSIONES

- Se ha detectado una elevada frecuencia de contaminación por *S. aureus* (61%) y SARM (39%), en alimentos de origen cárnico, representando un aumento importante respecto a estudios anteriores; además se observó una asociación con el tipo de muestra empleada, siendo los alimentos cárnicos derivados del cerdo los de mayor prevalencia para SARM, según el tipo de muestra 33% (carne picada), 80-100% (oreja y careta).
- La mayor parte de las cepas SARM pertenecieron a la línea genética CC398, aunque también se detectaron cepas SARM no-CC398 productoras de la leucocidina de Pantón Valentine.
- La presencia de cepas SARM CC398 (de *spa* tipos t011/t108) en muestras de cerdo, resistentes a tetraciclina y carentes de IEC, hace pensar en diferentes estadios evolutivos del linaje CC398 en ganado porcino.
- Todas las cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos, tanto SARM como SARM, carecían del gen *scn* del IEC, sugiriendo un origen animal de las mismas (y no por contaminación humana).
- El 79% de las muestras de alimentos presentaron contaminación por SCN, detectándose una gran diversidad de especies. Donde *S. warneri* representó el 35% de las cepas SCN aisladas.
- Se identifica una gran diversidad de genes de resistencia en las cepas de *S. aureus* y de SCN del estudio, algunos de ellos inusuales y ligados al consumo de antibióticos en animales.
- Se encontró una alta prevalencia de cepas de *E. coli* productoras de BLEE de tipo CTX-M y SHV (34% y 10%) en alimentos derivados de pollo en Colombia, siendo la CTX-M 55 la más prevalente (73%). Destaca asimismo la detección de cepas de *E. coli* CMY-2 positivas, que también tienen mucha relevancia en salud pública, en el 21% de las cepas estudiadas.
- En este estudio se pone de manifiesto la alta frecuencia de cepas SARM en alimentos derivados de cerdo y de *E. coli* productores de BLEEs o

cefamicinasas en alimentos de origen aviar en España y Colombia, respectivamente.

- La cadena alimentaria es un vehículo de diseminación de bacterias, incluidas las multirresistentes, que pueden ser transferidas al ser humano, constituyendo un problema de seguridad alimentaria. Por ello es fundamental establecer medidas que permitan controlar dicha diseminación y reducir los niveles de contaminación, incluyendo el establecimiento de prácticas de manejo adecuadas de los productos alimenticios tanto en la cadena de producción como en el momento de preparación de dichos alimentos.

7. REFERENCIAS

- Aarestrup, F., Agersù, Y., Ahrens, P., Christian, J., Madsen, M., & Jensen, L. (2000). Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in *staphylococci* from poultry. *Veterinary Microbiology*, 74: 353–364.
- Ahmadrajabi, R., Layegh-Khavidaki, S., Kalantar-Neyestanaki, D., & Fasihi, Y. (2017). Molecular analysis of immune evasion cluster (IEC) genes and intercellular adhesion gene cluster (ICA) among methicillin-resistant and methicillin-sensitive isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Prev Med Hyg*, 30;58(4):E308-E314.
- Al-mebairik, N., El-kersh, T., Al-sheikh, Y., Ali, M., & Marie, M. (2016). A review of virulence factors, pathogenesis, and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Reviews in Medical Microbiology*, 27(2): 50-56.
- Alonso, C., Zarazaga, M., Ben Sallem, R., Jouini, A., Ben Slama, K., & Torres, C. (2017). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* in husbandry animals: the African perspective. *Lett Appl Microbiol*, 64(5): 318-334.
- Argudín, M., Tenhagen B., Fetsch A., Sachsenro J., Ka A., Schroeter, A., & Appel, B. (2011). Virulence and Resistance Determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 Isolates from Nonhuman Sources †. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(9): 3052–3060.
- Batchelor M., Hopkins K., & Liebana E. (2005). blaCTX-M genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother*, 49(4):1319–1322
- Ben Said, L., Jouini, A., Klibi, N., Dziri, R., Alonso, CA., Boudabous, A., Ben Slama, K., & Torres C. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *Int J Food Microbiol*, 16;203: 86-92.
- Benito, D., Gomez, P., Lozano, C., & Gomez-Sanz, E. (2014). Genetic Lineages, Antimicrobial Resistance, and Virulence in *Staphylococcus aureus* of Meat Samples in Spain: Analysis of Immune Evasion Cluster

- (IEC) Genes. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(5): 354-356.
- Blanco, V., Maya, J., Correa, A., Perenguez, M., Mu, J., Mota, G., & Villegas, M. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 34(9): 559–565.
- Clark, A., Kaleta, E., Arora, A., & Wolk, D. (2013). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*, 26(3): 547-603.
- CRL-AR, Community Reference Laboratory for antimicrobial resistance. (2009). Multiplex PCR for the detection of the mecA gene and the identification of *Staphylococcus aureus* National Food Institute. *Technical University of Denmark*.
- de Freire M., Gonçalves B. & Coelho, L. (2010). Lysostaphin: A Staphylococcal Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals*, 3: 1139–1161.
- Foster, T. (1996). *Staphylococcus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): *University of Texas Medical Branch at Galveston*; Chapter 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8448/>.
- Foster, T. (2018). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS*, 41(3):430-449.
- Fowoyo, P., & Ogunbanwo, S. (2017). Antimicrobial resistance in coagulase - negative staphylococci from Nigerian traditional fermented foods. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(4): 1–7.
- García, C., Pardos de la Gandara, M., & Catillo, F. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella* *Cristina*. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 28(Supl 1): 12–18.

- Gozalet, N., Rodríguez, N., Torres, W., Callaghan, J., & De Jesús, R. (2011). A Simple Protocol for Molecular Analysis with DNA Extrated from Ear Tissue of Laboratory Animals : Mouse and Rat , Using Bromelina Enzyme. *FCV-LZ*, 21(3): 233–238.
- Harmsen, D., Claus, H., Witte, W., Claus, H., Turnwald, D. & Vogel, U. (2003). Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a University Hospital Setting by Using Novel Software for spa Repeat Determination and Database Management. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5442–5448.
- Heider, L., Hoet, A., Wittum, T., Khaita, M., Love, B., Huston, C., & Gebreyes W. (2009). Genetic and Phenotypic Characterization of the bla CMY Gene from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10).
- Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., & Vandenesch, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, agr Groups (Alleles), and Human Disease . *Infection and Immunity*, 70(2): 631–641.
- Johnson, J., R U., Dobrindt, U., Giske, C., Naas, T., Carattoli, A., & Soto, S. (2018). *Escherichia coli* : an old friend with new tidings. *FEMS*, 40(4): 437-463.
- Kehrenberg, C., Schwarz, S., Jacobsen, L., Hansen, L., & Vester, B. (2005). A new mechanism for chloramphenicol, florfenicol and clindamycin resistance : methylation of 23S ribosomal RNA at A2503. *Molecular Microbiology*, 57(4), 1064–1073.
- Landers, T., Cohen, B., Wittum, T., & Larson, E. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals : Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*, 127(February 2012), 127 (1): 4–22.
- Li, G., Wu, C., Wang, X., & Meng, J. (2015). Prevalence and characterization of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from retail foods. *International Journal of Food Microbiology*, 196: 94–97.

- Lina, G., Piémont, Y., Godail-Gamot, F., Bes, M., Peter, M., Gauduchon, V., Vandenesch F. & Etienne, J. (1999). Involvement of Panton-Valentine Leukocidin—Producing *Staphylococcus aureus* in Primary Skin Infections and Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5): 1128–1132
- Liu, Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L., Zhang, R., Spencer, J., & Park, H. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2): 161–168.
- Linhares, L., Yang, M., Sreevatsan, S., Munoz-zanzi, C. & Davies, P. (2015). The effect of anatomic site and age on detection of *Staphylococcus aureus* in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(1): 55–60.
- Lozano, C., Lopez, M., Ruiz, F., Torres, C., & Zarazaga, M. (2009). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in food samples of animal origin in Spain Transparency declarations Molecular characterization of group B streptococci with reduced penicillin susceptibility recurrently isolated from a sacral. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2009), 64: 21–22.
- Lozano, C., Aspiroz, C., Rezusta, A., Gómez-sanz, E., Simon, C., Gómez, P., & Torres, C. (2012). International Journal of Antimicrobial Agents Identification of novel vga (A) -carrying plasmids and a Tn 5406 -like transposon in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* of human and animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(4): 306–312.
- Maamar, E., Hammami, S., Alonso, C., Dakhli, N., Abbassi, M., Ferjani, S., Hamzaoui, Z., Saidani, M., Torres, C., & Boutiba-Ben, B. (2016). High prevalence of extended-spectrum and plasmidic AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from poultry in Tunisia. *Int J Food Microbiol*, 16;231: 69-75.
- McCarthy, J. & Lindsay, A. (2013). *Staphylococcus aureus* innate immune evasion is lineage-specific: A bioinformatics study. *Infection Genetics and*

- evolution*. 19: 7-14.
- Montanaro, L., & Visai, L. (2010). Characterization of 26 *Staphylococcus warneri* isolates from orthopedic infections. *The International Journal of Artificial Organs*, 33(9): 575–581.
- Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic Resistance - Problems, Progress, and Prospects. *New England Journal of Medicine*, 371(19):1761-3.
- Ogihara, S., Saito, R., Sawabe, E., Kozakai, T., Shima, M., Aiso, & Hagihara, M. (2018). Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of PCR-based open reading frame typing , multilocus sequence typing , and *Staphylococcus* protein A gene typing. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 24(4): 312–314.
- OIE. (2011). *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, 1–27.
- Ojer-usoz, E., Gonz, D. & Vitas, I. (2017). Clonal Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* Isolated from Environmental , Human and Food Samples. *International Journal of Enviromental Research and Public Health*, 14(676): 10–12.
- Paterson, D. & Bonomo R. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4): 657–686.
- Pagani, L., Dell’Amico, E., Migliavacca, R., D’Andrea, M., Giacobone, E., Amicosante, G., & Rossolini, G. M. (2003). Multiple CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from a Hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9): 4264–4269.
- Pyörälä, S., Edward, K., Catry, B., Duijkeren, E. Van, Greko, C., Moreno, M. & Törneke, K. (2014). Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: Use and development of antimicrobial resistance. *The Veterinary Journal*, 200(2): 230–239.
- Rivera, M., Rodríguez, C., Clavo, R., Serquén, L., & Arce, Z. (2015). Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en *Klebsiella*

- spp* y *Escherichia coli* aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 32(4): (752–755).
- Schnellmann, C., Gerber, V., Rossano, A., Jaquier, V., Panchaud, Y., Doherr, M., & Perreten, V. (2006). Presence of New *mecA* and *mph* (C) Variants Conferring Antibiotic Resistance in *Staphylococcus spp* . Isolated from the Skin of Horses before and after Clinic Admission. *American Society For Microbiology*, 44(12): 4444–4454.
- Stapleton, P., Shannon, K. & French, G. L. (1999). Carbapenem Resistance in *Escherichia coli* Associated with Plasmid-Determined CMY-4 β -Lactamase Production and Loss of an Outer Membrane Protein. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5): 1206–1210.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Viridi, J. S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 791.
- Simarro, E., Navarro, F., Ruiz, J., Miró, E., Gómez, J., & Mirelis, B. (2000). *Salmonella enterica* Serovar Virchow with CTX-M-Like β -Lactamase in Spain. *J Clin Microbiol*, 38(12):4676-8.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(11): 2562–2566.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C. & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2): 70–78.
- Thammavongsa, V., Kim, H. K., Missiakas, D. & Schneewind, O. (2015). *Staphylococcal* manipulation of host immune responses. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(9): 529–543.
- Tan, S. Y., & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Medicine in Stamps*, 56(7): 366–367.
- Van de Klundert, J. A., & Vliegenthart, J.(1993). Nomenclature of

- aminoglycoside resistance genes: a comment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(4): 927–928.
- Van Wamel, W., Rooijackers, S., Ruyken, M., van Kessel, K. & van Strijp., J. (2006). The Innate Immune Modulators Staphylococcal Complement Inhibitor and Chemotaxis Inhibitory Protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -Hemolysin-Converting Bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 188(4): 1310–1315.
- Wang, Y., Liu, Q., Liu, Q., Gao, Q., Lu, H., Meng, H., & Li, M. (2018). Phylogenetic analysis and virulence determinant of the host-adapted *Staphylococcus aureus* lineage ST188 in China. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1): 45.
- Wondrack, L., Massa, M., Yang, B. V., & Sutcliffe, J. (1996). Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(4): 992–998.
- World Health Organization. (2017). WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva, Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- World Health Organization. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Ginebra.