



FACULTADE DE CIENCIAS

GRAO EN BIOQUÍMICA

D.^a Carmen Daofang Barreiro Álvarez

**SEGURIDAD ALIMENTARIA: CARNE DE CAZA
COMO TRANSMISORA POTENCIAL DE CLONES
DE ENTEROBACTERIACEAE DE ALTO RIESGO**

Trabajo Fin de Grao

Junio 2025

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Carmen Daofang Barreiro Álvarez, y está bajo una licencia de “*Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional*”.



Financiación

La parte experimental del presente Trabajo de Fin de Grado ha sido realizado en el marco del proyecto de I+D+i / PID2022-143041OB-100, financiado por MICIU/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER Una manera de hacer Europa; junto con la ayuda ED431C 2021/11 de la Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria (Xunta de Galicia) and FEDER; y el Proyecto colaborativo Campus Terra “Estudio del jabalí como reservorio de cepas de *E. coli* con capacidad patógena extraintestinal para el hombre/JABACOLIX”.



ÍNDICE

RESUMEN	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
RESUMEN GRÁFICO	8
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1 Enfermedades zoonóticas de origen alimentario.....	11
1.1.1 Programas de control de carne de caza	11
1.2 Resistencia antimicrobiana (RAM).....	13
1.2.1 Familias de antibióticos.....	14
1.3 <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
1.3.1 <i>Escherichia coli</i>	16
1.3.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
3.1. Procesado de las muestras	19
3.1.1 Cuantificación de <i>E. coli</i>	19
3.1.2 Pre-enriquecimiento y enriquecimiento	20
3.2 Aislamiento e identificación de enterobacterias.....	20
3.2.1 Medio ML	21
3.2.2 Medio SCAi.....	21
3.2.3 Medio ESBL.....	22
3.2.4 Medio CARBA.....	23
3.3 Caracterización genotípica de las cepas identificadas.....	24
3.3.1 PCR convencional.....	24
3.3.2 Secuenciación Sanger.....	26
3.4 Caracterización fenotípica de RAM.....	28

3.4.1 Preparación del inóculo	28
3.4.2 Inoculación de las placas	28
3.4.3 Colocación de los discos de antibióticos	28
3.4.4 Lectura e interpretación de los resultados	29
3.5 Análisis estadístico	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1 Valoración del riesgo microbiológico de las carnes basada en los recuentos de <i>E. coli</i>	31
4.2 Aislamiento e identificación de Enterobacteriaceae	33
4.2.1 Recuperación de Enterobacteriaceae	33
4.2.2 Recuperación de cepas potencialmente zoonóticas	35
4.3 Determinación de RAM	37
4.3.1 Determinación genotípica de RAM	37
4.3.2 Determinación fenotípica de RAM	38
4.4 Caracterización de las cepas identificadas	42
5. CONCLUSIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

Seguridad alimentaria: carne de caza como transmisora potencial de clones de Enterobacteriaceae de alto riesgo

La carne de caza silvestre, como la del jabalí (*Sus scrofa*), presenta riesgos microbiológicos no equiparables a la carne de animales de granja, debido a la ausencia de controles sanitarios sistemáticos y a diferencias en su procesado.

Se analizaron 28 muestras de carne de jabalí destinadas a autoconsumo, procedentes de cacerías autorizadas en el Principado de Asturias (temporada 2024-2025). Se recuperaron cepas de *Escherichia coli* ExPEC (7,1 %) y aEPEC (10,7 %), identificándose en conjunto 17,9 % de muestras con cepas potencialmente zoonóticas. Se detectaron 10 clonotipos distintos, incluyendo CH65-32 y CH45-97, asociados a humanos y animales. El 32,2 % de las muestras albergaban cepas productoras de BLEE, con varios tipos *bla*_{CTX-M}, predominando el alelo CTX-M-15. Una cepa portaba simultáneamente *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CMY-2}, señalando la posible transferencia de elementos genéticos móviles. A nivel filogenético, predominó el grupo B1, con presencia del grupo B2 (14,3 %), asociado a infecciones humanas. Además, *Klebsiella pneumoniae* se recuperó en el 60,7 % de las muestras, con una cepa productora de BLEE (tipo CTX-M-15). El análisis de riesgo evidenció que incluso las muestras clasificadas como “satisfactorias” según el criterio microbiológico estándar, podían contener indicadores de riesgo relevantes.

En conclusión, la carne de jabalí destinada a autoconsumo puede actuar como vehículo de enterobacterias de alto riesgo, como *K. pneumoniae* y *E. coli* productoras de BLEE y/o con factores de virulencia, señaladas por la Organización Mundial de la Salud como patógenos críticos en relación con la resistencia a los antimicrobianos (RAM). La elevada prevalencia de *K. pneumoniae* recuperada en las muestras, aunque con escasa proporción de BLEE, también requiere vigilancia. Nuestros resultados evidencian la necesidad de establecer controles más estrictos sobre la carne de caza y promover buenas prácticas higiénico-sanitarias en su procesado, para garantizar una alimentación segura en el marco de la estrategia “Una sola salud”.

Palabras clave: Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, caza, *Sus scrofa*, seguridad alimentaria, antibiorresistencia (RAM), BLEE.

RESUMO

Seguridade alimentaria: carne de caza como transmisora potencial de clons de Enterobacteriaceae de alto risco

A carne de caza silvestre, como a do xabaril (*Sus scrofa*), presenta riscos microbiolóxicos non equiparables aos da carne de animais de granxa, debido á ausencia de controis sanitarios sistemáticos e a diferencias no seu procesado.

Analizáronse 28 mostras de carne de xabaril destinadas a autoconsumo, procedentes de cacerías autorizadas no Principado de Asturias (tempada 2024-2025). Recuperáronse cepas de *Escherichia coli* ExPEC (7,1 %) e aEPEC (10,7 %), identificándose en conxunto 17,9 % de mostras con cepas potencialmente zoonósicas. Detectáronse 10 clonotipos diferentes, incluíndo CH65-32 e CH45-97, asociados a humanos e animais. O 32,2 % das mostras albergaban cepas produtoras de BLEE, con varios tipos *bla*_{CTX-M}, predominando o alelo CTX-M-15. Unha cepa foi portadora simultaneamente de *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CMY-2}, sinalando a posible transferencia de elementos xenéticos móbiles. A nivel filoxenético, o grupo B1 foi o predominante, con presenza do grupo B2 (14,3 %), asociado a infeccións humanas. Ademais, *Klebsiella pneumoniae* recuperouse no 60,7 % das mostras, cunha cepa produtora de BLEE (tipo CTX-M-15). A análise de risco evidenciou que mesmo as mostras clasificadas como “satisfactorias” segundo o criterio microbiolóxico estándar, presentaban indicadores de risco relevantes.

En conclusión, a carne de xabaril destinada ao autoconsumo pode actuar como vehículo de enterobacterias de alto risco, como *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de BLEE e/ou con factores de virulencia, sinaladas pola Organización Mundial da Saúde como patóxenos críticos en relación á resistencia aos antimicrobianos (RAM). A elevada prevalencia de *K. pneumoniae* recuperada nas mostras, aínda que cunha baixa proporción de cepas BLEE, tamén require vixilancia. Os nosos resultados evidencian a necesidade de establecer controis máis estritos sobre a carne de caza e promover boas prácticas hixiénico-sanitarias na súa manipulación, co fin de garantir unha alimentación segura no marco da estratexia “Unha soa saúde”.

Palabras chave: Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, caza, *Sus scrofa*, seguridade alimentaria, antibiorresistencia (RAM), BLEE.

ABSTRACT

Food safety: game meat as a potential transmitter of high-risk *Enterobacteriaceae* clones

Wild game meat, such as wild boar (*Sus scrofa*), presents microbiological risks that is not comparable to meat from farm animals, due to the absence of systematic health controls and differences in processing.

In this study, 28 samples of wild boar meat intended for self-consumption were analyzed, obtained from authorized hunts in the Principality of Asturias (2024-2025 season). *Escherichia coli* ExPEC (7.1 %) and aEPEC (10.7 %) strains were recovered, with a total of 17.9 % of samples identified as carrying potentially zoonotic strains. Up to 10 different clonotypes were detected, including CH65-32 and CH45-97, associated with humans and animals. A total of 32.2 % of the samples harbored ESBL-producing strains, with several *bla*_{CTX-M} types, predominantly the CTX-M-15 allele. One strain co-harbored *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{CMY-2}, signaling the possible transfer of mobile genetic elements. At the phylogenetic level, group B1 was predominant, with the presence of group B2 (14.3 %), linked to human infections. Additionally, *Klebsiella pneumoniae* strains were recovered from 60.7 % of the samples, with an ESBL-producing strain (type CTX-M-15). Risk analysis revealed that even samples classified as “satisfactory” under standard microbiological criteria contained relevant risk indicators.

In conclusion, wild boar meat intended for self-consumption can act as a vehicle for high-risk *Enterobacteriaceae*, such as *K. pneumoniae* and *E. coli* producing ESBL and/or carrying virulence factors, listed by the World Health Organization as critical pathogens in relation to antimicrobial resistance (AMR). The high prevalence of *K. pneumoniae* recovered in the samples, although with a low proportion of ESBL producers, also calls for surveillance. Our results highlight the need to establish stricter controls over game meat and promote good hygienic practices in its handling to ensure food safety, in line with the “One Health” strategy.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, hunting, *Sus scrofa*, food safety, antibiotic resistance (AMR), ESBL.

RESUMEN GRÁFICO

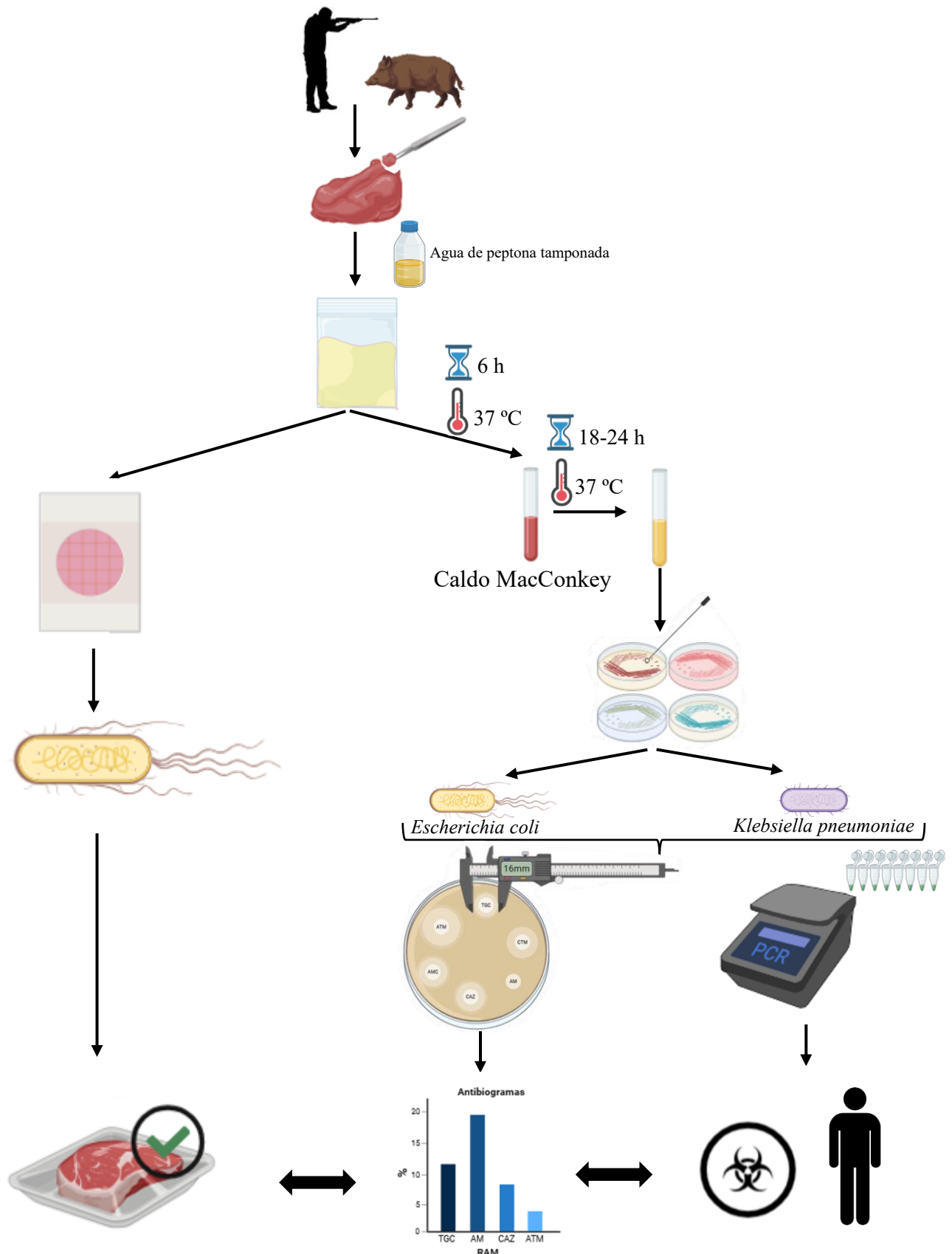


Figura 1. Resumen gráfico de “Seguridad alimentaria: carne de caza como transmisora potencial de clones de Enterobacteriaceae de alto riesgo”. Creado con BioRender.com

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

APT: agua de peptona tamponada

BCIG: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronida

BLEE: β -lactamasas de espectro extendido

CGE (*Centre for Genomic Epidemiology*): Centro de Epidemiología Genómica

CH: clonotipado (*fum*C-*fim*H)

CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*): Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio

CPE (*Carbapenemases-Producing Enterobacteriaceae*): Enterobacterias Productoras de Carbapenemasas

ddNTP: dideoxinucleótidos trifosfatos

EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*): Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana

GF: Grupo filogenético

LREC: Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli*

MDR (*multidrug-resistance*): Multirresistente

MH: Mueller-Hinton

ML: MacConkey Lactosa

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBPs (*penicillin-binding proteins*): proteínas de unión a penicilina

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en Cadena de la Polimerasa

PNCOCA: Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria

RAM: Resistencia antimicrobiana

SCAi: Citrato de Simmons con mio-inositol

TSA: Agar triptona de soja

UE: Unión Europea

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

1. INTRODUCCIÓN

La caza ha sido una de las actividades principales llevadas a cabo por los seres humanos desde el comienzo de los tiempos, desempeñando un papel fundamental en la alimentación humana. Hoy en día, la actividad cinegética sigue siendo una actividad importante en muchos países, pues se trata de un deporte prestigioso, profundamente arraigado en la cultura, tradición y patrimonio europeos (Needham *et al.*, 2023).

En los últimos años, la población europea de ungulados silvestres (ciervos, jabalíes, corzos) ha crecido significativamente en términos de número y área cubierta debido a muchas razones, pero principalmente se atribuye a los cambios en el uso del suelo por los humanos y al abandono del campo (Acevedo *et al.*, 2011; 2019). Relacionado con este incremento de población, aumenta la disponibilidad de carne de caza y esto ha permitido que el consumo de la carne de caza se esté incrementando (Fantechi *et al.*, 2022). Además, su sabor, su valor nutricional y su bajo contenido en grasa son importantes parámetros de calidad que influyen a los consumidores a aumentar su consumo futuro de carne de caza (Niewiadomska *et al.*, 2020).

No obstante, los índices de consumo son inferiores a los de las especies domésticas, a veces relacionado con las dificultades para obtenerla. En España, la carne de especies cinegéticas silvestres representa solo el 2 % de la ingesta total de carne, consumida principalmente en bares o restaurantes (63,4 %) y el 37,8 % de la carne de caza es consumida por los propios cazadores o su círculo íntimo (familiares, amigos y vecinos) (GfK, 2023). Este valor ha descendido respecto a 2017, cuando primaba el consumo directamente de la caza (56,8 %) y sólo el 38,2 % se consumía en restaurantes (GfK, 2017).

Debido a su origen y a las circunstancias especiales de procesamiento, la carne de caza puede representar un mayor riesgo sanitario en comparación con la carne de origen de granja (Lizana *et al.*, 2022). Las condiciones microbiológicas de la carne de caza dependen de factores muy variables como son la salud del animal, los tipos de microorganismos presentes, las circunstancias en las que se mata al animal, la evisceración en el campo o las condiciones en las que se transportan, almacenan y procesan los animales abatidos. Es por ello que los patógenos zoonóticos vehiculados por el animal pueden entrar en la cadena alimentaria si las prácticas de manipulación no son las adecuadas (Obwegeser *et al.*, 2012).

1.1 Enfermedades zoonóticas de origen alimentario

Las enfermedades zoonóticas, o zoonosis, son enfermedades que se transmiten de los animales a las personas y viceversa. Para hacer frente a las enfermedades zoonóticas y a otras amenazas sanitarias compartidas en la interfaz hombre-animal-medioambiente se necesita la colaboración de todos los sectores y disciplinas responsables de la salud (enfoque multidisciplinar conocido como “One Health”) (WHO, FAO and OIE, 2019).

Las enfermedades zoonóticas se pueden transmitir por medio de los alimentos, el agua o vectores, y puede ser por contacto directo con animales, o indirectamente a través de fómites o contaminación ambiental. (WHO *et al.*, 2019). Las zoonosis de origen alimentario están causadas por el consumo de alimentos o agua contaminados por microorganismos patógenos (causantes de enfermedades) como bacterias, virus y parásitos, que muchos de ellos se encuentran habitualmente en los intestinos de animales sanos que producen alimentos. Los riesgos de contaminación requieren medidas de prevención y control a lo largo de toda la cadena alimentaria. Las enfermedades de transmisión alimentaria más comunes son las causadas por *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *E. coli* y *Listeria* (EFSA, 2025a).

En la Unión Europea (UE) hay un sistema para la monitorización y recopilación de información sobre las zoonosis, basada en la [Directiva 2003/99/EC](#), que obliga a los Estados Miembros de la UE a recopilar datos relevantes y, cuando proceda comparables sobre zoonosis, agentes zoonóticos, resistencia a los antimicrobianos y brotes de origen alimentario (EFSA and ECDE, 2024).

Una de las especies cinegéticas que puede transmitir enfermedades zoonóticas es el jabalí (*Sus scrofa*), que es sobre el que vamos a trabajar en este estudio. Se trata de un mamífero de mediano tamaño que se encuentra principalmente en la meseta norte de España, en fragmentos forestales grandes cercanos a bosques junto a montañas, o bosques de ribera (Fernández-Llario *et al.*, 2017).

1.1.1 Programas de control de carne de caza

Además de existir controles de monitorización de las zoonosis, también existen programas de control para la caza de animales salvajes y su comercialización. La regulación de la comercialización de la caza mayor silvestre abatida permite, además de controles de seguridad alimentaria, una mejor ejecución de los controles relativos a la vigilancia y control

en el ámbito de la sanidad animal. Para minimizar el riesgo potencial de transmisión de enfermedades por consumo de carne procedente de la actividad cinegética, se establecen unos requisitos para controlar las condiciones sanitarias que deben cumplir las piezas antes de ser introducidas en la cadena alimentaria.

-A nivel europeo: El Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de la UE, de 29 de abril de 2004, establece las normas específicas de higiene de la carne de caza silvestre destinada al consumo humano. En él se indica que toda la carne de caza silvestre que se comercialice deberá obtenerse en un establecimiento de manipulación de caza, aunque en casos excepcionales, debidamente justificados y con autorización previa de la autoridad competente, los cazadores pueden realizar el suministro directo de pequeñas cantidades de carne fresca de caza mayor silvestre al consumidor final.

-A nivel nacional: El Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA 2021-2025) es un documento que describe los sistemas de control oficial a lo largo de toda la cadena alimentaria en España, desde la producción primaria hasta los puntos de venta al consumidor final. La finalidad de estos controles es reducir los riesgos para la salud de las personas presentes en los alimentos y asegurar el bienestar de los animales destinados al sacrificio para el consumo humano. Dentro de los controles se incluye la vigilancia de resistencias antimicrobianas de agentes zoonóticos alimentarios en mataderos, salas de manipulación de caza y establecimientos que reciben reses lidiadas sangradas (AESAN, 2022). No obstante, no están incluidas las carnes de especies cinegéticas destinadas al autoconsumo.

- A nivel autonómico: el Decreto 28/2021, de 21 de enero, por el que se adoptan medidas sobre el suministro directo de la caza mayor silvestre abatida en la Comunidad Autónoma de Galicia, establece:

- ❖ Los requisitos para el suministro directo por parte de la persona cazadora a la persona consumidora final.
- ❖ Los requisitos que deben cumplir las piezas de caza mayor silvestre abatidas en Galicia destinadas a salas de tratamiento de caza para la comercialización de sus carnes y que tienen que cumplir los locales intermedios de faenado de dichas piezas de caza silvestre destinadas al consumo directo.
- ❖ Los requisitos higiénicos y sanitarios del acondicionamiento y el transporte de las piezas de caza mayor silvestres destinadas a consumo humano.

1.2 Resistencia antimicrobiana (RAM)

Algunas de las bacterias presentes en los alimentos, ya sean causantes o no de intoxicaciones alimentarias, son resistentes a los antimicrobianos, lo que significa que, en caso de provocar una infección, su tratamiento se verá comprometido (CDC, 2024). Esto se debe al uso excesivo o indebido que se ha venido realizando de antimicrobianos, lo que ha acelerado el fenómeno natural de selección de bacterias resistentes, y que éstas se puedan propagar y transferir entre el medio ambiente, los animales y los seres humanos (EFSA, 2025b).

De esta manera, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) se define como la capacidad de los microorganismos para contrarrestar la acción de los agentes antimicrobianos, y se produce cuando un antibiótico pierde su eficacia para inhibir el crecimiento bacteriano (Nadeem *et al.*, 2020).

Esta resistencia puede ser (Arzanlou *et al.*, 2017):

- ❖ **Intrínseca:** si se debe a las propiedades inherentes de la bacteria, como la resistencia a glucopéptidos por parte de las bacterias Gram negativas debido a la impermeabilidad de la membrana externa de las Gram negativas.
- ❖ **Adaptativa:** si es inducida por una señal ambiental específica como estrés, pH o condiciones nutritivas. Se trata de una resistencia transitoria y parece ser el resultado de modulaciones en la expresión génica, en concreto en cambios epigenéticos como la metilación del ADN.
- ❖ **Adquirida:** si se presenta cuando una bacteria previamente sensible adquiere un mecanismo de resistencia, ya sea por una mutación o por la adquisición de nuevo material genético por transferencia horizontal de genes (puede producirse a través de transformación, transducción o conjugación).

La RAM se debe principalmente a la destrucción o modificación del antibiótico, alteración de la diana (sustitución, mutaciones, alteraciones enzimáticas, protección, sobreproducción o desviación del lugar de la diana) y acumulación reducida de antibióticos debido a la disminución de la permeabilidad y/o aumento del eflujo. Además, la resistencia antibiótica puede ser resultado de una adaptación global de la célula bacteriana (Christaki *et al.*, 2020).

La aparición y rápida diseminación de bacterias resistentes está disminuyendo la eficacia de los antibióticos y algunas estimaciones sugieren que para 2050 la cifra de personas que mueran por problemas relacionados con la RAM alcanzaría los 10 millones anuales, convirtiéndose en la primera causa de muerte natural por delante del cáncer (O'Neill *et al.*, 2016). Esto pone en valor la problemática que suponen, considerándose un grave problema a nivel mundial y situado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre las diez mayores amenazas de salud pública para la humanidad (WHO, 2019).

1.2.1 Familias de antibióticos

Los antimicrobianos son compuestos que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos o matarlos. Los antibióticos son una clase específica de antimicrobianos producidos como metabolitos secundarios por ciertas especies de hongos y bacterias, o derivada de forma sintética o semisintética, que en bajas concentraciones es capaz de matar o inhibir el crecimiento de otras bacterias (Thakur *et al.*, 2025).

Entre las principales familias de antibióticos se encuentran los β -lactámicos, que son los antibióticos más ampliamente utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Kim *et al.*, 2023). Esta familia de antibióticos (Tabla 1) se caracteriza por un anillo β -lactámico, que es clave para su actividad antibacteriana. Eso se debe a que presenta una similitud estructural con el dímero terminal D-Ala-D-Ala del peptidoglicano (componente principal de la pared bacteriana), lo que permite que se pueda unir covalentemente a las transpeptidasas, también llamadas proteínas de unión a penicilina (PBPs, del inglés *penicillin-binding proteins*), que catalizan la reticulación de las cadenas de peptidoglicano para formar la pared celular. De esta manera, se produce la inhibición irreversible de las transpeptidasas afectadas, lo que impide la formación de la pared celular, dejando a la célula susceptible de lisis por cambios en la presión osmótica (Bahr *et al.*, 2021).

Tabla 1. Principales categorías de antibióticos β -lactámicos (Elaboración propia).

Familia	Categoría		Antibióticos representativos	
β -lactámicos	Penicilinas		Ampicilina	Amoxicilina
			Cloxacilina	Piperacilina
	Cefalosporinas	1ª gen	Cefazolina	
		2ª gen	Cefuroxima	
		3ª gen	Cefotaxima	
		4ª gen	Cefepima	

	Carbapenemas	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
	Monobactámicos	Aztreonam		
	Inhibidores de β -lactamasas	Ácido clavulánico	Sulbactam	Tazobactam

El mecanismo de resistencia más importante frente a los β -lactámicos es la producción de β -lactamasas, que puede ser una resistencia adquirida (en microorganismos como *E. coli*) o intrínseca (*K. pneumoniae* producen β -lactamasas de forma natural). Estas enzimas hidrolizan el anillo β -lactámico, de modo que el antibiótico no puede ejercer su acción (Suárez & Gudíol, 2009). Las β -lactamasas se clasifican en diferentes clases según su mecanismo de acción y estructura. El sistema más utilizado es el propuesto por Ambler en 1980 (Figura 2), que agrupa las enzimas en 4 clases (A, B, C, D) en función de su secuencia aminoacídica.

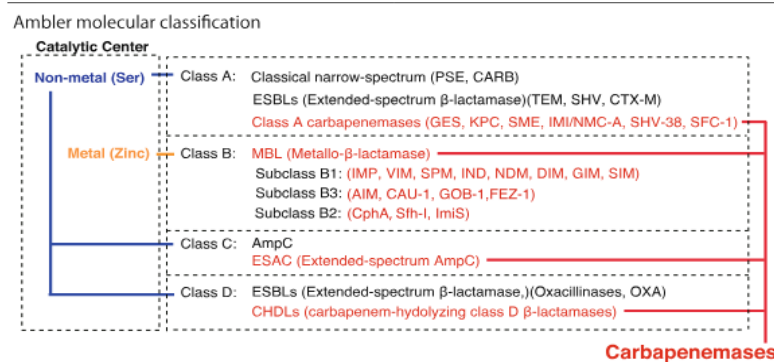


Figura 2. Clasificación Ambler de las β -lactamasas. Tomada de Sawa *et al.*, *J intensive care* **8**, 13 (2020).

Las β -lactamasas de clase A, C y D son serina- β -lactamasas (SBLs), caracterizadas por la presencia de un residuo de serina en el sitio activo, esencial para la hidrólisis de los β -lactámicos. Por el contrario, las enzimas de la clase B, conocidas como metalo- β -lactamasas (MBLs), requieren iones de zinc en su sitio activo para llevar a cabo la hidrólisis (De Angelis *et al.*, 2020).

β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las enzimas BLEE confieren resistencia a las penicilinas, cefalosporinas y monobactámicos. A diferencia de las carbapenemasas, su actividad puede ser neutralizada por inhibidores de β -lactamasas como el ácido clavulánico o tazobactam. Los tipos de BLEE más comunes incluyen CTX-M (derivadas de β -lactamasas cromosómicas de *Kluyvera* spp. y las más prevalentes), SHV y TEM (originadas a partir de penicilinasas codificadas en plásmidos). Los genes que codifican BLEE se encuentran sobre todo en transposones o secuencias de inserción dentro de plásmidos. Esta ubicación facilita su propagación, lo que

contribuye a la multirresistencia antimicrobiana, especialmente en especies bacterianas Gram negativas como *E. coli* y *K. pneumoniae* (Husna *et al.*, 2023).

Carbapenemasas

Las carbapenemasas son un grupo de β -lactamasas capaces de hidrolizar eficazmente los carbapenémicos, una clase de antibióticos de último recurso, y otros β -lactámicos. El espectro de hidrólisis depende de la naturaleza de la enzima específica. Desde el punto de vista terapéutico y epidemiológico, es crucial destacar que las Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas a menudo co-expresan otros genes de resistencia, lo que resulta en resistencia a múltiples clases de antibióticos β -lactámicos (Martínez-Martínez & González-López, 2014).

1.3 Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae

E. coli y *K. pneumoniae* son miembros de la familia Enterobacteriaceae. Son bacterias Gram negativas que se pueden encontrar en la microbiota intestinal de personas y animales sanos. No obstante, a veces pueden causar infecciones o disbiosis, y la alta prevalencia de infecciones causadas por estas bacterias sumado a la capacidad que tienen para desarrollar resistencia a los antibióticos las convierte en un problema de salud pública importante (García *et al.*, 2023; García-Meniño *et al.*, 2024; Silva-Bea *et al.*, 2024).

1.3.1 Escherichia coli

E. coli es una bacteria comensal que constituye el anaerobio facultativo más abundante de la microbiota intestinal humana (Kaper *et al.*, 2004), por lo que se considera un signo de contaminación fecal en la higiene de los alimentos. Además, *E. coli* comensal se utiliza como bioindicador para vigilar la evolución de la resistencia antimicrobiana (García *et al.*, 2022; Rega *et al.*, 2022; EFSA, 2025b).

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas e incluso beneficiosas, pero algunos clones han adquirido genes de virulencia específicos que le permiten causar una gran variedad de enfermedades, clasificándose en dos grandes grupos (Kaper *et al.*, 2004):

- *E. coli* patógeno intestinal (InPEC), que causa infecciones dentro del intestino y engloba 6 patotipos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* verotoxigénica o productora de toxina shiga (VTEC/STEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* con adherencia difusa (DAEC).

- *E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC), que causa infecciones fuera del intestino. A este grupo pertenecen *E. coli* uropatógeno (UPEC), *E. coli* asociado con meningitis/sepsis (MNEC/SPEC) y *E. coli* patogénico aviar (APEC).

Los clones de alto riesgo de *E. coli*, como el clon de alto riesgo pandémico ST131, se caracterizan por conjugar factores de virulencia asociados a ExPEC, presentar multirresistencia y propagarse por un área geográfica extensa. Por ejemplo, el clon pandémico ST131 es el principal agente etiológico de infecciones hospitalarias del trato urinario (UPEC), asociado además a la prevalencia y diseminación de CTX-M-15 (García-Meniño *et al.*, 2024).

1.3.2 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae es una bacteria Gram negativa, encapsulada y no móvil que se puede encontrar en el medio ambiente (aguas superficiales, suelo, dispositivos médicos) y en superficies mucosas de mamíferos como el tracto gastrointestinal y la nasofaringe (Paczosa & Meccas, 2016). De ahí puede penetrar en otros tejidos y causar infecciones oportunistas nosocomiales graves en seres humanos, como infecciones del tracto urinario, neumonía o septicemia (Podschun & Ullmann, 1998). Actualmente existen dos variantes clínicamente relevantes, que son *K. pneumoniae* hipervirulento (hvKp), que causa infecciones invasivas adquiridas en la comunidad caracterizadas por abscesos hepáticos e infecciones metastásicas, y *K. pneumoniae* clásico (cKp), que causa infecciones que suelen emerger en el entorno hospitalario como infecciones urinarias o neumonía (González-Ferrer *et al.*, 2021). *K. pneumoniae* presenta resistencia intrínseca a la ampicilina debido a la producción de penicilinas SHV-1, codificada en su cromosoma. Además, puede adquirir genes de resistencia a antimicrobianos mediante mutaciones cromosómicas o por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (Wyres & Holt, 2018). Esta resistencia representa un desafío clínico significativo, ya que dificulta el tratamiento de las infecciones causadas por *K. pneumoniae*.

Para facilitar su colonización y crecimiento en el huésped, *K. pneumoniae* expresa diversos factores de virulencia (Clegg & Murphy, 2016) como la producción de sideróforos captadores de hierro, lipopolisacáridos, hiperproducción capsular (uno de los factores más importantes) y formación de biopelículas. Estos mecanismos dificultan la acción de los antimicrobianos y contribuyen a su persistencia en el huésped (Holt *et al.*, 2015; Silva-Bea *et al.*, 2024).

2. OBJETIVOS

Este proyecto tuvo como objetivo general evaluar la calidad microbiológica de carne de jabalí destinada al autoconsumo, procedente de la cacería autorizada en los cotos de la comarca de Oviedo (Principado de Asturias), y caracterizar fenotípica y genotípicamente las enterobacterias presentes y su perfil de resistencia a los antimicrobianos (RAM).

Los objetivos específicos fueron:

1. Evaluar el riesgo microbiológico asociado al consumo de carne de caza destinada al autoconsumo.
2. Caracterizar las enterobacterias aisladas en las muestras de carne de jabalí.
3. Determinar fenotípica y genotípicamente el perfil de resistencia antimicrobiana de los aislamientos.
4. Analizar el papel de la carne de caza como posible vehículo de transmisión de enterobacterias multirresistentes de alto riesgo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología empleada en este TFG está basada en la previamente descrita en el trabajo de Díaz-Jiménez *et al.*, 2021, con las modificaciones que se indican a continuación, y siguiendo el diagrama de trabajo de la Figura 1:

3.1. Procesado de las muestras

Para la realización de este estudio se analizaron 28 muestras de carne, procedentes de jabalíes abatidos en la cacería autorizada en los cotos de la comarca de Oviedo (Principado de Asturias), en la temporada cinegética 2024-2025. Las piezas obtenidas tras el despiece *in situ* de los animales, se conservaron a -20 °C y fueron trasladadas en esas condiciones al Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC-USC). Allí se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta 24 h antes del procesado, momento en el que se descongelaron a una temperatura controlada de entre 2-8 °C con el fin de mantener la cadena de frío.

El procesado de todas muestras se realizó en condiciones estériles, utilizando una cabina de bioseguridad previamente acondicionada mediante radiación germicida ultravioleta durante 30 minutos, en la que se introdujo todo el material estéril necesario para la manipulación. Se pesaron 25 g de carne en condiciones estériles, recogiendo tejido de toda la superficie de la pieza, y se introdujeron en bolsas de doble filtro para Stomacher[®], junto con el jugo de las carnes liberado durante el proceso de descongelación. Seguidamente, se añadieron 225 mL de agua de peptona tamponada (APT; ApplyChem Panreac) a cada bolsa, obteniéndose una dilución 1:10. Posteriormente, las bolsas se homogeneizaron en un Stomacher[®] durante 1 min 30 s.

3.1.1 Cuantificación de *E. coli*

Tras el homogeneizado de las bolsas, se recogió 1 mL del contenido de cada una y se inoculó en una placa 3M Petrifilm[™], que fueron incubadas a 44 °C por 24h en condiciones de humedad. Tras ese tiempo, se procedió a la lectura de los Petrifilm (Figura 3).

El sistema 3M Petrifilm[™] para el recuento selectivo de *E. coli* consiste en placas con medio liofilizado que contiene agentes selectivos, nutrientes, un agente gelificante soluble en agua fría y un indicador de actividad glucuronidasa, 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucuronida (BCIG), que facilita la enumeración de colonias. La mayoría de las cepas de *E. coli* son termotolerantes y producen β -glucuronidasa, una enzima que reacciona con el

indicador BCIG para generar colonias de color verde azulado, de manera que las placas 3M Petrifilm™ se pueden usar para la cuantificación de *E. coli* en la industria alimentaria y así establecer la calidad microbiológica de las carnes analizadas en función de los recuentos obtenidos.

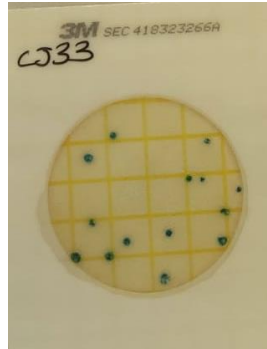


Figura 3. Resultado del 3M Petrifilm™ tras la incubación (Imagen propia).

3.1.2 Pre-enriquecimiento y enriquecimiento

Las bolsas que contenían los 25 g de carne y los 225 mL de APT, previamente homogeneizadas en el Stomacher®, se incubaron a 37 °C durante 6h. Posteriormente, se inoculó 1 mL de las muestras pre-enriquecidas a tubos de vidrio con 9 mL de Caldo MacConkey (Oxoid), que se incubaron durante 18-24 h a 37 °C para completar el proceso de enriquecimiento.

3.2 Aislamiento e identificación de enterobacterias

Las muestras enriquecidas se sembraron por agotamiento en estría en diferentes medios de cultivo selectivos y diferenciales para enterobacterias. Los medios utilizados fueron MacConkey Lactosa (ML), agar citrato de Simmons con mio-inositol (SCAi), CHROMID® ESBL y CHROMID® CARBA.

De los diferentes medios de cultivo se seleccionaron colonias aisladas que tenían aspecto compatible con *E. coli* o *K. pneumoniae* y, en caso de no obtener colonias aisladas, se realizó un reaislamiento en el mismo medio de cultivo original (el reaislamiento del medio SCAi se hizo también en ML). Las cepas aisladas se conservaron en tubos de Vacutainer™ con agar nutritivo (0,75% p/v de agar) y se mantuvieron a temperatura ambiente para su posterior identificación y caracterización.

3.2.1 Medio ML

El agar MacConkey Lactosa (Oxoid) es un medio selectivo utilizado para aislar Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram negativos, pues inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas debido a las sales biliares y cristal violeta de su formulación. Además, también diferencia entre organismos fermentadores de lactosa (lactosa+) y no fermentadores de lactosa (lactosa-). Esto se debe a que el ML contiene rojo neutro, que es un indicador de pH que vira de color en función del pH del medio, el cual depende de que las bacterias usen la lactosa o la peptona presente en el agar. De esta manera, si las bacterias fermentan la lactosa (lac+), liberarán metabolitos ácidos que bajan el pH y el indicador se vuelve de color rosa. Por otra parte, si las bacterias son lac-, utilizan peptona y se vuelven incoloras, y liberan amoníaco al medio, aumentando así el pH de este, que vira a amarillo.

Después de la inoculación, las placas se incuban a 37 °C durante 18-24h y tras ese tiempo se puede proceder a la lectura e interpretación de los resultados. Las colonias aisladas de *E. coli* suelen ser mayoritariamente redondas, de color rojo o rosa y están rodeadas por una zona de bilis precipitada que se debe a una caída de pH alrededor de la colonia debido a la fermentación de la lactosa. Por su parte, las colonias de *Klebsiella* spp. suelen ser más irregulares, rojas y mucoides (Condalab, 2022) (Figura 4).

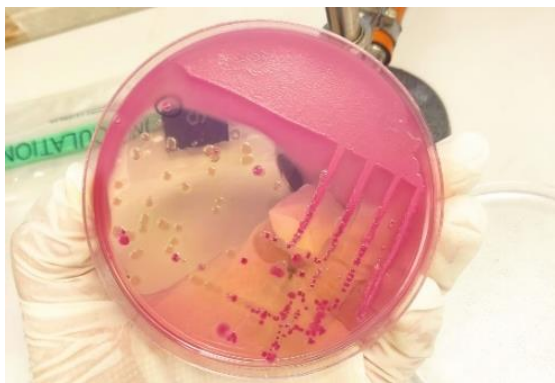


Figura 4. Placa de ML con colonias fermentadoras (rosa) y no fermentadoras (incoloras) de lactosa (Imagen propia).

3.2.2 Medio SCAi

El agar citrato de Simmons con mio-inositol al 1% (Oxoid) es un medio selectivo que se desarrolló para favorecer el crecimiento de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en cultivos fecales ricos en *E. coli*. Combina dos fuentes de carbono, que son el citrato e inositol, y son las que le permite discriminar para seleccionar las cepas de *Klebsiella* spp. También tiene un indicador de pH, el azul de bromotimol, que cambia de color en función del pH. La fermentación del inositol baja el pH debido a la producción de ácido, y el indicador de pH

azul de bromotimol se vuelve amarillo. La utilización de citrato causa una elevación del pH y el indicador se vuelve azul (Van Kregten *et al.*, 1984) (Figura 5).

Tras 24h de incubación a 44 °C, ya se pueden reconocer las colonias típicas de *Klebsiella* spp. (grandes, mucosas, en forma de cúpula y amarillas por la fermentación del inositol), pero 48h de incubación es mucho mejor para la discriminación de las colonias. Por ejemplo, las colonias de *E. coli* son diminutas y blancas porque no usan el inositol. Además, algunas colonias de *Klebsiella* spp. pueden utilizar solo el citrato y no el inositol, y su apariencia sería azul. También puede suceder que el medio se vuelva completamente amarillo cuando hay muchas colonias fermentadoras de inositol (típicamente *Klebsiella* spp.), y en esos casos la discriminación de colonias se complica, por lo que se recomienda hacer una dilución antes de reaislar en otra placa (Rodrigues, 2020).

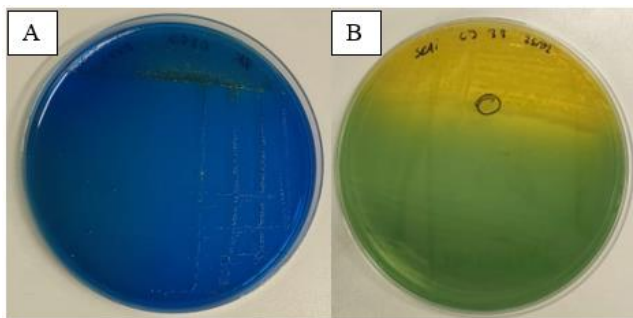


Figura 5. Placa SCAi tras la incubación: colonias que solo usan el citrato (A) y colonias que usan el citrato e inositol (B). Imagen propia.

3.2.3 Medio ESBL

El CHROMID[®] ESBL (bioMérieux) es un medio cromogénico diseñado específicamente para el cribado de enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE o ESBL en inglés). El aislamiento y la detección de enterobacterias BLEE se basa en una rica capacidad nutritiva combinada con una mezcla de antibióticos incluyendo cefpodoxima, antibiótico reconocido como el marcador de elección para este mecanismo de resistencia. Contiene dos sustratos cromogénicos y un sustrato natural que permiten la identificación directa de las enterobacterias productoras de BLEE más frecuentes tras las 18-24h de incubación a 37 °C (Figura 6):

- *Escherichia coli*: coloración rosa a burdeos de las colonias productoras de β -glucuronidasa
- *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. (KESC): coloración azul-verdosa o verde-grisáceo de las colonias productoras de β -glucosidasa

- Proteaceae (*Proteus* spp., *Providencia* spp., *Moraganella* spp.): coloración pardo a marrón de las cepas productoras de desaminasa.

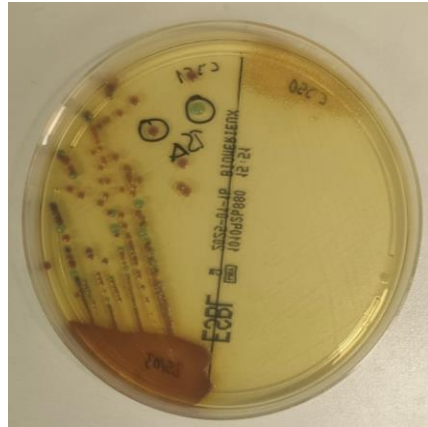


Figura 6. Placa de CHROMID® ESB (bioMérieux) con crecimiento de diferentes colonias. Imagen propia.

3.2.4 Medio CARBA

El CHROMID® CARBA (bioMérieux) es un medio cromogénico selectivo para Enterobacteriaceae productoras de Carbapenemasas (CPE). Consta de una base nutritiva rica que combina diferentes peptonas, y una mezcla de antibióticos que permite el crecimiento selectivo de CPE y tres sustratos cromogénicos que permiten la identificación de los CPE aisladas con mayor frecuencia, tras la incubación a 37 °C durante 18-24h (Figura 7):

- *Escherichia coli*: coloración espontánea (rosa a burdeos) de las cepas que producen β -glucuronidasa y/o β -galactosidasa.
- *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. (KESC): coloración espontánea azulada-verdosa a azulada-grisácea de las cepas que producen β -glucosidasa.

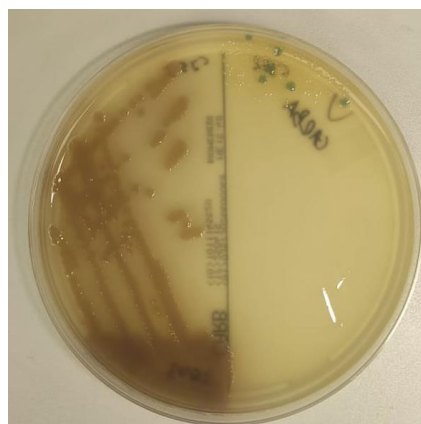


Figura 7. Placa de CHROMID® CARBA (bioMérieux) con crecimiento de diferentes colonias. Imagen propia.

3.3 Caracterización genotípica de las cepas identificadas

3.3.1 PCR convencional

3.3.1.1 Extracción del ADN

Para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se extrajo el ácido desoxirribonucleico (ADN) del crecimiento confluyente de las placas de ML o, de forma individual, sobre las colonias crecidas en medio TSA (Agar triptona de soja).

Con un asa de siembra estéril, se cogió de la siembra en TSA o del confluyente del ML y se diluyó en 600 μL de agua destilada estéril, en tubos Eppendorf. Para conseguir la lisis celular y obtener el material genético, se calentaron las suspensiones durante 5 min a 100 °C y tras atemperarse, se centrifugaron durante 2 min a 11.000 rpm. Tras este proceso, en el sobrenadante se localiza el ADN y en el pellet el resto de los componentes celulares.

3.3.1.2 Preparación de la mezcla de reacción

Para la mezcla de reacción se utilizó el reactivo NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech), que contiene MgCl_2 , dNTPs, tampón de reacción y NZYTaQ II ADN polimerasa (MB354) en concentraciones óptimas.

La mezcla de reacción se realizó añadiendo 12,5 μL de NZYTaQ II 2x Green Master Mix (NZYTech), los *primers* (específicos para la región diana del ADN, y cuya concentración está optimizada para cada PCR) y agua destilada autoclavada, cuyo volumen se ajustó en función de la concentración y número de *primers* hasta un volumen de 20 μL . Posteriormente se añadieron 5 μL del sobrenadante que contenía el ADN, obteniendo un volumen final de 25 μL .

3.3.1.3 Amplificación del ADN

La amplificación se realizó en termocicladores Veriti 96 Well Thermal Cycle (Applied Biosystems) siguiendo el programa de la Figura 8, que incluye las siguientes fases:

- Desnaturalización inicial (94 °C durante 3 min)
- 35 ciclos:
 - Desnaturalización (94 °C durante 1 min)
 - Unión de la polimerasa (T^a de hibridación durante 1 min)
 - Elongación (72 °C durante 1 min 30 s)
- Elongación final (72 °C durante 3 min)

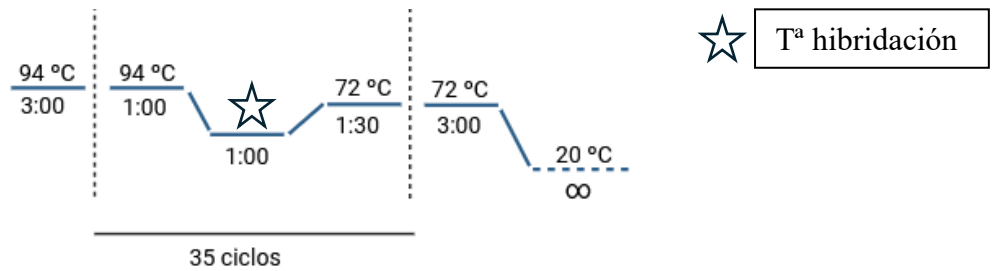


Figura 8. Programa general de amplificación de PCR (creado con BioRender.com).

3.3.1.4 Revelado y lectura de resultados

Una vez amplificado el fragmento de ADN en el termociclador, se procede al revelado de los resultados. Para ello, hay que preparar un gel de agarosa (al 1,5% o al 3% dependiendo del tipo de PCR realizada) (Agarose D1 LE, iNtEoN Biotechnology) al que se le añade 3 μ L de Green Safe Premium (Nzytech) por cada 100 mL de gel, que se utiliza para detectar ácidos nucleicos en gel de agarosa. Para ello se cargan 10 μ L de muestra amplificada en cada pocillo, añadiendo controles positivos en los extremos y un control negativo, en cubetas Bio-Rad que contienen tampón TAE (1,6 M Tris, 0,8 M acetato sódico, 0,025 M EDTA). A continuación se realiza la electroforesis aplicando un voltaje de 120V, 400A, durante 20-40 min, dependiendo del tamaño y concentración del gel. Los resultados se visualizaron en un equipo Gel Doc XR de Bio-Rad, con luz ultravioleta.

De acuerdo con este procedimiento, se realizaron las PCR que se detallan a continuación, con los *primers* y condiciones descritas en publicaciones previas (Díaz-Jimenez *et al.*, 2020; García *et al.*, 2022 y la tesis doctoral de Díaz-Jiménez (2021)):

- Identificación de las **verotoxinas 1 y 2** (genes *stx1/stx2*) asociadas al patotipo VTEC.
- Identificación de los **genes *eae* y *bfp*** asociados al patotipo EPEC, que codifican para una proteína de membrana (intimina) y para un factor de adhesión (pili sexual) respectivamente.
- Detección de los **genes de virulencia** asociados al estatus ExPEC *iutA* (codifica para un sideróforo), *kpsM II* (codifica para una cápsula) y *papAH* (codifica para una subunidad de una fimbria adhesiva).
- Determinación del antígeno somático O25b de *E. coli* asociado al clon de alto riesgo pandémico ST131, por medio de la detección del **gen *rfbO25b***.
- Detección por PCR múltiple de los **genes *mcr 1-5*** que confieren resistencia a la colistina.

- Confirmación de *K. pneumoniae* mediante la amplificación del **gen *kp50233***, marcador específico de la especie que codifica para una aciltransferasa, empleando los *primers* descritos por Bialek-Davenet *et al.* (2014).
- Detección del **gen *uidA***, para la confirmación de *E. coli*, pues es un marcador específico de esta especie, que codifica para una β-glucuronidasa.
- Establecimiento del **grupo filogenético (GF)** de *E. coli* mediante una PCR cuádruple descrita por Clermont *et al.* (2013; 2019), interpretada siguiendo el esquema mostrado en la Figura 9.

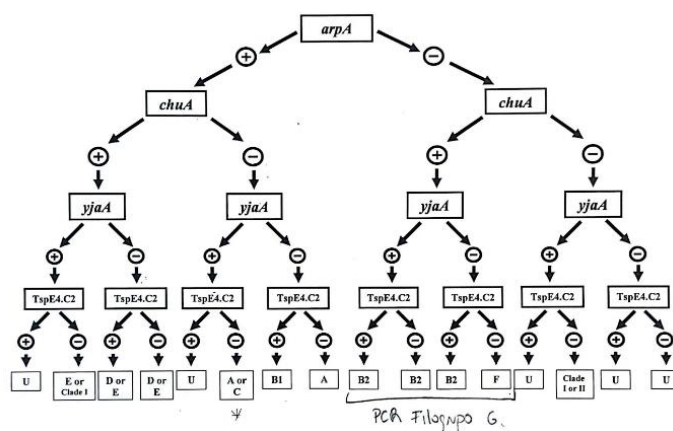


Figura 9. Grupos filogenéticos en base al esquema ampliado de Clermont *et al.* (2013).

- Determinación y tipificación de los **genes de resistencia *bla*_{BLEE/AmpC}** de las colonias que crecieron en el medio CHROMID[®] ESBL (CIT, SHV, CTX-M). También se realizó mediante PCR convencional la diferenciación de CTX-M-G1 y CTX-M-G9.

3.3.2 Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger o secuenciación de fragmentos cortos es una técnica empleada para determinar la secuencia de nucleótidos en una región específica del ADN. En este método, el ADN amplificado (amplicón) obtenido por PCR convencional se une a un *primer* oligonucleótido y después la ADN polimerasa incorpora dideoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs), los cuales tienen un marcador fluorescente diferente en función de su base nitrogenada, y al incorporarse detienen la elongación dando lugar a fragmentos de ADN distinguibles de distintas longitudes. Estos fragmentos se separan por tamaño mediante electroforesis capilar y un lector láser detecta el marcador fluorescente del ddNTP en cada fragmento, lo que permite reconstruir la secuencia original del ADN (Crossley *et al.*, 2020).

3.3.2.1 Preparación de las muestras

Debido a que la secuenciación Sanger requiere mucha más precisión a la hora de trabajar para amplificar bien las secuencias, la extracción del material genético se realizó utilizando 500 µL de agua MiliQ (Sigma®), con puntas de filtro y la mezcla de reacción se preparó de diferente manera. Esta PCR se hace a volumen final 50 µL (49 µL de mezcla y 1 µL de ADN), compuesta por: 10 µL de 5x My Taq™ Reaction Buffer (Bioline), que incluye los dNTPs y el MgCl₂, 37,8 µL de agua MiliQ, 0,2 µL de MyTaq™ DNA polymerase (Bioline) y los *primers* correspondientes según la PCR a realizar, descritos en publicaciones previas (Díaz-Jiménez *et al.*, 2020; García *et al.*, 2022 y la tesis doctoral de Díaz-Jiménez (2021)).

Una vez se amplificaron las secuencias en los termocicladores con el programa adecuado a la PCR a realizar, y debido a que esta mezcla es incolora, se añadieron 2 µL de un tampón de carga en una placa de 96 pocillos, que confiere peso y color al producto de PCR, y se mezclaron con 5 µL de muestra amplificada. Esta mezcla se cargó en el gel para poder visualizar los fragmentos mediante el lector de imágenes Gel Doc XR de Bio-Rad. Se comprobó que el control negativo y las muestras amplificadas estuviesen correctas, y se enviaron a la Plataforma de Secuenciación y Genómica Funcional (Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria, Campus Terra), donde se realizó la secuenciación Sanger de las muestras que resultaron positivas.

3.3.2.2 Análisis *in silico* de las secuencias

Las secuencias (en formato abi) se transformaron a formato fasta (con *Tab to Fasta Sequence Converter*, de bugaco.com) para su análisis *in silico*. Para ello se utilizó la plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (CGE), concretamente las herramientas *ResFinder 4.7.2*, *KmerResistance 2.2* (para identificar los genes de resistencia *bla_{CTX-M}* y *bla_{CTI}*) y *FimTyper 1.0* y *CHTyper 1.0* (para determinar el clonotipo). También se utilizó la aplicación *BioEdit sequence alignment editor* para ver las secuencias y corregirlas manualmente en caso de no obtener resultados concluyentes en CGE.

De acuerdo con este procedimiento se secuenciaron:

- Los genes *bla_{CTX-M}* para determinar el tipo de CTX-M (previamente se hizo una PCR convencional para discriminar CTX-M-G1 y CTX-M-G9).
- Los genes *fimH* y *fumC* para definir el clonotipo (CH), que es un esquema de tipificación rápida de secuencias para *E. coli*, de acuerdo con el esquema de Weissman *et al.* (2012).

3.4 Caracterización fenotípica de RAM

Para la caracterización fenotípica de la resistencia antimicrobiana se siguió el método de difusión disco-placa descrito en el EUCAST (2025a). Para cada cepa se usaron 3 placas Petri con 25 mL/placa de medio Mueller-Hinton (MH; Oxoid), medio estándar para pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Se seleccionaron las cepas de *Klebsiella pneumoniae* confirmadas por la PCR *kp50233* y también una cepa representativa de *E. coli* (confirmada por la PCR *uidA*) de cada muestra de carne analizada, priorizando en ambas especies aquellas cepas que tuviesen algún gen de interés codificador de enzimas BLEE o genes de virulencia (genes *bla_{BLEE}* para ambas especies o genes *eae*, *iutA* y *kpsM II* para *E. coli*).

3.4.1 Preparación del inóculo

Siguiendo el método de suspensión directa de colonias, se coge de la siembra de colonias en el medio de cultivo TSA (18-24h; 37 °C) el crecimiento equivalente a 3-5 colonias y se resuspende en 4,5 mL de solución salina estéril (ID PhoenixTM BD). Finalmente, con ayuda de un nefelómetro, se ajusta el inóculo a una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala McFarland ($1,5 \times 10^8$ bacterias/mL).

3.4.2 Inoculación de las placas

Una vez ajustada la turbidez del inóculo, se introduce un hisopo en la suspensión y al retirarlo se rota contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo. Posteriormente, se realiza una siembra superficial en césped por toda la placa de MH, en todas las direcciones para que se cubra toda la superficie, y se deja durante 5-15 min la placa boca arriba y con la tapa cerrada para que el medio absorba el inóculo.

3.4.3 Colocación de los discos de antibióticos

Pasado el tiempo, se dispensan los discos de antibióticos en las placas de MH con ayuda de los dispensadores automáticos Sensi-DiscTM Dispenser II (BBLTM), y para asegurarse del contacto de los discos con la superficie del agar se presionan ligeramente con una pinza. Una vez colocados los discos, se deja difundir el antibiótico con la placa en la misma posición que el paso anterior, y pasados 5-15 min se incuban las placas a 37 °C durante 18 ± 2 h.

3.4.4 Lectura e interpretación de los resultados

Tras la incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición (en mm) y se realizó la interpretación de los resultados obtenidos de acuerdo con los puntos de corte del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2025* (EUCAST 2025b) o del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) cuando no había un valor establecido en el EUCAST, que permiten determinar si la cepa es Resistente (R), Intermedia (I) o Sensible (S) a un antibiótico determinado.

Los antibióticos empleados en este estudio se seleccionaron desde un punto de vista clínico y epidemiológico, y pertenecen a las siguientes familias (Tabla 2):

- **Anfenicoles:** cloranfenicol.
- **Aminoglucósidos:** amikacina, gentamicina y tobramicina.
- **β -lactámicos:** penicilinas (ampicilina), penicilinas + inhibidores de β -lactamasas (amoxicilina-ácido clavulánico), cefalosporinas de 1^a (cefazolina), 2^a (cefuroxima) y 3^a generación (cefotaxima y ceftazidima), monobactámicos (aztreonam), carbapenémicos (ertapenem) y cefamicinas (cefoxitina).
- **Diaminopirimidinas + Sulfonamidas:** trimetoprim + sulfametoxazol (cotrimoxazol).
- **Fosfomicinas:** fosfomicina.
- **Gliciliclinas:** tigeciclina.
- **Nitrofuranos:** nitrofurantoína.
- **Polimixinas:** colistina.
- **Quinolonas:** de 1^a generación (ácido nalidíxico) y fluoroquinolonas (ciprofloxacina).
- **Tetraciclinas:** doxiciclina.

Tabla 2. Antibióticos empleados e interpretación de sus halos de inhibición según los puntos de corte establecidos por EUCAST-2025 y CLSI-2024.

Antimicrobiano	Disco (μg)	CLSI-2024			EUCAST-2025	
		R	I	S	R	S
Aztreonam	ATM30	≤ 17	18-20	≥ 21	< 21	≥ 26
Amoxicilina-ácido clavulánico	AMC30	≤ 13	14-17	≥ 18	< 19	≥ 19
Ceftazidima	CAZ10	≤ 17	18-20	≥ 21	< 19	≥ 22
Ampicilina	AM10	≤ 13	14-16	≥ 17	< 14	≥ 14
Cefuroxima	CXM30	≤ 14	15-22	≥ 23	< 19	≥ 19
Tigeciclina	TGC15				< 18	≥ 18
Cefotaxima	CTX5	≤ 22	23-25	≥ 26	< 17	≥ 20
Ertapenem	ETP10	≤ 18	19-21	≥ 22	< 23	≥ 23
Cefoxitina	FOX30	≤ 14	15-17	≥ 18	< 19	≥ 19
Amikacina	AN30	≤ 16	17-19	≥ 20	< 18	≥ 18
Gentamicina	GM10	≤ 14	15-17	≥ 18	< 17	≥ 17
Tobramicina	NN10	≤ 12	13-16	≥ 17	< 16	≥ 16
Colistina	CL10	≤ 10		≥ 11		
Doxiciclina	D30	≤ 10	11-13	≥ 14		
Fosfomicina	FOS200	≤ 12	13-15	≥ 16	< 24	≥ 24
Cloranfenicol	C30	≤ 12	13-17	≥ 18	< 17	
Nitrofurantoína	FM100	≤ 14	15-16	≥ 17	< 11	≥ 11
Ciprofloxacina	CIP5	≤ 21	22-25	≥ 26	< 22	≥ 25
Trimetoprim-sulfametoxazol	SXT25	≤ 10	11-15	≥ 16	< 11	≥ 14
Ácido nalidíxico	NAL30	≤ 13	14-18	≥ 19		

Los cuadros grises indican ausencia de punto de corte para el estándar indicado.

3.5 Análisis estadístico

Para evaluar el grado de asociación estadística a la hora de comparar distintas variables entre estudios, se utilizó el test exacto de Fisher. Se consideraron significativos aquellos valores de P inferiores a 0,05 ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se detallan los resultados obtenidos, los cuales hemos comparado con otros estudios realizados en el LREC-USC sobre carne de jabalí destinada a autoconsumo (Gallego Arias, 2024), carne de jabalí procedente de salas de despiece (Rey Souto, 2025), y microbiota de jabalíes abatidos en programas oficiales de control poblacional en el mismo área sanitaria entre 2023 y 2025 (Polo Cano, 2024; Vázquez Ojea, 2025). Además, se discutieron también con otros trabajos de la literatura científica.

4.1 Valoración del riesgo microbiológico de las carnes basada en los recuentos de *E. coli*

Para establecer la calidad microbiológica de las carnes analizadas se utilizó el sistema 3M Petrifilm™ (SEC) para realizar el recuento de colonias de *E. coli* en la carne de jabalí, que es el indicador de referencia para alimentos, recogido en el Reglamento (CE) n° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. En él no hay un apartado específico para la carne de caza, por lo que hemos tomado los criterios de seguridad alimentaria respecto a *E. coli* para la categoría de alimento **2.1.8 Preparados de carne:**

- Satisfactorio si el recuento de colonias de *E. coli* ≤ 500 UFC/g
- Aceptable si el recuento de colonias de *E. coli* está entre 500 y 5000 UFC/g
- Insatisfactorio si el recuento de colonias de *E. coli* > 5000 UFC/g

Teniendo en cuenta estos criterios, solo el 28,6 % de las muestras de carne analizadas presentó una calidad microbiológica satisfactoria (≤ 500 UFC/g), mientras que la mayoría de las muestras mostraron una calidad insatisfactoria (42,9 %) o aceptable (28,6 %) (Figura 10).

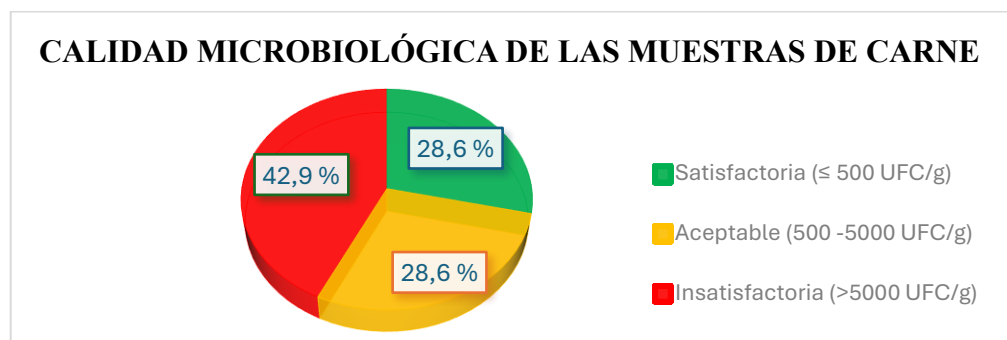


Figura 10. Calidad microbiológica respecto a *E. coli* de las muestras de carne de jabalí conforme al Reglamento (CE) n° 2073/2005 (UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo).

Aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($P=0,092$), los resultados del presente estudio (con un 42,9 % de muestras clasificadas como

insatisfactorias) evidencian una peor calidad microbiológica en la carne de jabalí analizada en comparación con los obtenidos en un trabajo previo sobre el mismo tema, en el que el 20,7 % de las muestras presentaron una calidad microbiológica insatisfactoria (Gallego Arias, 2024). Por el contrario, en un trabajo paralelo, centrado en carne de jabalí procedente de salas de despiece (Rey Souto, 2025), la totalidad de las muestras analizadas (23/23; 100%) presentaron una calidad microbiológica insatisfactoria, con diferencias estadísticamente significativas frente a los datos obtenidos en este trabajo ($P < 0,0001$).

Además del recuento de *E. coli*, para evaluar el riesgo microbiológico de las muestras de carne analizadas, también se consideraron otros parámetros que pudiesen suponer un riesgo para el consumidor (aislamientos de *E. coli* productora de BLEE, aislamientos de *K. pneumoniae* y detección de genes de virulencia) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultado del análisis del riesgo de las muestras de carne basado en: recuentos de *E. coli* e interpretación según el Reglamento (CE) nº 2073/2005, aislamiento de *K. pneumoniae*, aislamiento de *E. coli* o *K. pneumoniae* portadoras de genes *bla*_{BLEE}, detección de genes de virulencia de *E. coli*.

Código de Muestra ¹	Recuento <i>E. coli</i> (UFC/g)	Calidad microbiológica	Aislamiento <i>Klebisella pneumoniae</i>	Aislamiento <i>E. coli</i> BLEE	Cepas MDR	Genes de virulencia intestinales ²	Genes de virulencia extraintestinales ²	Nº riesgos/ Muestra
CJ30	40	Satisfactoria	NO	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	2
CJ31	10	Satisfactoria	NO	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	2
CJ32	2000	Aceptable	NO	NO	NO	-	<i>kpsMII</i>	1
CJ33	140	Satisfactoria	NO	NO	SI	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII, papAH</i>	3
CJ34	620	Aceptable	NO	NO	NO	-	<i>kpsMII</i>	1
CJ35	3330	Aceptable	SI	NO	NO	-	<i>kpsMII</i>	2
CJ36	790	Aceptable	SI	SI	SI	-	<i>kpsMII</i>	4
CJ37	90	Satisfactoria	SI	SI	SI	<i>eae</i>	<i>kpsMII</i>	5
CJ38	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	NO	-	<i>kpsMII</i>	3
CJ39	<10	Satisfactoria	NO	NO	NO	<i>eae</i>	<i>kpsMII</i>	2
CJ40	370	Satisfactoria	SI	SI	SI	-	<i>iutA, kpsMII</i>	4
CJ41	540	Aceptable	SI	NO	NO	-	<i>iutA, kpsMII</i>	2
CJ42	900	Aceptable	SI	SI	SI	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII, O25b</i>	5
CJ43	21	Satisfactoria	SI	NO	NO	<i>eae, bfp</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	3
CJ44	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	SI	SI	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	6
CJ45	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	NO	<i>eae, bfp</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	4
CJ46	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII, papAH</i>	4
CJ47	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	4
CJ48	~10 ⁸	Insatisfactoria	NO	SI	SI	-	<i>iutA, kpsMII</i>	4
CJ49	~10 ⁸	Insatisfactoria	NO	NO	NO	-	<i>iutA, kpsMII</i>	2
CJ50	2250	Aceptable	SI	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	3
CJ51*	190	Satisfactoria	SI*	SI	SI	-	<i>iutA, kpsMII</i>	4

CJ52	~10 ⁸	Insatisfactoria	NO	NO	NO	<i>eae, bfp</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	3
CJ53	3800	Aceptable	NO	SI	SI	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	4
CJ54	~10 ⁸	Insatisfactoria	NO	SI	SI	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII, papAH</i>	5
CJ55	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII, papAH</i>	4
CJ56	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	SI	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	5
CJ57	~10 ⁸	Insatisfactoria	SI	NO	NO	<i>eae</i>	<i>iutA, kpsMII</i>	4

¹En la misma muestra (CJ51) se aislaron cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* productoras de BLEE (*); ²Resultado de la PCR sobre el crecimiento confluyente en MacConkey Lactosa para la presencia de genes de virulencia intestinales y extraintestinales de *E. coli*, respectivamente.

Cabe destacar que todas las muestras, incluidas las que cumplieron el criterio microbiológico de “Satisfactoria” (≤ 500 UFC/g), presentaron algún nivel de riesgo (entre 2 y 5) (Tabla 3). Es especialmente relevante señalar que, de las ocho muestras clasificadas como “Satisfactorias”, en tres se aislaron cepas productoras de BLEE. En una de ellas, se detectaron además dos especies distintas de Enterobacteriaceae productoras de BLEE: *K. pneumoniae* y *E. coli*.

La detección de colonias de *K. pneumoniae* en las carnes analizadas, así como la presencia de factores de virulencia (*eae, bfp, iutA, kpsMII, papAH*) y del antígeno somático O25b asociados a *E. coli*, representan una amenaza para el consumidor ya que, si la carne de caza no se cocina adecuadamente, las bacterias patógenas pueden sobrevivir y causar enfermedades o propagar genes de virulencia a los consumidores (Siddi *et al.*, 2024). Asimismo, la presencia de colonias productoras de BLEE supone un riesgo adicional, ya que su resistencia a los antibióticos β -lactámicos puede dificultar el tratamiento de las infecciones.

De este modo, los resultados obtenidos muestran que, aunque la calidad microbiológica de las carnes no se considere insatisfactoria, la detección de microorganismos patógenos, BLEE y genes de virulencia implica un riesgo microbiológico elevado, lo que subraya la necesidad de complementar los controles convencionales con análisis más específicos para garantizar la seguridad alimentaria.

4.2 Aislamiento e identificación de Enterobacteriaceae

4.2.1 Recuperación de Enterobacteriaceae

Las muestras enriquecidas se sembraron por agotamiento en estría en diferentes medios de cultivo para aislar e identificar fenotípicamente colonias de Enterobacteriaceae.

De las 28 muestras analizadas, todas ellas presentaron crecimiento en ML (100%) compatible con *E. coli*, que en la mayoría de los casos se caracteriza por una coloración rosa característica de bacterias que fermentan la lactosa.

Utilizando el medio SCAi, 22 muestras (78,6 %) presentaron crecimiento con coloración amarillenta, presuntamente compatible con *Klebsiella* spp. ya que las bacterias pertenecientes a este género suelen fermentar el inositol presente en este agar, lo que provoca un viraje de color del indicador a amarillo.

Por otra parte, 9 muestras (32,1 %) mostraron crecimiento en el medio cromogénico CHROMID® ESBL, selectivo de colonias productoras de BLEE, con colonias fenotípicamente compatibles con *E. coli* por su coloración burdeos. Este porcentaje es superior al 10,3 % obtenido en el trabajo de Gallego Arias (2024) para el mismo tipo de carnes, así como al 13 % observado en el trabajo sobre carne procedente de salas de despiece (Rey Souto, 2025). No obstante, estas diferencias no resultan estadísticamente significativas ($P=0,0563$ y $P=0,1843$, respectivamente). Asimismo, en el estudio de García *et al.* (2022) donde se analizaron muestras fecales de cerdos de granjas, el 21,7 % de los aislamientos de *E. coli* eran productores de BLEE, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($P=0,3183$). Por el contrario, las diferencias encontradas con los estudios sobre la microbiota de los jabalíes sí son estadísticamente significativas (2,5 % y 9,1 %; Polo Cano, 2024; Vázquez Ojea, 2025) con valores $P<0,0001$ y $P=0,0494$, respectivamente (Tabla 4). Además, en una de las nueve muestras que presentaban colonias compatibles con *E. coli*, se observó también una colonia con tonalidad verde-azulada compatible con *Klebsiella* spp.

Tabla 4. Comparación de prevalencia de BLEE en *E. coli* entre la carne y las heces de jabalíes muestreados en la misma área geográfica.

Estudio	Nº muestras	Nº BLEE	% BLEE
Jabalí heces (2024-25)	33	3	9,1
Jabalí heces (2023-24)	81	2	2,5
Jabalí carne autoconsumo (2024)	29	3	10,3
Jabalí carne autoconsumo (2025)	28	9	32,1
Jabalí carne sala de despiece (2025)	23	3	13

(BLEE= β -lactamasas de espectro extendido)

En cuanto al CHROMID® CARBA, el otro medio cromogénico utilizado en este estudio, selectivo para el crecimiento de CPE, se detectó crecimiento en una muestra (3,6 %) con una colonia de coloración azulada, presuntamente indicativa de *Klebsiella* spp.

Finalmente, las colonias aisladas se identificaron mediante una técnica de biología molecular, la PCR.

Las colonias que presentaban crecimiento compatible con *E. coli* en los medios ML y CHROMID® ESBL fueron sometidas a la PCR del gen *uidA* (Figura 11A), marcador que codifica para una β -glucuronidasa específica de esta especie, obteniéndose un resultado positivo en todos los casos.

Por otra parte, con el objetivo de confirmar que las colonias con morfología compatible con *Klebsiella* spp. recuperadas de los medios SCAi, CHROMID® ESBL y CHROMID® CARBA correspondían a la especie *K. pneumoniae*, se realizó la amplificación del gen *kp50233* (Figura 11B), que codifica para una aciltransferasa específica de dicha especie. En 17 de las muestras analizadas (60,7 %) se obtuvieron colonias positivas para dicho marcador, en una de ellas con crecimiento en el medio CHROMID® ESBL y el medio SCAi, mientras que la colonia crecida en el medio CHROMID® CARBA resultó negativa. Estos resultados son inferiores a los obtenidos por Rey Souto (2025) en carnes procedentes de salas de despiece (91,3 %), pero superiores a los detectados en el estudio de la carne destinada al autoconsumo de Gallego Arias (2024) con una prevalencia del 27,6 %, y en el estudio de la microbiota del jabalí (Vázquez Ojea, 2025), donde se recuperaron *K. pneumoniae* en el 12,1 % de las muestras. Las diferencias observadas, son estadísticamente significativas en los tres casos ($P=0,0220$; $P=0,0167$; y $P=0,0001$).

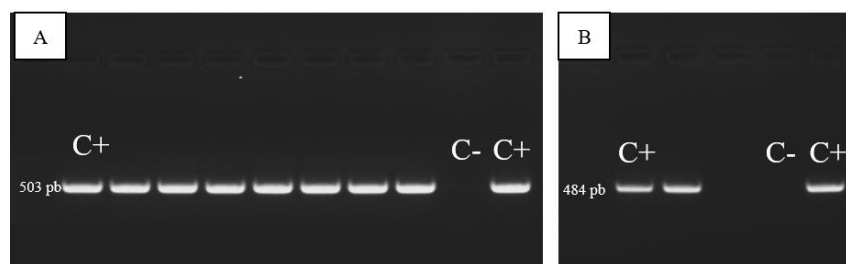


Figura 11. Gel de electroforesis correspondiente a la PCR del gen *uidA* (A) específico de *E. coli*, con todas las cepas positivas, y el gen *kp50233* (B) específico de *K. pneumoniae*, con una cepa positiva y otra negativa (C+: control positivo; C-: control negativo).

4.2.2 Recuperación de cepas potencialmente zoonóticas

Sobre el crecimiento en confluentes de las placas de ML se realizaron varias PCR dirigidas a la detección de los genes asociados a los patotipos VTEC, EPEC, ExPEC y el

antígeno somático O25b. Se obtuvieron resultados positivos para el gen *kpsM II* en la totalidad de las muestras analizadas (100 %), y para el gen *iutA* en 21 de las 28 muestras (75 %). Asimismo, el gen *eae* se detectó en 18 muestras (64,3 %), *papAH* en 4 (14,3 %), *bfp* en 3 (10,7 %) y *rfbO25b* en una única muestra (3,6 %). Solo 5 de las 28 carnes analizadas resultaron positivas para un único gen (todas ellas positivas para *kpsM II*), mientras que el resto presentaron al menos 2 de los genes citados anteriormente. Por otra parte, la PCR fue negativa para los genes *mcr 1-5*, que confieren resistencia a la colistina, así como para los genes *stx1* y *stx2* que codifican para las verotoxinas asociadas al patotipo VTEC (Tabla 3).

Con el objetivo de recuperar colonias individuales portadoras de los genes detectados previamente en el crecimiento en confluente de ML, se realizó una PCR a partir de colonias aisladas. De esta manera, se obtuvieron colonias positivas en 19 muestras para el gen *kpsM II*, en 14 muestras para *iutA*, en 3 para *eae* y en una muestra para *papAH*.

Los factores de virulencia *iutA*, *kpsM II* y *papAH* codifican, respectivamente, para un sideróforo, una subunidad de la cápsula y una fimbria adhesiva. Estos genes forman parte del esquema propuesto para determinar si una cepa de *E. coli* puede considerarse patógeno extraintestinal (estatus ExPEC) (Johnson *et al.*, 2003). Todos ellos contribuyen a la capacidad de la bacteria para invadir y colonizar el epitelio, pudiendo desencadenar infecciones extraintestinales como las del tracto urinario (Whelan *et al.*, 2023). En este estudio se identificaron 2 colonias con estatus ExPEC, ya que presentaban al menos dos de estos genes (Johnson *et al.*, 2003), una de ellas tenía *papAH* e *iutA*, y la otra *iutA* y *kpsMII*. En contraste, el estudio de Gallego Arias (2024) identificó una colonia ExPEC (*papAH*, *kpsMII*) y asociada al clon pandémico ST131, lo que indica una mayor relevancia clínica y potencial patógeno.

El gen *eae* codifica para la proteína intimina, que facilita la adherencia de la bacteria a la superficie de la mucosa intestinal de los mamíferos, y está asociado al patotipo EPEC, responsable de cuadros de diarreas persistentes. Las cepas típicas de EPEC (tEPEC) poseen un plásmido denominado factor de adhesión a EPEC, que porta el gen *bfp* (del inglés *bundle-forming pili*) que codifica para un pili involucrado en la unión a las células epiteliales (Riley, 2020), mientras que las cepas EPEC atípicas (aEPEC) carecen del gen *bfp*. Las cepas tEPEC se han descrito principalmente en humanos y es raro encontrarlas en animales, mientras que aEPEC se ha aislado tanto en humanos como en una amplia variedad de animales (Mora *et al.*, 2018). Todas las colonias EPEC detectadas en este estudio (3 cepas) fueron clasificadas

como aEPEC, resultados similares a los obtenidos por Martins *et al.* (2016) en su estudio, donde analizaron muestras fecales de cordero y obtuvieron 25 aislamientos EPEC, todos ellos considerados aEPEC por carecer del gen *bfp*. No obstante, el estudio realizado por Gallego Arias (2024) en carnes de autoconsumo de jabalí, detectó una colonia tEPEC, con los genes *eae* y *bfp*.

4.3 Determinación de RAM

Tras obtener la colección de colonias recuperadas de las muestras de carne analizadas, se procedió al análisis de RAM de dichas colonias. Para ello, se determinó la resistencia a antimicrobianos tanto genotípicamente como fenotípicamente.

4.3.1 Determinación genotípica de RAM

Las 10 colonias recuperadas del medio CHROMID® ESBL, correspondientes a 9 *E. coli* y una *K. pneumoniae*, fueron analizadas mediante PCR para la detección de los genes *bla_{BLEE/AmpC}* (CIT, SHV, CTX-M). Los resultados mostraron que la colonia de *K. pneumoniae* presentaba los genes SHV y CTX-M (del grupo 1), mientras que las colonias de *E. coli* tenían genes CIT (en 3 de las 9 colonias) y genes CTX-M en 7 colonias (5 del grupo 1 y 2 del grupo 9). Además, una de las colonias presentaba simultáneamente los genes CIT y CTX-M del grupo 1.

Las colonias de *E. coli* productoras de BLEE fueron tipificadas mediante secuenciación Sanger, y analizadas con las herramientas *ResFinder 4.5* y *KmerResistance 2.2* del CGE para identificar los alelos específicos de los genes de resistencia. Las colonias que portaban el gen CIT se tipificaron como CMY-2 (33,3 %) y las colonias positivas para el gen CTX-M (77,7 %) como CTX-M-15 (44,4 %), CTX-M-65 (11,1 %), CTX-M-9 (11,1 %) y CTX-M-1 (11,1 %). La colonia de *K. pneumoniae* se tipificó como CTX-M-15.

La detección del gen SHV en la colonia de *K. pneumoniae* se considera un resultado esperado, ya que SHV-1 está presente en el cromosoma de esta especie, haciéndola intrínsecamente resistente a la ampicilina (Wyres & Holt, 2018). También se aislaron colonias de *E. coli* con CMY-2, la variante plasmídica predominante de AmpC descrita en todo el mundo en *E. coli*, presente en humanos, animales destinados a la producción de alimentos, productos cárnicos y animales de compañía (Pietsch *et al.*, 2018).

El tipo de BLEE predominante en las colonias analizadas fue CTX-M, siendo CTX-M-15 el grupo mayoritario. Esta enzima es la más común en colonias de *E. coli* productora de BLEE en humanos y se encuentra tanto en entornos hospitalarios como comunitarios (Diab *et al.*, 2016). En menor proporción (11, 1%) también se identificaron CTX-M-1, frecuente en enterobacterias de animales destinados a la producción de alimentos en la UE (Silva *et al.*, 2019); CTX-M-9, prevalente en *E. coli* comensal y patógena de origen humano y animal en España (Riaño *et al.*, 2009); y CTX-M-65, del grupo CTX-M-9 con distribución global y descrita en aislados de *E. coli* procedentes tanto de seres humanos como de animales de producción (Leão *et al.*, 2021).

Estos resultados coinciden parcialmente con los hallazgos de Gallego Arias (2024), quien recuperó de carne de jabalí destinada al autoconsumo 3 colonias BLEE, de las cuales 2 (66, 6%) fueron también *bla*_{CTX-M-15}, mientras que la otra (33,3 %) fue *bla*_{CTX-M-27}. Asimismo, en los estudios sobre las muestras de heces de jabalí se recuperaron 2 colonias BLEE caracterizadas como CTX-M-32 y CTX-M-14 (Polo Cano, 2024), tipos no identificados en el presente trabajo. Sin embargo, Vázquez Ojea (2025) recuperó 3 colonias BLEE, todas CTX-M-1, tipo detectado en este estudio aunque en menor proporción.

4.4.2 Determinación fenotípica de RAM

El estudio de los perfiles de resistencia mediante antibiogramas conforme al método de difusión disco-placa (Figura 12) se realizó para 28 colonias de *E. coli* (se seleccionaron las 9 colonias con genes BLEE; 4 colonias potencialmente zoonóticas: 3 de ellas con genes *eae* y la otra con genes *iutA* y *papAH*; y una colonia representativa de las 15 muestras restantes) y también se realizó para las 17 colonias que fueron confirmadas como *K. pneumoniae* mediante la PCR de *kp50233* (una de ellas BLEE).

Una vez estudiada la resistencia individual para cada uno de los antibióticos, se definieron las cepas multirresistentes (MDR, del inglés *multidrug-resistance*) de acuerdo al criterio propuesto por Magiorakos *et al.* (2012), que establece que una colonia es multirresistente cuando muestra resistencia a al menos un agente antimicrobiano en tres o más familias diferentes de antibióticos.

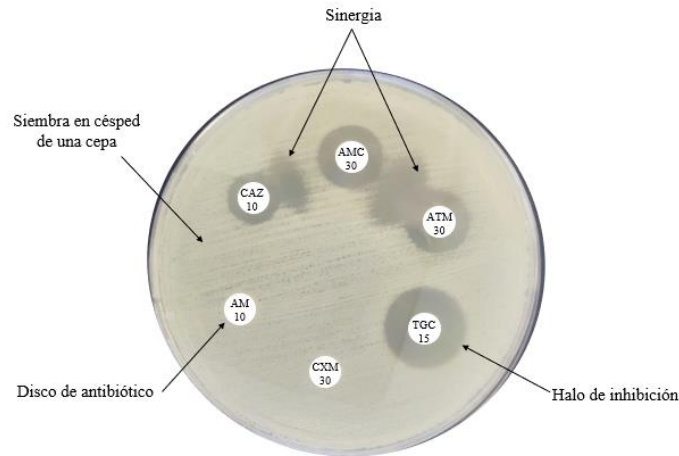


Figura 12. Antibiograma realizado según el método de difusión disco-placa en medio MH. Cada disco indica el antibiótico y su cantidad en μg (CAZ: ceftazidima; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; ATM: aztreonam; TGC: tigeciclina; CXM: cefuroxima; AM: ampicilina). Imagen propia.

4.4.2.1 Cepas *E. coli*

De las 28 colonias de *E. coli* incluidas en el estudio de RAM, todas fueron sensibles a ertapenem, amikacina, tigeciclina, nitrofurantoína y colistina, mientras que 16 de ellas mostraron resistencia a al menos un antibiótico (57,1 %). La mayor resistencia se observó frente a antibióticos pertenecientes a la familia de los β -lactámicos, especialmente a las penicilinas (ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico) seguido de las cefalosporinas (cefuroxima, cefotaxima) como se observa en la Figura 13.

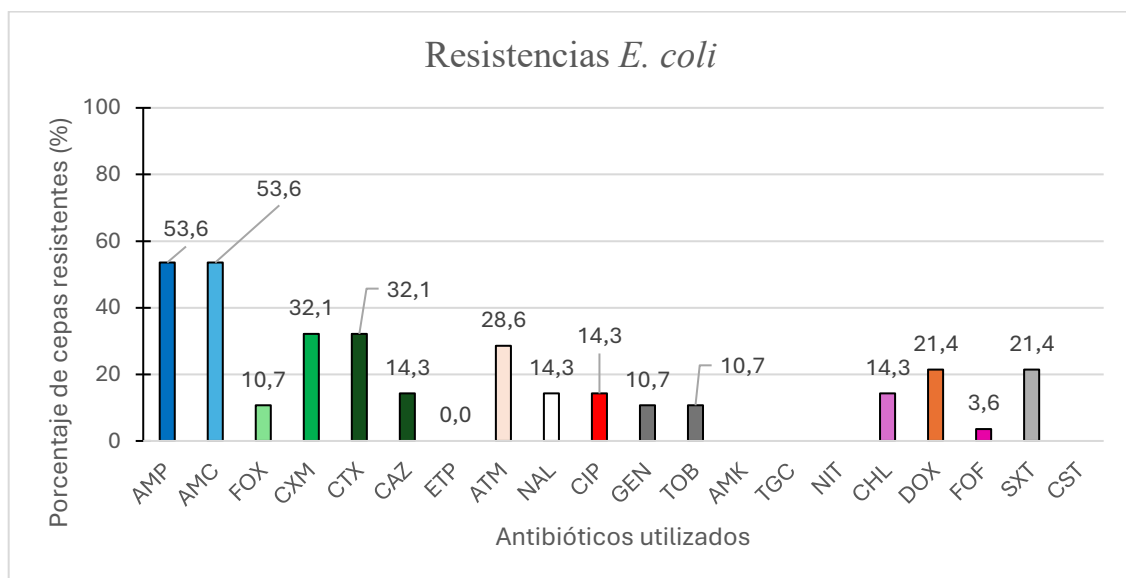


Figura 13. Representación gráfica de las cepas de *E. coli* resistentes a cada antibiótico conforme a los criterios del EUCAST-2025 (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; ETP: ertapenem; ATM: aztreonam; NAL: ácido nalidixico; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMK: amikacina; TGC: tigeciclina; NIT: nitrofurantoína; CHL: cloranfenicol; DOX: doxiciclina; FOF: fosfomicina; SXT: clotrimoxazol; CST: colistina).

Por otra parte, se observó que 11 de las colonias estudiadas (39,3 %) fueron MDR, ya que mostraron resistencia a al menos un agente microbiano en tres o más categorías distintas (Magiorakos *et al.*, 2012). De las 11 colonias MDR, 9 de ellas (32,1 % del total) correspondieron a colonias productoras de BLEE, lo cual es coherente dado que las β -lactamasas que producen inactivan los antibióticos β -lactámicos, un grupo amplio al que pertenecen la mayoría de los antibióticos evaluados en los antibiogramas.

Los resultados obtenidos en este estudio revelan una mayor proporción de cepas MDR en comparación con trabajos previos realizados en carne de jabalí destinada al autoconsumo, salas de despiece y muestras de heces (Tabla 5). Aunque la diferencia entre la proporción de cepas MDR observada en este trabajo (39,3 %) y la reportada en estudios sobre carne de jabalí destinada al autoconsumo (20,7 %) y procedente de salas de despiece (17,4 %) no resulta estadísticamente significativa ($P=0,1550$ y $P=0,1253$, respectivamente), sí se observaron diferencias significativas al compararla con los valores reportados en estudios sobre la microbiota de jabalíes (9% y 3,6 %), con valores $P=0,0067$ y $P<0,0001$, respectivamente.

Tabla 5. Comparación de prevalencia de MDR en *E. coli* entre la carne y las heces de jabalíes muestreados en la misma área geográfica.

Estudio	Nº muestras	Nº MDR	% MDR
Jabalí heces (2024-25)	33	3	9
Jabalí heces (2023-24)	81	3	3,6
Jabalí carne autoconsumo (2024)	29	6	20,7
Jabalí carne autoconsumo (2025)	28	11	39,3
Jabalí carne sala de despiece (2025)	23	4	17,4

(MDR= multirresistente, del inglés *multidrug-resistance*)

La comparación entre los genes BLEE detectados en la microbiota fecal y en las muestras de carne revela diferencias relevantes, tanto en la diversidad genética como en la prevalencia de resistencia. En las heces se identificaron *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-14}* y *bla_{CTX-M-32}*, mientras que en las muestras de carne analizadas en este estudio se detectaron, mayoritariamente *bla_{CTX-M-1}* y *bla_{CTX-M-15}*, este último comúnmente asociado a cepas humanas (Diab *et al.*, 2016). Además, la prevalencia de cepas MDR fue significativamente mayor en la carne (57,1 %) en comparación con la observada en estudios sobre microbiota fecal (9% y 3,6 %). Estas diferencias sugieren que la resistencia detectada en la carne no se

origina exclusivamente en el animal, sino que podría ser consecuencia de una contaminación de origen humano, probablemente relacionada con la manipulación inadecuada durante el procesado o despique posterior a la caza.

4.4.2.2 Cepas *K. pneumoniae*

Por otra parte, las 17 colonias de *K. pneumoniae* analizadas presentaron todas ellas resistencia a la ampicilina, resultado esperable, ya que esta especie posee de forma intrínseca el gen SHV en su cromosoma, confiriéndole resistencia a dicho antibiótico (Wyres & Holt, 2018).

Además, al igual que en los estudios realizados en carne de salas de despique y microbiota intestinal de jabalíes (Rey Souto, 2025; Vázquez Ojea, 2025), todas las colonias de *K. pneumoniae* también presentaron resistencia a la fosfomicina.

Cabe destacar que una colonia presentó resistencia a tigeciclina (5,9 %), mientras que la colonia productora de BLEE además de mostrar resistencia frente a diferentes antibióticos β -lactámicos, también fue resistente a las fluoroquinolonas, aminoglucósidos, y trimetoprim-sulfametoxazol, clasificándose como MDR según lo propuesto por Magiorakos *et al.* (2012) (Figura 14).

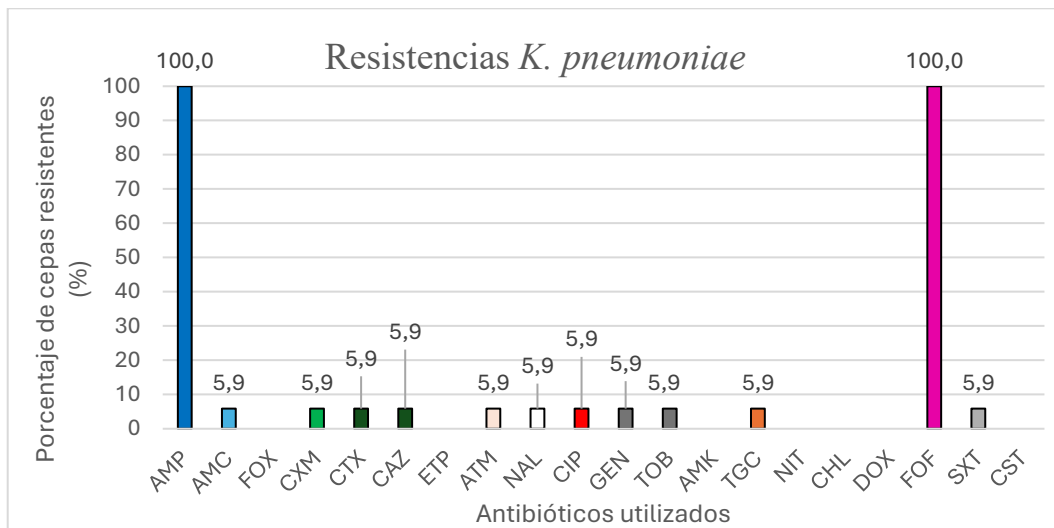


Figura 14. Representación gráfica de las cepas de *E. coli* resistentes a cada antibiótico conforme a los criterios del EUCAST-2025 (AMP: ampicilina; AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; FOX: cefoxitina; CXM: cefuroxima; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; ETP: ertapenem; ATM: aztreonam; NAL: ácido nalidixico; CIP: ciprofloxacina; GEN: gentamicina; TOB: tobramicina; AMK: amikacina; TGC: tigeciclina; NIT: nitrofurantoína; CHL: cloranfenicol; DOX: doxiciclina; FOF: fosfomicina; SXT: clotrimoxazol; CST: colistina).

4.4 Caracterización de las cepas identificadas

A las 28 colonias de *E. coli* caracterizadas para el estudio de RAM se les realizó una PCR múltiple (amplificación de los genes *arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE.4.C2*) para clasificarlas dentro de un grupo filogenético. El análisis de los resultados reveló una alta diversidad poblacional dentro de la colección de *E. coli*, al detectarse colonias pertenecientes a los 8 grupos filogenéticos definidos por Clermont *et al.* (2013, 2019), incluyendo también colonias clasificadas dentro del Clade V (Clermont *et al.*, 2011). El filogrupo B1 fue el más frecuente entre las colonias analizadas (39,3 %), seguido por el filogrupo B2 (14,3 %) como se observa en la Figura 15. Estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio sobre la carne de caza destinada al autoconsumo (Gallego Arias, 2024; García *et al.*, 2025), donde el grupo mayoritario fue también el B1 (41,4 %) seguido del filogrupo B2 (24,1 %). Sin embargo, no se detectaron colonias pertenecientes a los filogrupos C, F y G. En comparación con el estudio de la microbiota de jabalíes, el filogrupo E fue el mayoritario (38,9 %) y los filogrupos B1 y B2 tuvieron una prevalencia menor que la de este estudio (5,5 % y 8,3 % respectivamente).

Se cree que el grupo B1 engloba cepas comensales de animales y aisladas en el ambiente, mientras que el grupo B2 incluye la mayoría de las cepas patógenas extraintestinales humanas (Clermont *et al.*, 2013; Aguirre-Sánchez *et al.*, 2022).

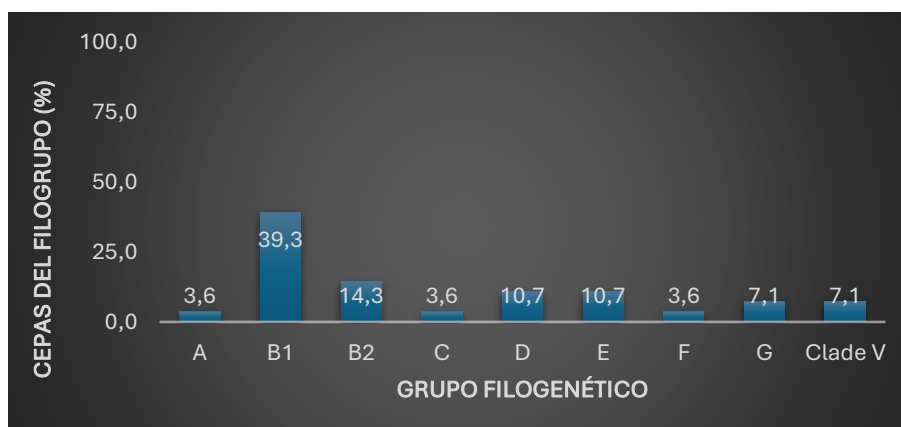


Figura 15. Representación del grupo filogenético de las cepas *E. coli*.

Además, las 9 colonias de *E. coli* productoras de BLEE, junto con las 3 colonias aEPEC, fueron analizadas para determinar su clonotipado. Para ello se realizó la secuenciación Sanger para los genes *fumC* y *fimH* y se realizó el análisis genético con ayuda de las herramientas *FimTyper 1.0* y *CHTyper 1.0* del CGE. De las 12 colonias analizadas se detectaron 10 clonotipos diferentes (Tabla 6), siendo el CH65-32 el más frecuente y asociado al filogrupo B1. Algunos clonotipos como CH22-27, CH319-197 y CH48-neg no han sido

descritos en la bibliografía consultada. Por el contrario, ya han sido reportados en estudios previos el CH65-32, identificado en carne de pollo y pavo y en humanos (Díaz-Jiménez, 2021; Carballeira *et al.*, 2025); el CH4-25, detectado en cerdos de granjas (García-Meniño *et al.*, 2018); y el CH45-97, descrito en carne de ave y en humanos (Díaz Jiménez, 2021; Carballeira *et al.*, 2025).

Asimismo, el CH21-90 se ha descrito en cepas de *E. coli* aisladas de elefantes marinos (Mora *et al.*, 2018) y mapaches (Orden *et al.*, 2021), portadores del gen *eae* pero pertenecientes al grupo B2 en vez de F como en este trabajo. También los clonotipos CH4-neg y CH6-289 se han descrito previamente en humanos (Mamani *et al.*, 2019) y cerdos de granja (Bernreiter-Hofer *et al.*, 2021), ambos pertenecientes también al filogrupa B1 como en este estudio, pero con distinto tipo de BLEE.

Además, el CH4-39 podrían estar circulando bidireccionalmente entre humanos y animales porque se ha aislado en aves y mamíferos silvestres y humanos, asociado al filogrupa C y con los genes *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}* y *bla_{CTX-M-14}* (Viso González, 2017)

Cabe destacar que los clonotipos detectados en este estudio son diferentes a los obtenidos por Gallego Arias (2024) en su estudio sobre carne de jabalí destinada a autoconsumo, donde se caracterizaron 3 cepas BLEE pertenecientes al filogrupa A con el CH11-54, una cepa ExPEC (genes *kpsMII*, *papAH*, O25b) del grupo B2 con CH40-22 y una cepa tEPEC del B2 con CH67-57.

Tabla 6. Caracterización de las cepas productoras de BLEE y las cepas aEPEC.

Cepa	Genes de virulencia	Tipo BLEE	GF	<i>fimC</i>	<i>fimH</i>
CJ36.IIIe		CMY-2	B1	65	32
CJ37.IIIId		CMY-2, CTX-M-15	B1	65	32
CJ39.Ia	<i>eae</i>		F	21	90
CJ40.IIIe		CTX-M-15	B1	4	
CJ42.IIIId		CTX-M-65	B1	6	289
CJ44.IIIIf		CTX-M-15	C	4	39
CJ46.I4	<i>eae</i>		B1	4	25
CJ48.IIIe		CTX-M-9	E	22	27
CJ51.IIIIf		CTX-M-15	B1	65	32
CJ53.IIIc		CTX-M-1	G	45	97
CJ54.IIIId		CMY-2	B2	319	197
CJ57a	<i>eae</i>		Clade V	48	

5. CONCLUSIONES

- I. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la carne de jabalí destinada al autoconsumo representa un riesgo microbiológico relevante, incluso cuando se evalúa exclusivamente mediante recuentos de *E. coli*, con un 42,9 % de las muestras clasificadas con calidad insatisfactoria. No obstante, la aplicación de un enfoque de evaluación de riesgo más amplio, como el aquí propuesto (detección de *K. pneumoniae*, presencia de cepas productoras de BLEE y presencia de genes de virulencia), evidencia que todas las muestras analizadas presentaban al menos un factor de riesgo para el consumidor. Esto subraya la importancia de un manejo higiénico adecuado y un cocinado completo de este tipo de carne.
- II. La identificación de cepas de *E. coli* con estatus ExPEC (7,1 %) y aEPEC (10,7 %), así como la recuperación de *K. pneumoniae* en el 60,7 % de las muestras, confirma que la carne de caza puede actuar como reservorio de enterobacterias con potencial patógeno para el ser humano. Además, se detectaron clonotipos de *E. coli* previamente descritos en humanos, como CH65-32 y CH45-97, y grupos filogenéticos asociados a virulencia (B2), lo que refuerza su relevancia desde la perspectiva de salud pública.
- III. En relación con la resistencia antimicrobiana, el 39,3 % de las muestras contenían *E. coli* multirresistentes (MDR), y en el 32,2 % se detectaron BLEE del tipo CTX-M, siendo CTX-M-15 el alelo predominante, lo que evidencia la circulación de elementos genéticos móviles de alto riesgo. Estos hallazgos, en consonancia con el enfoque “Una sola salud”, justifican la inclusión de la fauna silvestre en los programas oficiales de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos (RAM).
- IV. En conjunto, los datos obtenidos permiten concluir que la carne de jabalí destinada al autoconsumo no solo representa un riesgo higiénico-sanitario, sino que constituye también un potencial vector en la diseminación de clones de enterobacterias multirresistentes, incluidos aquellos de interés clínico por su perfil de virulencia y resistencia. A la luz de estos resultados, sería recomendable revisar los marcos normativos actuales e incorporar las estrategias de control específicas para el autoconsumo, una práctica ampliamente extendida y, sin embargo, exenta de vigilancia microbiológica sistemática.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, P., Croft, S., Smith, G.C., Blanco-Aguiar, J.A., Fernandez-Lopez, J., Scandura, M., Apollonio, M., Ferroglio, E., Keuling, O., Sange, M., Zanet, S., Brivio, F., Podgórski, T., Petrović, K., Body, G., Cohen, A., Soriguer, R., Vicente, J. (2019) ENET wild modelling of wild boar distribution and abundance: update of occurrence and hunting data-based models. *EFSA Supporting Publication* 16(8):1674E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019.EN-1674>
- Acevedo, P., Farfán, M.A., Márquez, A.L., Delibes-Mateos, M., Real, R., Vargas, J.M. (2011). Past, present and future of wild ungulates in relation to changes in land use. *Landscape Ecol* 26, 19–31. <https://doi.org/10.1007/s10980-010-9538-2>
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria). (2022). *Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025*. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/pncoca/PNCOCA_2021_2025_V4_Rev_Espana.pdf
- Aguirre-Sánchez, J. R., Valdez-Torres, J. B., Del Campo, N. C., Martínez-Urtaza, J., Del Campo, N. C., Lee, B. G., Quiñones, B., & Chaidez-Quiroz, C. (2022). Phylogenetic group and virulence profile classification in *Escherichia coli* from distinct isolation sources in Mexico. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 106, 105380. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105380>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature reviews. Microbiology*, 8(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays in biochemistry*, 61(1), 49–59. <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>
- Bahr, G., González, L. J., & Vila, A. J. (2021). Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design. *Chemical reviews*, 121(13), 7957–8094. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00138>
- Bernreiter-Hofer, T., Schwarz, L., Müller, E., Cabal-Rosel, A., Korus, M., Misic, D., Frankenfeld, K., Abraham, K., Grünzweil, O., Weiss, A., Feßler, A. T., Allerberger, F., Schwarz, S., Szostak, M. P., Ruppitsch, W., Ladinig, A., Spergser, J., Braun, S. D., Monecke, S., Ehricht, R., ... Lončarić, I. (2021). The Phenotypic and Genotypic Characterization of Porcine *Escherichia coli* Isolates. *Microorganisms*, 9(8), 1676. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081676>
- Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Nicolas-Chanoine, M. H., Decré, D., & Brisse, S. (2014). Development of a multiplex PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae* hypervirulent clones of capsular serotype K2. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 1608-1614. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.081448-0>
- Carballeira L, Rodrigo E, García V, Montufo A, Álvarez-Álvarez M, Fernández J, Mora A. 2025. Simplificando la monitorización de las infecciones del tracto urinario por *Escherichia coli*. Comunicación oral en el XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Málaga

- CDC. (2024). *Antimicrobial Resistance, Food, and Food Animals*. Recuperado el 2 de mayo de 2025, de <https://www.cdc.gov/food-safety/foods/antimicrobial-resistance.html>
- Christaki, E., Marcou, M., & Tofarides, A. (2020). Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of molecular evolution*, 88(1), 26–40. <https://doi.org/10.1007/s00239-019-09914-3>
- Clegg, S., & Murphy, C. N. (2016). Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology spectrum*, 4(1), 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012>
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107-3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Clermont, O., Gordon, D. M., Brisse, S., Walk, S. T., & Denamur, E. (2011). Characterization of the cryptic *Escherichia coli* lineages: rapid identification and prevalence. *Environmental microbiology*, 13(9), 2468–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02519.x>
- Condalab (2022). Agar MacConkey. <https://www.condalab.com/>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- De Angelis, G., Del Giacomo, P., Posteraro, B., Sanguinetti, M., & Tumbarello, M. (2020). Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in *Enterobacteriaceae*. *International journal of molecular sciences*, 21(14), 5090. <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>
- Diab, M., Hamze, M., Madec, J. Y., & Haenni, M. (2017). High Prevalence of Non-ST131 CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* in Healthy Cattle in Lebanon. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 23(2), 261–266. <https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0019>
- Díaz-Jiménez, D. (2021). *Zoonotic potential of Escherichia coli and other Enterobacteriaceae isolated from poultry meat: study of antibiotic resistances and definition of clonal groups pathogenic for humans* [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. <http://hdl.handle.net/10347/27116>
- Díaz-Jiménez, D., García-Meniño, I., Fernández, J., García, V., & Mora, A. (2020). Chicken and turkey meat: Consumer exposure to multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* including mcr-carriers, uropathogenic *E. coli* and high-risk lineages such as ST131. *International journal of food microbiology*, 331, 108750. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108750>

- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2024). The European Union One Health 2023 Zoonoses report. *EFSA Journal*, 22(12), e9106. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.9106>
- EFSA. (2025a). *Foodborne zoonotic diseases*. Recuperado el 2 de mayo de 2025, de <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>
- EFSA. (2025b). *Monitoring AMR in Escherichia coli*. Recuperado el 2 de mayo de 2025, de <https://storymaps.arcgis.com/stories/788684f1e7cd48f09238101536577dc4/>
- EUCAST. (2025a). *EUCAST disk difusión method for antimicrobial susceptibility testing*. https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology
- EUCAST. (2025b). *Clinical breakpoints - breakpoints and guidance*. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- Fantechi, T., Contini, C., Scozzafava, G., & Casini, L. (2022). Consumer preferences for wild game meat: evidence from a hybrid choice model on wild boar meat in Italy. *Agricultural and Food Economics*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40100-022-00231-w>
- Fernández-Llario, P., Salvador Milla, A. (2017). Jabalí – *Sus scrofa* Linnaeus, 1758. *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales*. <http://doi.org/10.20350/DIGITALCSIC/8684>
- Gallego Arias, P. (2024). *Seguridad alimentaria: monitorización integrada de antibiorresistencias (RAM)* [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Santiago de Compostela]. <https://hdl.handle.net/10347/38118>
- García, V., García-Meniño, I., Gómez, V., Jiménez-Orellana, M., Méndez, A., Aguarón, A., Roca, E., & Mora, A. (2022). Mobile colistin resistance (MCR), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and multidrug resistance monitoring in *Escherichia coli* (commensal and pathogenic) in pig farming: need of harmonized guidelines and clinical breakpoints. *Frontiers in microbiology*, 13, 1042612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042612>
- García, V., Lestón, L., Parga, A., García-Meniño, I., Fernández, J., Otero, A., Olsen, J. E., Herrero-Fresno, A., & Mora, A. (2023). Genomics, biofilm formation and infection of bladder epithelial cells in potentially uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) from animal sources and human urinary tract infections (UTIs) further support food-borne transmission. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 16, 100558. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100558>
- García, V., López-Beceiro, A., Quirós, F., Carballeira, L., Mora, A. (2025). Wildlife or Human in danger? Wild boar (*Sus scrofa*) as environmental sentinels of antimicrobial resistance (AMR) and food safety risks. *Presentación poster ESCMID Global, 2025*, Viena.
- García-Meniño, I., García, V., Lumbreras-Iglesias, P., Fernández, J., & Mora, A. (2024). Fluoroquinolone resistance in complicated urinary tract infections: association with the increased occurrence and diversity of *Escherichia coli* of clonal complex 131, together with ST1193. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 14, 1351618. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1351618>

- García-Meniño, I., García, V., Mora, A., Díaz-Jiménez, D., Flament-Simon, S. C., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2018). Swine enteric colibacillosis in Spain: Pathogenic potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02659>
- GfK. (2017). *Análisis de la Demanda de Carne de Caza en España*. ASICCAZA. Recuperado el 7 de mayo de 2025, de https://asiccaza.org/documentos/E-14484_Informe_Demanda_Carne_de_Caza.pdf
- GfK. (2023). *Post Test Carne de caza Silvestre de Europa. Informe de resultados CONSUMIDORES*. ASICCAZA. Recuperado el 7 de mayo de 2025, de https://www.asiccaza.org/documentos/18489_Post_test-Carne_Silvestre_3.pdf
- González-Ferrer, S., Peñaloza, H. F., Budnick, J. A., Bain, W. G., Nordstrom, H. R., Lee, J. S., & Van Tyne, D. (2021). Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infection and immunity*, 89(4), e00693-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00693-20>
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., Jenney, A., Connor, T. R., Hsu, L. Y., Severin, J., Brisse, S., Cao, H., Wilksch, J., Gorrie, C., Schultz, M. B., Edwards, D. J., Nguyen, K. V., Nguyen, T. V., Dao, T. T., Mensink, M., ... Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(27), E3574–E3581. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501049112>
- Husna, A., Rahman, M. M., Badruzzaman, A. T. M., Sikder, M. H., Islam, M. R., Rahman, M. T., Alam, J., & Ashour, H. M. (2023). Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities. *Biomedicines*, 11(11), 2937. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11112937>
- Johnson, J. R., Murray, A. C., Gajewski, A., Sullivan, M., Snippes, P., Kuskowski, M. A., & Smith, K. E. (2003). Isolation and molecular characterization of nalidixic acid-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* from retail chicken products. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(7), 2161–2168. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.7.2161-2168.2003>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kim, D., Kim, S., Kwon, Y., Kim, Y., Park, H., Kwak, K., Lee, H., Lee, J.H., Jang, K.M., Kim, D., Lee, S.H., Kang, L.W. (2023) Structural Insights for β -Lactam Antibiotics. *Biomolecules & therapeutics*, 31(2), 141–147. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2023.008>
- Leão, C., Clemente, L., Moura, L., Seyfarth, A. M., Hansen, I. M., Hendriksen, R. S., & Amaro, A. (2021). Emergence and Clonal Spread of CTX-M-65-Producing *Escherichia coli* From Retail Meat in Portugal. *Frontiers in microbiology*, 12, 653595. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.653595>
- Lizana, V., Muniesa, A., Cardells, J., López-Ramon, J., Aguiló-Gisbert, J., Lomillos, J.M., Gortázar, C. (2022). Safe Game: Hygienic Habits in Self-Consumption of Game Meat in Eastern Spain. *Foods*, 11, 368. <https://doi.org/10.3390/foods11030368>

- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *18*(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Mamani, R., Flament-Simon, S. C., García, V., Mora, A., Alonso, M. P., López, C., García-Meniño, I., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2019). Sequence Types, Clonotypes, Serotypes, and Virotypes of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Causing Bacteraemia in a Spanish Hospital Over a 12-Year Period (2000 to 2011). *Frontiers in microbiology*, *10*, 1530. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01530>
- Martínez-Martínez, L., & González-López, J. J. (2014). Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, *32 Suppl 4*, 4–9. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(14\)70168-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(14)70168-5)
- Martins, F. H., Guth, B. E., Piazza, R. M., Elias, W. P., Leão, S. C., Marzoa, J., Dahbi, G., Mora, A., Blanco, M., Blanco, J., & Pelayo, J. S. (2016). Lambs are an important source of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* in southern Brazil. *Veterinary microbiology*, *196*, 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.009>
- Mora, A., García-Peña, F. J., Alonso, M. P., Pedraza-Díaz, S., Ortega-Mora, L. M., García-Parraga, D., López, C., Viso, S., Dahbi, G., Marzoa, J., Sergeant, M. J., García, V., & Blanco, J. (2018). Impact of human-associated *Escherichia coli* clonal groups in Antarctic pinnipeds: presence of ST73, ST95, ST141 and ST131. *Scientific reports*, *8*(1), 4678. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22943-0>
- Nadeem, S. F., Gohar, U. F., Tahir, S. F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Massa, S. (2020). Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *46*(5), 578–599. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1813687>
- Needham, T., Bureš, D., Černý, J., & Hoffman, L. C. (2023). Overview of game meat utilisation challenges and opportunities: A European perspective. *Meat science*, *204*, 109284. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2023.109284>
- Niewiadomska, K., Kosicka-Gebaska, M., Gebaski, J., Gutkowska, K., Jezewska-Zychowicz, M., & Sułek, M. (2020). Game meat consumption-conscious choice or just a game? *Foods*, *9*(10). <https://doi.org/10.3390/foods9101357>
- O'Neill, J., Davies, S., Rex, J., White, L.J., Murray, R. (2016) Tackling Drug-Resistant INfections Globally: Final Report and Recommendations. London: Wellcome Trust and UK Government.
- Obwegeser, T., Stephan, R., Hofer, E., & Zweifel, C. (2012). Shedding of foodborne pathogens and microbial carcass contamination of hunted wild ruminants. *Veterinary Microbiology*, *159*(1–2), 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.031>

- Orden, J. A., García-Meniño, I., Flament-Simon, S. C., Blanco, J., de la Fuente, R., Martínez-Rodrigo, A., Mas, A., Carrión, J., Sobrino, F., & Domínguez-Bernal, G. (2021). Raccoons (*Procyon lotor*) in the Madrid region of Spain are carriers of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and enteropathogenic *E. coli*. *Zoonoses and public health*, 68(2), 69–78. <https://doi.org/10.1111/zph.12784>
- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>
- Pietsch, M., Irrgang, A., Roschanski, N., Brenner Michael, G., Hamprecht, A., Rieber, H., Käsbohrer, A., Schwarz, S., Rösler, U., Kreienbrock, L., Pfeifer, Y., Fuchs, S., Werner, G., & RESET Study Group (2018). Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC genomics*, 19(1), 601. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4976-3>
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*, 11(4), 589–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
- Polo Cano, C. (2024). *El jabalí como centinela en la perspectiva de una salud única (One-Health)*. [Trabajo de Fin de Grado, Universidad de Santiago de Compostela].
- Rega, M., Andriani, L., Cavallo, S., Bonilauri, P., Bonardi, S., Conter, M., Carmosino, I., & Bacci, C. (2022). Antimicrobial Resistant *E. coli* in Pork and Wild Boar Meat: A Risk to Consumers. *Foods (Basel, Switzerland)*, 11(22), 3662. <https://doi.org/10.3390/foods11223662>
- Reglamento (CE) 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L338, de 22 de diciembre de 2005. <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>
- Reglamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo y del consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L139, de 30 de abril de 2004. <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/853/oj>
- Rey Souto, I. (2025). *Evaluación de la calidad microbiológica y resistencia a antibióticos en carne de jabalí procedente de salas de despiece*. [Trabajo de Fin de Grado pendiente de defensa, Universidad de Santiago de Compostela].
- Riaño, I., García-Campello, M., Sáenz, Y., Alvarez, P., Vinué, L., Lantero, M., Moreno, M. A., Zarazaga, M., & Torres, C. (2009). Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella enterica* in northern Spain with evidence of CTX-M-9 clonal spread among animals and humans. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(3), 292–295. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02673.x>
- Riley L. W. (2020). Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*, 8(4), 10.1128/microbiolspec.ame-0014-2020. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AME-0014-2020>

- Rodrigues, C. (2020). Isolation of Klebsiella strains from food samples MedVetKlebs consortium. *Institut Pasteur*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.baxtifnn>
- Siddi, G., Piras, F., Gymoese, P., Torpdahl, M., Meloni, M. P., Cuccu, M., Migoni, M., Cabras, D., Fredriksson-Ahomaa, M., De Santis, E. P. L., & Scarano, C. (2024). Pathogenic profile and antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Escherichia marmotae* and *Escherichia ruysiae* detected from hunted wild boars in Sardinia (Italy). *International journal of food microbiology*, *421*, 110790. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110790>
- Silva, N., Carvalho, I., Currie, C., Sousa, M., Igrejas, G., Poeta, P. (2019). Extended-Spectrum- β -Lactamase and Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Food-Producing Animals in Europe. *Antibiotic Drug Resistance, Chapter 12*, eds J. L. Capelo-Martínez and G. Igrejas (New Jersey: John Wiley & Sons, Inc), 261-273. <https://doi.org/10.1002/9781119282549>
- Silva-Bea, S., Romero, M., Parga, A., Fernández, J., Mora, A., & Otero, A. (2024). Comparative analysis of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains of food and human origin reveals overlapping populations. *International journal of food microbiology*, *413*, 110605. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110605>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos β lactámicos [B-lactam antibiotics]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, *27*(2), 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Thakur, R., Singh, A., Dhanwar, R., Kadam, S., Waghmare, U., Lodha, T., Lopes, B.S., Prakash, O. (2025). Global perspectives on residual antibiotics: environmental challenges and trends. *Discover Sustainability* *6*, 232. <https://doi.org/10.1007/s43621-025-01048-5>
- Van Kregten E., Westerdal N.A., Willers J.M. (1984). New, simple medium for selective recovery of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from human feces. *Journal of Clinical Microbiol*, *20* (5), 936-941. <https://doi.org/10.1128/jcm.20.5.936-941.1984>
- Vazquez Ojea, V. (2025). *Fauna silvestre como Centinela en la perspectiva de una salud única (One Health)*. [Trabajo de Fin de Grado pendiente de defensa, Universidad de Santiago de Compostela].
- Viso González, S. (2017). *Estudio de la fauna silvestre como reservorio de cepas de Escherichia coli productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y del grupo clonal pandémico ST131 en el noroeste de España*. [Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela]. <http://hdl.handle.net/10347/15485>
- Weissman, S. J., Johnson, J. R., Tchesnokova, V., Billig, M., Dykhuizen, D., Riddell, K., Rogers, P., Qin, X., Butler-Wu, S., Cookson, B. T., Fang, F. C., Scholes, D., Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. (2012). High-resolution two-locus clonal typing of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *78*(5), 1353–1360. <https://doi.org/10.1128/AEM.06663-11>
- Whelan, S., Lucey, B., & Finn, K. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. *Microorganisms*, *11*(9), 2169. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>

- WHO, FAO and OIE (World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Organisation for Animal Health). (2019). Taking a Multisectoral, One Health Approach: A tripartite Guide to Addressing Zoonotic Diseases in Countries. Recuperado el 2 de mayo de 2025, de https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/EN_TripartiteZoonosesGuide_webversion.pdf
- WHO. (2019). Ten threats to global health in 2019. Recuperado el 7 de mayo de 2025, de <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Current opinion in microbiology*, 45, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>