



FACULTAD DE CIENCIAS

GRADO EN BIOQUÍMICA

D. Pablo Gallego Arias

**SEGURIDAD ALIMENTARIA: MONITORIZACIÓN
INTEGRADA DE ANTIBIORRESISTENCIAS (RAM)**

Trabajo Fin de Grado

Junio 2024

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Pablo Gallego Arias 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 realizada 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) y FEDER.

El autor, Pablo Gallego Arias, agradece al Campus Terra su Ayuda de Iniciación a la Investigación 2023-2024 convocada por la “Resolución reitoral 01 de febreiro 2024, da Universidade de Santiago de Compostela, pola que se establecen as bases reguladoras e se convocan bolsas para a iniciación á investigación no marco do Convenio de Colaboración entre a USC e a Consellería de Cultura, Educación, Formación Profesional e Universidades polo que se regula o Campus de Especialización Campus Terra”.



ÍNDICE

RESUMEN	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT	7
RESUMEN GRÁFICO	8
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. La resistencia a los antimicrobianos (RAM).....	11
1.1.1. Principales familias de antibióticos y mecanismos de resistencia.....	13
1.1.1.1. Categorización de antimicrobianos.....	14
1.1.1.2. Betalactamasas.....	15
1.2. Papel de los alimentos en la transmisión de RAM.....	16
1.2.1. Controles en carne de caza	17
1.3. <i>Escherichia coli</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	18
1.3.1. <i>E. coli</i>	18
1.3.2. <i>K. pneumoniae</i>	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
3.1. Procesado de las carnes.....	23
3.1.1. Recuento de <i>E. coli</i>	23
3.1.2. Pre-enriquecimiento y enriquecimiento.....	23
3.2. Aislamiento e identificación de enterobacterias	24
3.2.1. Medio ML.....	24
3.2.2. Medio SCAi.....	25
3.2.3. Medio ESBL	25
3.2.4. Medio CARBA.....	26
3.2.5. Galerías multipruebas API® 20 E™	26

3.2.6.	Espectrometría de masas MALDI-TOF	27
3.3.	Caracterización fenotípica de RAM	28
3.3.1.	Preparación del inóculo	28
3.3.2.	Inoculación de las placas	28
3.3.3.	Dispensación de los discos	28
3.3.4.	Lectura e interpretación de resultados	29
3.4.	Caracterización genotípica de las cepas y RAM.....	30
3.4.1.	PCR convencional	30
3.4.1.1.	<i>Extracción del ADN.....</i>	<i>30</i>
3.4.1.2.	<i>Mezcla de reacción.....</i>	<i>31</i>
3.4.1.3.	<i>Amplificación del ADN.....</i>	<i>31</i>
3.4.1.4.	<i>Revelado de los resultados</i>	<i>31</i>
3.5.	Análisis estadístico de los datos	34
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
4.1.	Recuperación e identificación de Enterobacteriaceae.....	35
4.1.1.	Recuperación de Enterobacteriaceae	35
4.1.2.	Recuperación de cepas potencialmente zoonóticas.....	37
4.2.	Determinación genotípica y fenotípica de RAM.....	38
4.2.1.	Determinación genotípica de RAM.....	38
4.2.2.	Determinación fenotípica de RAM.....	38
4.3.	Caracterización de aislamientos.....	40
4.4.	Valoración del riesgo microbiológico del consumidor.....	42
5.	CONCLUSIONES	43
6.	ANEXOS.....	44
6.1.	Compilación general de <i>primers</i>	44
7.	BIBLIOGRAFÍA	48

RESUMEN

Seguridad alimentaria: monitorización integrada de antibiorresistencias (RAM)

En un mundo en el cual la revolución de la inteligencia artificial parece que va a cambiarlo todo, la pandemia silenciosa de la resistencia a los antimicrobianos constituye, junto con el cambio climático, una de las mayores amenazas para la humanidad.

De hecho, los retos de la lucha contra el calentamiento global y la RAM están estrechamente ligados. Por eso, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece que prioridades como estas o la seguridad alimentaria deben ser abordadas bajo un enfoque *One Health* para mantener el equilibrio de los ecosistemas. Esta perspectiva se basa en que la salud humana, animal y ambiental están totalmente interrelacionadas.

Los animales son reservorios de microorganismos zoonóticos y/o resistentes a los antimicrobianos, y los alimentos actúan como vehículos transmisores de los mismos. En este sentido, el jabalí (*Sus scrofa*) es una especie centinela ideal debido a su creciente abundancia, distribución y relevancia epidemiológica, por su cercanía a medios urbanos y rurales. Además, constituye una fuente de carne de caza, un hábito gastronómico cada vez más popular, cuya calidad microbiológica, en base a los resultados del presente trabajo, fue insatisfactoria en el 20 % de los alimentos.

En este estudio se analizaron 29 muestras de carne de jabalí. Dos de ellas (6,9 %) resultaron portadoras de sendos patotipos de *Escherichia coli* potencialmente patógenos, EPEC y ExPEC, apuntando a un posible origen humano en la manipulación. Además, un 27,6 % fueron positivas para la recuperación de *Klebsiella pneumoniae*. El estudio de resistencia mediante PCR y el método de difusión disco-placa también determinó que un 20,7 % de los alimentos portaban *E. coli* multirresistentes (MDR) y que el 10,3 % eran positivos para *E. coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE).

En conclusión, la carne de jabalí puede ser fuente de enterobacterias de riesgo para el consumidor, como *E. coli* productoras de BLEE y *K. pneumoniae*. Así pues, deberían incluirse las carnes de caza en los programas de control de bacterias resistentes, informando sobre su correcta manipulación para garantizar la seguridad alimentaria.

Palabras clave: Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Una Sola Salud, *Sus scrofa*, caza, seguridad alimentaria, RAM, BLEE, EPEC.

RESUMO

Seguridade alimentaria: monitorización integrada de antibiorresistencia (RAM)

Nun mundo no cal a revolución da intelixencia artificial parece que vai mudalo todo, a pandemia silenciosa da resistencia aos antimicrobianos constitúe, xunto co cambio climático, unha das maiores ameazas para a humanidade.

De feito, os retos da loita contra o quecemento global e a RAM están estreitamente vencellados. Por iso, a Organización Mundial da Saúde (OMS) establece que prioridades como estas ou a seguridade alimentaria deben ser abordadas baixo un enfoque *One Health* para manter o equilibrio dos ecosistemas. Esta perspectiva baséase en que a saúde humana, animal e ambiental están totalmente interrelacionadas.

Os animais son reservorios de microorganismos zoonóticos e/ou resistentes aos antimicrobianos, e os alimentos actúan como vehículos transmisores dos mesmos. Neste sentido, o xabaril (*Sus scrofa*) é unha especie sentinela ideal debido á súa crecente abundancia, distribución e relevancia epidemiolóxica, pola súa proximidade a medios urbanos e rurais. Ademais, constitúe unha fonte de carne de caza, un hábito gastronómico cada vez máis popular, cuxa calidade microbiolóxica, en base aos resultados do presente traballo, foi insatisfactoria no 20 % dos alimentos.

Neste estudo analizáronse 29 mostras de carne de xabaril. Dúas delas (6,9 %) resultaron portadoras de senllos patotipos de *Escherichia coli* potencialmente patóxenos, EPEC e ExPEC, apuntando a unha posible orixe humana na manipulación. Ademais, un 27,6 % foron positivas para a recuperación de *Klebsiella pneumoniae*. O estudo de resistencia mediante PCR e o método de difusión disco-placa tamén determinou que un 20,7 % dos alimentos portaban *E. coli* multirresistentes (MDR), e que o 10,3 % eran positivos para *E. coli* produtoras de betalactamasas de espectro estendido (BLEE).

En conclusión, a carne de xabaril pode ser fonte de enterobacterias de risco para o consumidor, como *E. coli* produtoras de BLEE e *K. pneumoniae*. Así pois, deberían incluírse as carnes de caza nos programas de control de bacterias resistentes, informando sobre a súa correcta manipulación para garantir a seguridade alimentaria.

Palabras clave: Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, Unha Soa Saúde, *Sus scrofa*, caza, seguridade alimentaria, RAM, BLEE, EPEC.

ABSTRACT

Food safety: integrated monitoring of antimicrobial resistance (AMR)

In a world where the artificial intelligence revolution looks set to change everything, the silent pandemic of antimicrobial resistance is, along with climate change, one of the greatest threats to humanity.

In fact, the challenges of combating global warming and AMR are closely linked. This is why the World Health Organisation (WHO) states that priorities such as these or food security must be addressed under a One Health approach to maintain the ecosystems balance. This perspective is based on the fact that human, animal and environmental health are totally interrelated.

Animals are reservoirs of zoonotic and/or antimicrobial resistant microorganisms, and food acts as a vehicle for their transmission. In this respect, wild boar (*Sus scrofa*) is an ideal sentinel species due to its increasing abundance, distribution and epidemiological relevance, because of its proximity to urban and rural environments. Moreover, it is a source of game meat, an increasingly popular gastronomic habit, whose microbiological quality, based on the results of the present work, was unsatisfactory in 20 % of the foodstuffs.

In this study, 29 samples of wild boar meat were analysed. Two of them (6,9 %) were found to carry both potentially pathogenic *Escherichia coli* pathotypes, EPEC and ExPEC, pointing to a possible human origin in the handling. In addition, 27,6 % were positive for *Klebsiella pneumoniae* recovery. The resistance study by PCR and the disc-plate diffusion method also determined that 20,7 % of the food carried multidrug-resistant (MDR) *E. coli*, and that 10,3 % were positive for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. coli*.

In conclusion, wild boar meat may be a source of dangerous enterobacteria for the consumer, such as ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*. Therefore, game meats should be included in control programmes for resistant bacteria and information on proper handling should be provided to ensure food safety.

Keywords: Enterobacteriaceae, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, One Health, *Sus scrofa*, hunting, food safety, AMR, ESBL, EPEC.

RESUMEN GRÁFICO

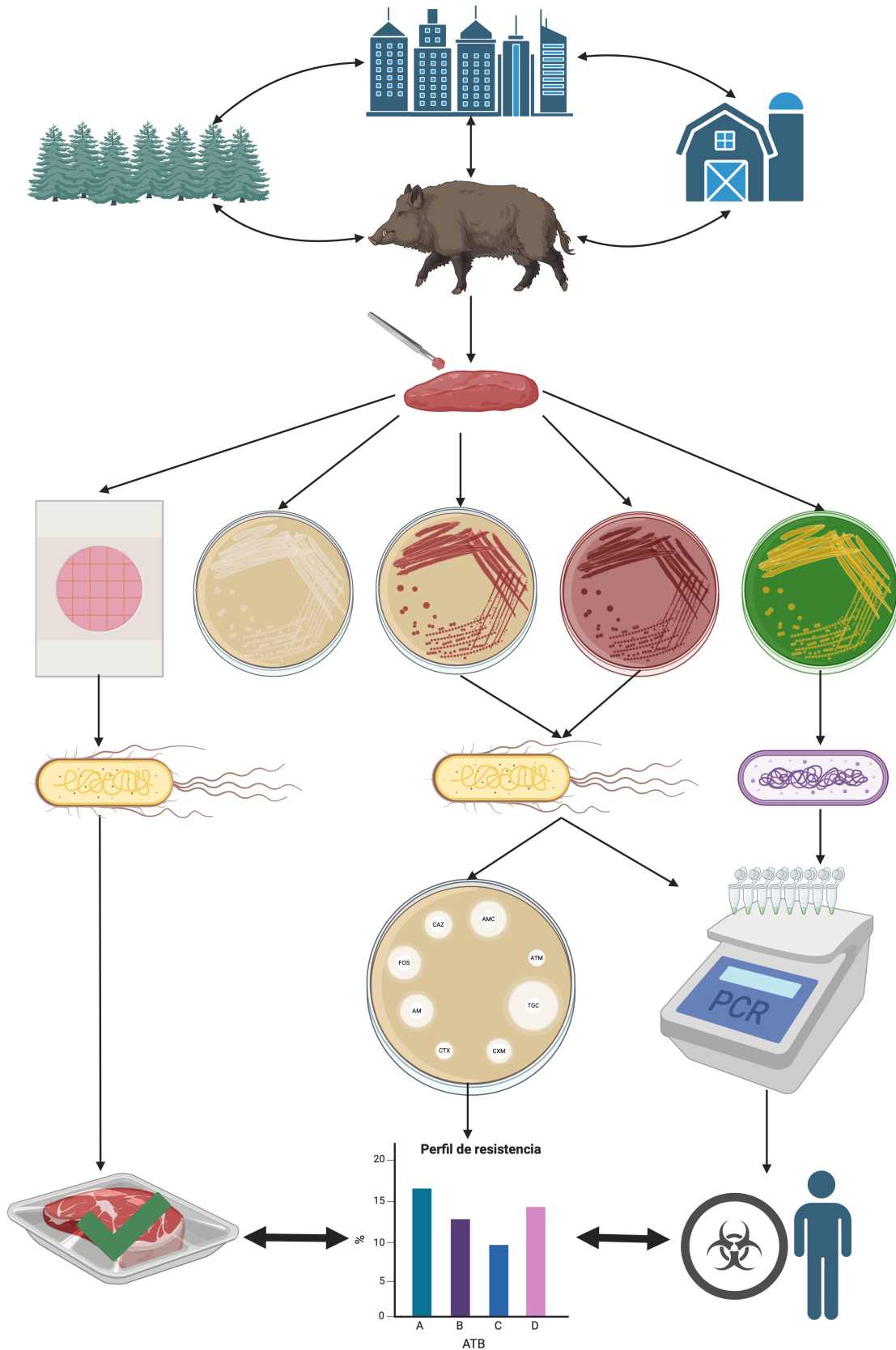


Figura 1. Resumen gráfico de “Seguridad alimentaria: monitorización integrada de antibiorresistencias (RAM)” (Creado con BioRender.com).

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

APT: Agua de peptona tamponada

BHE: Barrera hematoencefálica

BLEE: Betalactamasa de Espectro Extendido

CCAA: Comunidades Autónomas

CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*): Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades

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

CH: Clonotipado

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

CMI: Concentración mínima inhibitoria

ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*): Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades

EFSA (*European Food Safety Agency*): Agencia Europea de Seguridad Alimentaria

EMA (*European Medicines Agency*): Agencia Europea del Medicamento

ESCMID (*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*): Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas

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

FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*): Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

GF: Grupo filogenético

IA: inteligencia artificial

IREC: Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos

ITU: Infección del Tracto Urinario

LASAPAGA: Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia

LREC: Laboratorio de Referencia de *Escherichia coli*

MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*): Espectrometría de masas de ionización/desorción láser asistida por matriz con tiempo de vuelo

MDR (*multidrug-resistance*): Multirresistente

MH: Mueller-Hinton

ML: MacConkey Lactosa

OMS: Organización Mundial de la Salud

OMSA: Organización Mundial de Sanidad Animal

PCR (*Polymerase Chain Reaction*): Reacción en cadena de la polimerasa

PDR (*pandrug-resistance*): Panresistente

PIB: Producto Interior Bruto

PNCOCA: Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente

PRAN: Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos

RAM: Resistencia antimicrobiana

SCAi: Citrato de Simmons con mio-inositol

SEIMC: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Médica

SNC: Sistema nervioso central

Spp.: especies

TSA: Agar triptona de soja

UE: Unión Europea

UFC: Unidades formadoras de colonias

USC: Universidad de Santiago de Compostela

XDR (*extensively-drug-resistance*): Extensamente resistente

1. INTRODUCCIÓN

Pese a que durante los años de la pandemia la COVID-19 desplazó su atención, uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la ciencia en la actualidad es el de las resistencias a antimicrobianos (RAM), una problemática de la cual parecen ser cada vez más conscientes tanto la sociedad en general, como las administraciones públicas en particular, y que debe aunar los esfuerzos de expertos de diferentes ámbitos, incluido el de la bioquímica y la biología molecular, para poder buscar soluciones urgentes.

El mejor ejemplo de esta transversalidad e integración lo constituye el enfoque **One Health**, cuya definición ha sido establecida por parte del cuatripartito, compuesto por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de Salud Animal (OMSA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), junto con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA). Todos ellos, bajo la perspectiva de una sola salud, buscan interpelar a múltiples sectores en la lucha contra enfermedades y amenazas para la salud pública como ésta, de forma coordinada, procurando un equilibrio entre la salud de los animales, las personas y los ecosistemas, al tiempo que se promueve un desarrollo sostenible (WHO, 2021).

1.1. La resistencia a los antimicrobianos (RAM)

Los **antimicrobianos** son sustancias naturales, sintéticas o semisintéticas, utilizadas para matar microorganismos (bactericidas) o para frenar su crecimiento y multiplicación (bacteriostáticos). En general, los antimicrobianos pueden clasificarse como antibióticos o quimioterápicos, según sean de origen natural o sintético, respectivamente, aunque en este trabajo se englobarán todos ellos bajo el término de antibiótico (Torres *et al.*, 2020).

Desde el descubrimiento accidental de la penicilina gracias al Dr. Fleming en 1928, se inició una edad dorada durante la cual el descubrimiento de moléculas y el desarrollo de nuevos compuestos han salvado millones de vidas, revolucionando por completo la medicina moderna y permitiendo tratar enfermedades infecciosas para las cuales no existía tratamiento hasta el momento. Sin embargo, ya al poco de su introducción, comenzaron a detectarse mecanismos de resistencia que hacían que algunas cepas no fuesen sensibles al agente antimicrobiano en cuestión (Hutchings *et al.*, 2019).

En este sentido, la RAM es la capacidad, intrínseca o adquirida, de algunos microorganismos para evadir los efectos de antibióticos destinados a su eliminación. Este proceso se ve acelerado por la selección natural, de forma paralela a una utilización incorrecta, y en muchas ocasiones excesiva, de estos fármacos en la medicina humana y veterinaria durante los últimos años.

Para establecer una clasificación consensuada y universal de los microorganismos resistentes, estos se han dividido en tres categorías, según las cuales las bacterias pueden ser multirresistentes (**MDR**, del inglés *multidrug-resistance*), extensamente resistentes (**XDR**, del inglés *extensively-drug-resistance*) o panresistentes (**PDR**, del inglés *pandrug-resistance*). Las MDR muestran resistencia a al menos un antibiótico en tres categorías distintas; las XDR a al menos un antibiótico en todos los grupos excepto en uno o dos de ellos; y las PDR se caracterizan por la pérdida de sensibilidad a por lo menos un antibiótico de todas las categorías habitualmente utilizadas en el tratamiento de la bacteria considerada (Jiménez Pearson *et al.*, 2019; Magiorakos *et al.*, 2012).

Contextualizando la problemática con datos, las bacterias resistentes causaron en el año 2023 veinte veces más muertes que los accidentes de tráfico en España, esto es 23.000 fallecidos, de acuerdo con un estudio multihospitalario (SEIMC-BMR, 2023) de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Médica (SEIMC); y la OMS prevé que en el 2050 sean responsables de 10 millones de fallecimientos anuales a nivel mundial, convirtiéndose en la primera causa de muerte, por delante del cáncer (O'Neill, 2016). Estas cifras dan una idea de la magnitud de un problema que conlleva, además, importantes costes sanitarios y económicos para los sistemas de salud y el Producto Interior Bruto (PIB) de todo el mundo. De hecho, según los expertos, estamos a punto de entrar en la era post-antibiótica.

Por todo lo anterior, la OMS sitúa la RAM entre las diez mayores amenazas de salud pública para la humanidad (WHO, 2021). En la Unión Europea (UE) trabajan conjuntamente la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) en la monitorización y elaboración de informes sobre la evolución del consumo de antibióticos y de la RAM en los 27 Estados miembros. En España, en 2014, desde la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), se lanza el **Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN)** en respuesta a las recomendaciones de las instituciones comunitarias de crear un plan de

acción en cada país para combatir esta problemática. A través de una serie de líneas estratégicas, que van desde la vigilancia hasta la investigación, pasando por la comunicación y la divulgación, trata de coordinar los esfuerzos de todas las comunidades autónomas (CCAA), varios ministerios y numerosas sociedades científicas.

1.1.1. Principales familias de antibióticos y mecanismos de resistencia

Las resistencias a los antibióticos detectadas en bacterias pueden ser **intrínsecas**, si son inherentes a las propiedades y estructura del microorganismo; **adquiridas**, si son consecuencia de mutaciones o de una transferencia genética horizontal (por transformación, transducción o conjugación), mediada por plásmidos, transposones o integrones; y **adaptativas**, si se producen en respuesta a estímulos ambientales como cambios en el pH y son transitorias. Este último tipo de resistencia a antimicrobianos se cree que podría ser causado por modificaciones epigenéticas tales como metilaciones del ADN (Munita & Arias, 2016).

Algunos de los principales mecanismos de resistencia de las bacterias son (Van Hoek *et al.*, 2011):

- Destrucción o modificación enzimática del antibiótico.
- Reducción de la concentración intracelular del antibiótico por disminución de la permeabilidad o bombas de eflujo.
- Alteración de la diana del antibiótico por mutaciones o modificación enzimática.
- Sobreproducción de la diana del antibiótico.
- Utilización de vías metabólicas alternativas a las inhibidas por el antibiótico.

No obstante, existe otra forma de resistencia antimicrobiana conocida como **biopelículas o biofilms**, consistente en estructuras bacterianas que se adhieren a diferentes superficies naturales o de instrumentos médicos. En el interior de estas estructuras se forma una matriz extracelular conformada por proteínas, ADN y exopolisacáridos. Este complejo entramado tridimensional, en el cual se mantienen las bacterias en estado latente, hace muy difícil la penetrancia, difusión y acción del antibiótico dentro de la misma. Es por eso por lo que se dice que la capacidad de algunos microorganismos de agregarse en forma de *biofilms* constituye un factor de virulencia en infecciones humanas y animales (Rabin *et al.*, 2015).

Las biopelículas también representan un problema importante en la industria alimentaria ya que proporcionan a las bacterias una protección física frente a desinfectantes y aumentan el riesgo de contaminaciones cruzadas entre alimentos.

1.1.1.1. Categorización de antimicrobianos

Entre las principales familias de antibióticos se encuentran los aminoglucósidos, los betalactámicos, el cloranfenicol, las quinolonas y fluoroquinolonas, las sulfonamidas, el trimetoprim, las tetraciclinas y las polimixinas (Hutchings *et al.*, 2019).

De entre las anteriores, la de los **betalactámicos** (Tabla 1) es, sin duda, la más utilizada por su amplio espectro, baja toxicidad y gran eficacia. Estos presentan un anillo betalactámico en su estructura y funcionan inhibiendo la síntesis del peptidoglucano de la pared celular en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, al unirse a las enzimas conocidas como proteínas fijadoras de betalactámicos (*penicilin-binding proteins*, PBP), inhibiendo su actividad. De esta forma, las bacterias, al no poder sintetizar correctamente su pared, quedan expuestas y mueren por cambios en la presión osmótica (Bush & Bradford, 2016).

Familia	Categoría		Antibióticos representativos			
Betalactámicos	Penicilinas		<i>Ampicilina</i>	<i>Amoxicilina</i>		
			<i>Cloxacilina</i>	<i>Piperacilina</i>		
	Cefalosporinas	1ª generación	<i>Cefazolina</i>			
		2ª generación	<i>Cefuroxima</i>			
		3ª generación	<i>Cefotaxima</i>			
		4ª generación	<i>Cefepima</i>			
	Carbapenemas		<i>Ertapenem</i>	<i>Imipenem</i>	<i>Meropenem</i>	
	Monobactámicos		<i>Aztreonam</i>			
	Inhibidores de betalactamasas		<i>Ácido clavulánico</i>	<i>Sulbactam</i>	<i>Tazobactam</i>	

Tabla 1. Principales categorías de antibióticos betalactámicos (Elaboración propia).

Otra de las causas detrás de la problemática de la RAM, radica en el estancamiento en el desarrollo de nuevos antibióticos, por motivos de diversa índole, entre los que se encuentran la ausencia de rentabilidad para las grandes farmacéuticas y la dificultad de identificar nuevas dianas con potencial terapéutico en los microorganismos. En este

sentido, parecen esperanzadoras las posibilidades que ofrecen los avances de la inteligencia artificial (IA) en el desarrollo de nuevos antibióticos *in silico*, monitorizando tanto la actividad antimicrobiana como la generación de posibles resistencias (Melo *et al.*, 2021).

Debido a esta disminución en la comercialización de nuevos fármacos, desde las autoridades sanitarias se establecen varios niveles, en actualización constante, para un uso racional de los antibióticos existentes. Así, por ejemplo, la OMS publicó una actualización en febrero de este año de la lista de los antimicrobianos prioritarios desde el punto de vista terapéutico en medicina humana (WHO, 2024). Por su parte, este organismo internacional también clasifica los de sanidad humana en tres grupos siguiendo la herramienta AWaRe: antibióticos de acceso, antibióticos bajo vigilancia y antibióticos de reserva (OMS, 2023). Asimismo, la EMA estableció una categorización pensando en el uso en veterinaria estableciendo cuatro categorías: A, B, C y D. Los del primer grupo son los no autorizados para uso veterinario; los del grupo B son de uso restringido; en el C se incluyen aquellos que han de usarse con precaución y, por último, en la categoría D aquellos de primera línea, que deben usarse de forma prudente (EMA, 2020).

1.1.1.2. *Betalactamasas*

La resistencia a los antibióticos betalactámicos incluye algunos de los mecanismos citados anteriormente, si bien, el principal, sobre todo en bacterias Gram-negativas y enterobacterias, es el enzimático, consistente en la producción de **betalactamasas** que hidrolizan el anillo betalactámico de esta familia de antibióticos (Figura 2).

Estas enzimas se clasifican en cuatro grandes grupos: A, B, C, D. Tanto A, como C y D, son serina-betalactamasas; mientras que las B son metalo-betalactamasas, que necesitan Zinc para su funcionamiento. Sin embargo, las más importantes son las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), las de tipo AmpC y las carbapenemasas.

Las **BLEE** se caracterizan por otorgar resistencia a penicilinas y cefalosporinas, incluso a las de tercera y cuarta generación. Pueden ser de tipo TEM, SHV, CTX-M y OXA. Las CTX-M son efectivas frente a cefalosporinas de 3^a generación y existen muchas variantes, divididas en grupo 1 y grupo 9, desigualmente distribuidas por todo el mundo. Un rasgo compartido por todas las BLEE es su inactivación por inhibidores como el ácido clavulánico, que debido a su similitud estructural con los betalactámicos se une de forma irreversible al sitio activo de la enzima impidiendo la inactivación del

antimicrobiano. La mayoría de las betalactamasas son de naturaleza plasmídica, aunque hay microorganismos que producen betalactamasas cromosómicas (Cantón *et al.*, 2002).

Por su parte, las **AmpC** o cefalosporinas, son serina-betalactamasas. No son inhibidas por los inhibidores clásicos de betalactamasas y actúan sobre penicilinas, y cefalosporinas de primera, segunda y tercera generación. No responden, sin embargo, ante cefalosporinas de cuarta generación ni carbapenemes.

En cuanto a las **carbapenemasas**, estas son enzimas muy versátiles que hidrolizan, además de a los carbapenémicos, a prácticamente todos los betalactámicos. Cabe destacar que los carbapenemes son considerados antibióticos de última línea terapéutica, utilizados para tratar infecciones insensibles frente a otros antibióticos, por lo que la vigilancia de cepas de enterobacterias productoras de estas enzimas es fundamental (Del Valle Martínez Rojas, 2009).

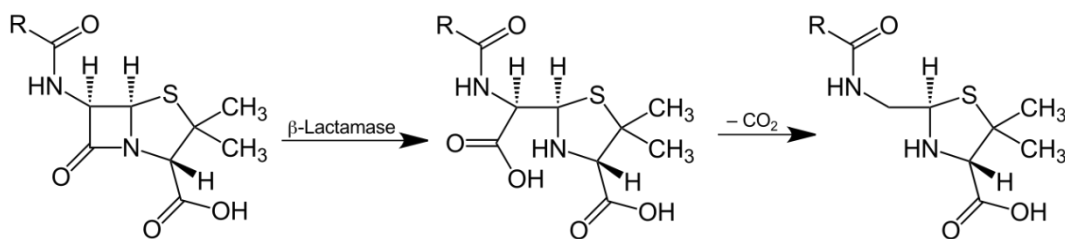


Figura 2. Modo de acción de las betalactamasas (Licencia *Creative Commons*).

1.2. Papel de los alimentos en la transmisión de RAM

Las **enfermedades zoonóticas** son aquellas causadas por infecciones que se propagan entre animales y humanos. Algunas se transmiten a través alimentos y/o agua contaminados con bacterias, virus o parásitos que colonizan el tracto gastrointestinal pudiendo desencadenar graves patologías. (EFSA, 2023).

Muchos de estos microorganismos forman parte de la microbiota intestinal de animales destinados al consumo humano, pero también pueden ser el resultado de contaminaciones producidas en distintos puntos de la cadena alimentaria (en las granjas, durante el transporte, el procesado, la preparación...), o propagados a través del medio ambiente debido a una contaminación fecal del agua, los piensos o los fertilizantes (Koutsoumanis *et al.*, 2021).

No obstante, el peligro no está solamente ocasionado por bacterias patógenas y/o multirresistentes causantes de infecciones alimentarias, sino también por la posibilidad

de que éstas transfieran genes de resistencia a las bacterias comensales de la microbiota del hospedador al entrar en contacto con ellas (CDC, 2024).

Pero si la RAM es una amenaza importante para la salud pública global, entender su relación con la seguridad alimentaria es fundamental para poder abordar el problema en toda su dimensión. A factores como el de la disminución en el descubrimiento de nuevos antibióticos, o el de su utilización incorrecta y excesiva, hay que añadir otros como el modelo de producción intensiva que puede favorecer la diseminación bacteriana; y los cambios en los hábitos de consumo (demanda creciente de comida rápida o precocinada), que conllevan riesgos debido a una conservación incorrecta, tiempos de cocinado inadecuados o la aparición de contaminaciones cruzadas (Díaz Jiménez, 2021).

Además, el hecho de que haya un mercado global de productos agrícolas o cárnicos procedentes de zonas de menor seguridad alimentaria, favorece también la dispersión de cepas resistentes (Campos *et al.*, 2018).

1.2.1. Controles en carne de caza

Uno de los objetivos principales del enfoque *One Health* es el de establecer un sistema de vigilancia de RAM tanto en humanos, como en animales salvajes y de granjas, además de en el medio ambiente. Esto es especialmente relevante en el escenario actual, marcado por la creciente fragmentación de los hábitats naturales por la acción del hombre. Prácticas como la deforestación y la urbanización provocan que la fauna silvestre esté en contacto de forma cada vez más estrecha con las personas y su ganado, incrementando la probabilidad de transmisión de RAM entre unas poblaciones y otras (Torres *et al.*, 2020).

En España, la detección de RAM en carnes comercializadas en supermercados está monitorizada por el Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA 2021-2025), que incluye mataderos, salas de manipulación de caza y salas de tratamiento de reses de lidia (AESAN, 2022). No obstante, no ocurre lo mismo con carnes de especies cinegéticas como el corzo, el jabalí o la liebre destinadas al autoconsumo, lo cual es habitual en muchas regiones españolas.

Precisamente, el **jabalí (*Sus scrofa*)**, mamífero de la familia de los suidos, se postula como una centinela ideal en la monitorización de RAM, puesto que hasta el momento no se han analizado en profundidad los posibles riesgos que entraña su consumo ni su potencial en la transmisión de RAM. Del mismo modo, el hecho de que se trate de una especie silvestre en creciente expansión en toda Europa, que se mueve entre entornos

urbanos y rurales, y que no debería estar sometida a tratamiento con antibióticos, la convierte en el vínculo perfecto entre los tres compartimentos que encierra *One Health*: el medio ambiente, los humanos y los animales (Torres *et al.*, 2020). Buena prueba de esto es el hecho de que algunas publicaciones muestran que apenas existen diferencias en la prevalencia de cepas RAM entre carnes de especies domésticas y salvajes como cerdos y jabalíes (Rega *et al.*, 2022).

Como se indica en el párrafo anterior, las poblaciones de este mamífero están aumentando en todo el continente, siendo este incremento especialmente notable en España, donde ya hay más de un millón, cifra que podría duplicarse en 2025 según los expertos. Buena prueba de esto es la reciente declaración de la **emergencia cinegética** en 248 ayuntamientos gallegos por parte de la Xunta de Galicia para la temporada 2023/2024, estableciendo la caza sin límites del jabalí con el objetivo de evitar daños en los cultivos, accidentes de tráfico o la transmisión de enfermedades como la peste porcina africana, que son algunos de los principales perjuicios que causa su sobrepoblación (Resolución de 6 de septiembre de 2023, de la Jefatura Territorial de Lugo, por la que se declara la emergencia cinegética temporal por los daños ocasionados por el jabalí en las comarcas de Os Ancares, Chantada, Lugo, A Mariña Central, A Mariña Occidental, A Mariña Oriental, Sarria, Terra Chá y Terra de Lemos).

1.3. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*

Tanto *E. coli* como *K. pneumoniae* son especies de bacterias Gram-negativas y anaerobias facultativas con forma de bacilo, pertenecientes a la familia de las **enterobacterias**. Ambas se pueden encontrar en la microbiota del tracto gastrointestinal de organismos sanos. No obstante, en ocasiones se pueden producir alteraciones y desequilibrios conocidos como disbiosis, así como infecciones en otras zonas del cuerpo. Muchas de ellas son difíciles de tratar por la elevada cantidad de RAM, tanto intrínsecas como adquiridas, que podemos encontrar en estas especies.

1.3.1. *E. coli*

E. coli fue descrita por primera vez en 1885 por el pediatra alemán Theodor Von Escherich, a quien debe su nombre. Sus células pueden ser móviles o no, dependiendo de la producción de flagelos. El hecho de que se encuentre en el tracto gastrointestinal de vertebrados, donde interviene en la síntesis de vitamina K o en la activación del sistema inmune, hace que su presencia en aguas o alimentos se utilice como un indicativo de

contaminación fecal. La clasificación de las cepas de *E. coli* se ha realizado clásicamente en función de serogrupos basados en el antígeno O (lipopolisacárido, LPS) y/o serotipos definidos por una misma combinación del antígeno O junto con el H (flagelo), y en ocasiones el K (cápsula) (Kaper *et al.*, 2004).

Aunque hay muchas combinaciones posibles de los antígenos O:K:H, la mayoría corresponden a cepas de *E. coli* inocuas e incluso beneficiosas y solo algunas se asocian con determinados tipos patógenos de *E. coli*, los cuales se pueden dividir en dos grandes grupos: ***E. coli* patógeno intestinal (InPEC)** y ***E. coli* patógeno extraintestinal (ExPEC)**, dependiendo de si causan infecciones dentro o fuera del intestino, respectivamente.

Dentro de cada uno de esos grupos se establecen diferentes patotipos (Tabla 2), es decir, grupos de *E. coli* asociados a un cuadro patógeno definidos por factores de virulencia específicos.

Dentro de los intestinales o diarreagénicos tenemos: *E. coli* verotoxigénico (VTEC), *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC), *E. coli* enteroagregativo (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* adherente-invasivo (AIEC).

Con respecto a los extraintestinales, estos se dividen en *E. coli* uropatógenicos (UPEC), *E. coli* asociado con meningitis o sepsis (MNEC/SPEC) y *E. coli* patógeno aviar (APEC).

Muchas de las cepas patógenas de *E. coli* han desarrollado resistencias a los antimicrobianos. Algunas, como es el caso de las pertenecientes al **clon pandémico ST131**, incluso son responsables de la dispersión de BLEE. Este clon fue identificado en 2008 y hoy se considera el predominante entre las infecciones hospitalarias extraintestinales multirresistentes a nivel mundial (García-Meniño *et al.*, 2024).

En cualquier caso, más allá de las variantes patogénicas de esta bacteria, su papel de comensal en el tracto gastrointestinal de la mayoría de los vertebrados de sangre caliente, muchos de los cuales están destinados a la producción, la convierte en un muy buen indicador para la vigilancia de RAM, asociado además al ámbito de la seguridad alimentaria. De esta forma, al permitir monitorizar los genes de resistencia existentes, los cuales pueden ser transferidos a bacterias patógenas, se puede establecer un sistema de detección fundamental para la salud pública y para la salud animal (EFSA, 2014).

Grupo	Patotipo	Características	Enfermedad
InPEC	VTEC	Producción de la citotoxina conocida como shigatoxina o verotoxina	Síndrome urémico hemolítico (SUH) y colitis hemorrágica
	EPEC	Lesiones de adherencia y borrado de microvellosidades en células del epitelio intestinal	Diarrea infantil
	ETEC	Producción de enterotoxinas lábiles o estables al calor	Diarrea del viajero
	EIEC	Cepas con capacidad de invasión de las células intestinales	Diarrea acuosa y disentería
	EAEC	Formación de <i>biofilm</i> y adhesión agregativa en enterocitos	Diarrea persistente en niños y adultos
	DAEC	Adhesión difusa con formación de proyecciones celulares alrededor de la bacteria	Diarrea aguda y persistente en niños
	AIEC	Adhesión e invasión de células del epitelio intestinal	Asociación con enfermedad de Crohn
ExPEC	UPEC	Colonización del epitelio de la vejiga desde áreas periuretrales	Infecciones del tracto urinario (ITU)
	APEC	Sintomatología respiratoria en aves salvajes y domésticas. Potencial zoonótico en humanos	Colibacilosis aviar
	MNEC / SPEC	Propagación a través de la sangre hasta el SNC cruzando la BHE	Meningitis neonatal y sepsis

Tabla 2. Patotipos de *E. coli*. Adaptada de (Kaper *et al.*, 2004) (SNC: Sistema nervioso central; BHE: barrera hematoencefálica).

1.3.2. *K. pneumoniae*

K. pneumoniae fue nombrada así en honor al microbiólogo alemán del siglo XIX Edwin Klebs. En humanos está presente de forma natural en el tracto gastrointestinal o en la nasofaringe, pero también puede detectarse en el medio ambiente, en agua o en suelos (Tártara, 2013).

Por otro lado, es uno de los **patógenos oportunistas** más habituales en el ámbito hospitalario, y es causante de infecciones nosocomiales y comunitarias tales como neumonías, septicemias, infecciones del tracto urinario (ITU) o infecciones quirúrgicas

que representan un problema creciente en todo el mundo, especialmente en los países asiáticos (Rodrigues *et al.*, 2022).

Además, en relación con la creciente preocupación por la RAM, cabe destacar que esta especie puede estar también presente en los alimentos. Y es que hay estudios recientes que muestran que carnes de pollo, pavo o cerdo contaminadas con *K. pneumoniae* pueden actuar como potenciales transmisoras de bacterias portadoras de genes de resistencia, convirtiéndose en un riesgo importante para la salud pública (Riley, 2020; Silva-Bea *et al.*, 2024)

Con respecto, por ejemplo, a la producción de BLEE, esta es una de las principales enterobacterias productora de estas enzimas. Asimismo, la utilización incorrecta de antibióticos como los carbapenémicos ha hecho que la resistencia de *K. pneumoniae* a tratamientos de último recurso como este se esté generalizando a varios países. Es por eso por lo que la OMS incluye a las *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenemasas entre los patógenos de prioridad crítica para los cuales es necesario el desarrollo de nuevos antimicrobianos (WHO, 2024).

A todo lo anterior hay que añadir que, si bien, tradicionalmente se habían clasificado los patotipos de *K. pneumoniae* en tres grupos mayoritarios -el clon multirresistente (MDR) y el clon hipervirulento (hv), además del patotipo clásico oportunista- en la actualidad han evolucionado de forma convergente hasta la emergencia de cepas que son simultáneamente resistentes a múltiples antibióticos e hipervirulentas (Dong *et al.*, 2022). Estas variantes estarían relacionadas con un fenotipo hipermucoviscoso (HMV), caracterizado por la sobreproducción de polisacáridos de la cápsula bacteriana, que, junto con la formación de biopelículas, constituye uno de los principales factores de virulencia de *Klebsiella* spp. (Russo *et al.*, 2011; Silva-Bea *et al.*, 2024).

2. OBJETIVOS

El presente trabajo de fin de grado se ha realizado en el marco del Proyecto Nacional PID2022-143041OB-100 financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033/ y por FEDER “Una manera de hacer Europa”; titulado “*Seguridad alimentaria: monitorización integrada de antibiorresistencias y dianas de intervención del medio ambiente, a la granja y a la mesa*”. En él se incluye el muestreo del jabalí abatido en los programas oficiales de control, y el de la carne de caza de jabalí como centinela del flujo de RAM.

La motivación general del presente estudio fue evaluar la calidad microbiológica de la carne de jabalí procedentes de la zona de la comarca de Oviedo (Asturias); así como la caracterización fenotípica y genotípica de las enterobacterias presentes y de su resistoma.

Los objetivos específicos de este proyecto fueron:

1. Recuperación e identificación de Enterobacteriaceae en muestras de carne usando medios selectivos específicos y técnicas de biología molecular.
2. Caracterización de aislamientos.
3. Determinación genotípica y fenotípica de antibiorresistencias.
4. Valoración del riesgo microbiológico del consumidor por consumo de carne de caza.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Procesado de las carnes

Se analizaron un total de 29 muestras de carne de jabalí procedentes de 29 animales abatidos en el ámbito de la actividad cinegética autorizada en la comarca de Oviedo, en la temporada 2023-2024. Las muestras recogidas tras la abatida de los animales y el despiezado *in situ*, se conservaron congeladas a -20 °C hasta su llegada al Laboratorio de Referencia de *E. coli* (LREC-USC), donde se descongelaron a temperatura de refrigeración (entre 2 y 8 °C), 24 h antes del procesamiento.

Para minimizar cualquier riesgo de contaminación se realizó el procesado en una cabina de bioseguridad previamente sometida a tratamiento germicida con luz UV durante 30 min, junto con todo el material estéril necesario.

Con cada una de las muestras se repitió el mismo procedimiento. En primer lugar, se pesaron 25 g de carne cortada, en condiciones estériles, de toda la superficie de la pieza a analizar. Cuando estaba presente, se incluyó también el jugo de las carnes procedente del proceso de descongelación. Se introdujo la cantidad pesada en una bolsa de doble filtro para Stomacher[®], a la que posteriormente se añadieron 225 mL de **agua de peptona** tamponada (APT; ApplyChem Panreac), realizando una dilución 1:10. Cada una de las bolsas fue agitada durante 1 min 30 s en el homogeneizador Stomacher[®].

3.1.1. Recuento de *E. coli*

Inmediatamente después de la dilución 1:10 en APT, se inoculó 1 mL de homogeneizado en una placa 3M Petrifilm[™]. Los **Petrifilm** contienen nutrientes de Bilis Rojo-Violeta, un indicador de actividad de la glucuronidasa y otro indicador que facilita la enumeración de las colonias. El 97 % de los *E. coli* producen beta-glucuronidasa, la cual produce un precipitado azul asociado con cada colonia. La lectura de los Petrifilm y el recuento de *E. coli* para establecer la calidad microbiológica de las carnes se realizaron tras 24 h de incubación a 44 °C en condiciones de humedad.

3.1.2. Pre-enriquecimiento y enriquecimiento

Tras el pre-enriquecimiento de las muestras de APT durante 6 h a 37 °C, se inoculó 1 mL de cada una de ellas en tubos de vidrio con 9 mL de **Caldo MacConkey** (Oxoid).

Estos permanecieron a 37 °C durante un mínimo de 18 h, completando así el enriquecimiento.

3.2. Aislamiento e identificación de enterobacterias

Para el aislamiento de Enterobacteriaceae de las muestras de carne se establecieron cuatro protocolos, correspondientes cada uno de ellos a un medio de cultivo distinto. En todos se utilizó la siembra por agotamiento en estría. El protocolo I utiliza medio MacConkey Lactosa (ML), el protocolo II emplea el medio citrato-inositol (SCAi), el protocolo III consiste en la utilización del CHROMID® ESBL, mientras que en el protocolo IV el medio empleado es CHROMID® CARBA SMART (Figura 3).

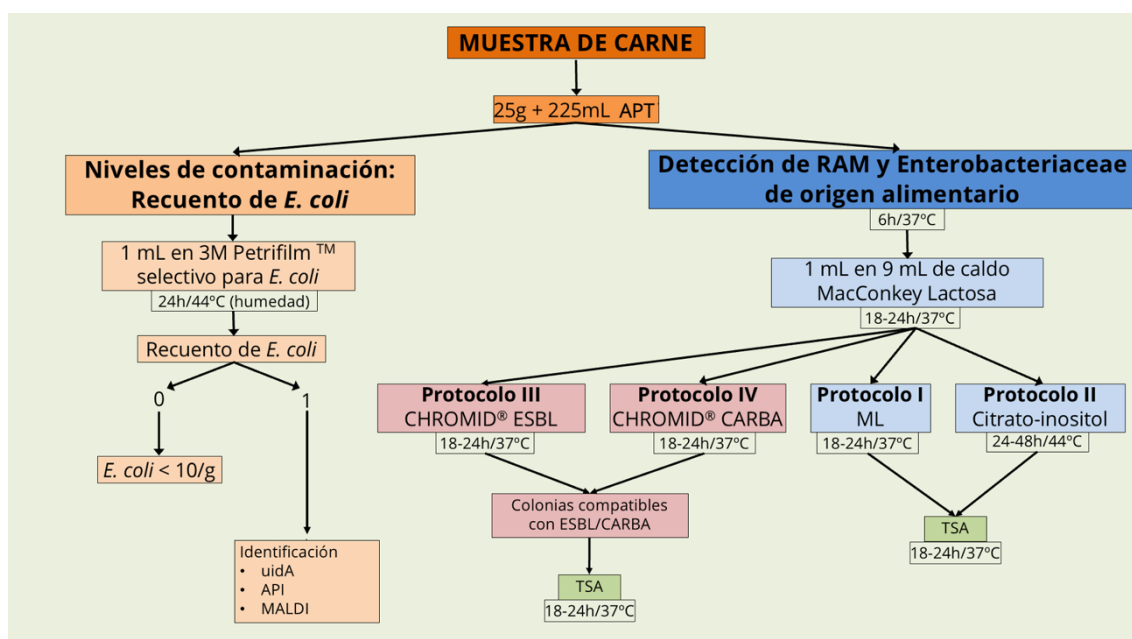


Figura 3. Flujo de trabajo para la recuperación de enterobacterias en carne de jabalí (APT: Agua de peptona tamponada; ML: MacConkey Lactosa; RAM: Resistencia antimicrobiana; TSA: Agar triptona de soja).

3.2.1. Medio ML

El **agar ML** (Oxoid) es un medio utilizado para el aislamiento de Enterobacteriaceae y otros bacilos Gram-negativos. Se trata de un medio selectivo ya que inhibe el crecimiento de bacterias Gram-positivas gracias a su composición de sales biliares y cristal violeta. Además, es un medio de cultivo diferencial, al permitir establecer una distinción entre microorganismos fermentadores de lactosa, lactosa positivos; y no fermentadores de lactosa, lactosa negativos. Todo ello se produce gracias a un indicador de pH rojo neutro, que se vuelve rosa ante descensos de pH provocados por los metabolitos ácidos producidos por las bacterias que fermentan este azúcar. Aquellas bacterias que no fermentan la lactosa, por el contrario, se vuelven incoloras al utilizar

peptona en su lugar, formando amoníaco y aumentando así el pH del medio, que pasa a adquirir una coloración amarillenta.

Tras incubación a 37 °C durante 18-24 h, la morfología típica de los *E. coli* que crecen en este medio es la de colonias redondeadas de color rosa o rojo que pueden presentar un halo de precipitación de bilis alrededor. *K. pneumoniae*, por su parte, se caracteriza por crecer en forma de colonias grandes con un aspecto mucoso de color rojo o rosa (Condalab, 2022).

3.2.2. Medio SCAi

El agar **citrato de Simmons con mio-inositol** al 1% (SCAi; Oxoid) es un medio selectivo y diferencial que se utiliza de forma específica para el aislamiento de cepas de *K. pneumoniae* procedentes de alimentos. A diferencia de otros medios, en SCAi el tiempo de incubación adecuado para discriminar correctamente las colonias es de 48 h a 44 °C de temperatura. Sin embargo, en ocasiones ya durante las primeras 24 h se pueden observar colonias típicas de *Klebsiella* spp., amarillas, mucosidades y con forma de cúpula, debido a que fermentan el inositol y producen metabolitos ácidos que reducen el pH y hacen que el indicador vire de azul a amarillo. *E. coli*, por su parte, no utiliza el inositol y forma colonias blancas. Existe un pequeño porcentaje de *K. pneumoniae* que pueden verse azules debido a que no metabolizan el inositol, pero sí el citrato. Además, también es posible que si hay muchas bacterias fermentadoras de inositol, el medio en su conjunto se torne amarillo, haciendo difícil la discriminación de cepas. En este caso sería recomendable diluir y reaislar en otra placa (Rodrigues *et al.*, 2020; 2022).

3.2.3. Medio ESBL

CHROMID® ESBL (bioMérieux) es un medio selectivo cromogénico utilizado para la detección de enterobacterias productoras de BLEE. Este agar contiene una mezcla de antibióticos como la cefpodoxima, una cefalosporina de tercera generación insensible frente a las bacterias productoras de estas enzimas.

Los medios de cultivo cromogénicos como este contienen sustratos incoloros que, al ser hidrolizados por las bacterias de interés, producen una coloración característica en cada una de ellas. En este caso se incluyen dos sustratos cromogénicos y un sustrato natural que permiten la identificación directa de los microorganismos productores de BLEE más frecuentes:

- *E. coli*: coloración espontánea, entre rosa y burdeos, de las cepas productoras de beta-glucuronidasa.
- KESC (*Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*): coloración de verde-azulada a pardo-verdosa de las colonias productoras de beta-glucosidasa.
- *Proteaeae* (*Proteus, Providencia, Morganella*): coloración de pardo a marrón de las cepas productoras de desaminasa.

3.2.4. Medio CARBA

CHROMID® CARBA SMART (bioMérieux) es otro medio de cultivo cromogénico y selectivo que permite únicamente el crecimiento de Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas gracias a una mezcla de antibióticos. Asimismo, este agar consta de tres sustratos cromogénicos para la identificación de:

- *E. coli*: adquisición de un color que puede variar de rosa a burdeos de aquellas cepas productoras de beta-glucuronidasa o beta-galactosidasa.
- KESC (*Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter*): coloración entre azulada-verdosa y azulada-grisácea de las cepas que producen beta-glucosidasa.

Las cepas recuperadas en cada uno de los cuatro medios anteriores fueron conservadas mediante siembra por picadura en tubos de conservación Vacutainer™ con agar nutritivo con un 0,75% (p/v) de agar y se mantuvieron a temperatura ambiente para su posterior identificación y caracterización.

3.2.5. Galerías multipruebas API® 20 E™

Para la identificación de cepas cuyo resultado en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: *Polymerase Chain Reaction*) no fue concluyente, se empleó un sistema de **identificación bioquímica API20E** (bioMérieux), que permite identificar Enterobacterias y otros bacilos Gram-negativos no exigentes. API incluye 20 pruebas en miniatura cuyos resultados se pueden consultar en una base de datos. En cada una de las celdas hay sustratos deshidratados que reaccionan con las muestras produciendo cambios de color por medio de un indicador de pH.

El procedimiento consiste en inocular en cada pocillo una suspensión de la colonia de interés, aislada previamente en un medio de cultivo general como **Agar Triptona de**

Soja (TSA; Oxoid) (18-24 h, 37 °C), en agua MiliQ estéril. Tras incubar la galería durante 18-24 h a 37 °C se procede a su lectura e interpretación de acuerdo con una plantilla proporcionada por el fabricante, en la cual se indica si el resultado de cada reacción es positivo o negativo en función de la coloración, que puede ser de lectura directa o tras la adición de reactivos en algunas reacciones concretas.

Dependiendo de las reacciones positivas se obtiene un perfil numérico de 7 cifras el cual se corresponde con una especie de enterobacteria o bacilo Gram-negativo registrado en un catálogo. Si el resultado no fuese concluyente, se podrían realizar 7 pruebas bioquímicas adicionales, o bien emplear otras técnicas.

3.2.6. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Una de las técnicas que también se puede utilizar para la identificación de microorganismos es el sistema **MALDI-TOF MS**. En este trabajo se recurrió a ella para la confirmación de *K. pneumoniae* en cepas aisladas del medio SCAi, que fueron enviadas al Laboratorio de Sanidad y Producción Animal de Galicia (LASAPAGA), donde cuentan con un equipo VITEK MS®.

La espectrometría de masas MALDI-TOF se basa en la ionización, mediante pulsos cortos de láser, de muestras dispuestas sobre una placa metálica conductora a la que se añade una matriz orgánica (ácido cinámico o derivados del ácido benzoico) para provocar su cocrystalización. Las moléculas, principalmente proteínas ribosomales, son aceleradas por medio de un campo electromagnético y pasan por un analizador TOF, donde los iones más pequeños viajan a mayor velocidad que los grandes en función de su masa. Con cada muestra, el detector produce un espectro y lo compara con una base de datos para la identificación de la cepa de acuerdo con su “huella peptídica”. También se ofrece un valor de similitud que, de ser superior a 2, se considera correcto para la determinación de la especie (Croxatto *et al.*, 2012).

Sin embargo, esta tecnología se puede utilizar, además de para la identificación bacteriana, para la detección de hongos, levaduras y virus; e incluso para el diagnóstico microbiológico directo desde muestras de sangre u orina, así como para la búsqueda de marcadores asociados al resistoma, el conjunto de genes de resistencia a antibióticos presentes en una bacteria. Por tanto, sus posibilidades en microbiología clínica son enormes y seguirán siendo, sin duda, muy prometedoras de cara al futuro.

3.3. Caracterización fenotípica de RAM

Para la caracterización fenotípica de RAM se realizaron antibiogramas de acuerdo con el método de difusión disco-placa, basado en la capacidad de los antibióticos de difundir radialmente desde un disco creando un gradiente (García Rodríguez *et al.*, 2000). Se utilizaron tres placas de Petri con 25 mL de medio de **Mueller-Hinton** (MH; Oxoid) por cada cepa. El MH es un medio no selectivo y no diferencial utilizado específicamente para la realización de esta técnica, debido a su composición, favorable a la difusión del contenido de los discos y al crecimiento en césped, ocupando toda la placa, del microorganismo de interés. Esta técnica se utiliza de rutina, junto con la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), para evaluar la susceptibilidad de las bacterias frente a uno o varios tratamientos, en aras de predecir su eficacia clínica.

3.3.1. Preparación del inóculo

Se siguió el método de suspensión directa de colonias, según el cual se recoge el crecimiento equivalente a entre 3 y 5 colonias en TSA (37 °C, 18-24 h) y se resuspende en 4,5 mL de solución salina (ID Phoenix™ BD). Usando 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).

3.3.2. Inoculación de las placas

La inoculación se realizó mediante un hisopo que fue introducido en la suspensión y rotado varias veces contra las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo. Es entonces cuando se realizó la siembra superficial, en césped, de tres placas con el medio MH, cubriendo de forma homogénea toda la superficie con un espesor aproximado de 4 mm. A continuación, se esperó 5 min a que el medio absorbiera el inóculo con la placa cerrada y la tapa hacia arriba.

3.3.3. Dispensación de los discos

Los discos de antibióticos fueron dispensados con los dispensadores automáticos Sensi-Disc™ Dispenser II (BBL™) y presionados ligeramente con una pinza para asegurarse de que contactaran con la superficie del agar en cada una de las tres placas. Posteriormente se esperó un máximo de 15 min para dejar difundir el antibiótico con la placa cerrada y la tapa hacia arriba para, acto seguido, dejarlas incubar a 37 °C durante 16-18 h.

3.3.4. Lectura e interpretación de resultados

Antes de proceder a la lectura hay que tener en cuenta que cuando se presentan colonias en el interior de los halos puede tratarse de mutantes resistentes, contaminaciones, poblaciones heterogéneas o cultivos mixtos. De esta forma, se leyó el diámetro de los halos de inhibición en mm y se interpretó de acuerdo con los puntos de corte (Tabla 3) del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) en lugar del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). En CLSI se establecen tres categorías dependiendo de la sensibilidad al antimicrobiano en cuestión: Resistente (R), Sensible (S) e Intermedia (I) En EUCAST, por su parte, solo se establecen R y S. En la actualidad, se está tratando de utilizar siempre el criterio del EUCAST, aceptado por organismos europeos como el ECDC, la EMA o la *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* (ESCMID); a diferencia del CLSI, que es un estándar americano que colabora con organizaciones estadounidenses como el CDC (Larrosa *et al.*, 2020).

En este estudio se incluyeron las siguientes familias de antibióticos:

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

Antimicrobiano	Disco (μg)	CLSI-2023 (mm)			EUCAST-2024 (mm)	
		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
Cefazolina	CZ30	≤ 14		≥ 15	< 20	≥ 50
Cefuroxima	CXM30	≤ 14	15-17	≥ 18	< 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	≤ 14	15-16	≥ 17	< 18	≥ 18
Gentamicina	GM10	≤ 12	13-14	≥ 15	< 17	≥ 17
Tobramicina	NN10	≤ 12	13-14	≥ 15	< 16	≥ 16
Colistina	CL10	≤ 10		≥ 11		
Doxiciclina	D30	≤ 10	11-13	≥ 14		≥ 19
Fosfomicina	FOS200	≤ 12	13-15	≥ 16	< 24	≥ 24
Cloranfenicol	C30	≤ 12	13-17	≥ 18	< 17	≥ 17
Nitrofurantoína	FM100	≤ 14	15-16	≥ 17	< 11	≥ 11
Ciprofloxacina	CIP5	≤ 21	22-25	≥ 26	< 22	≥ 25
Clotrimoxazol	SXT25	≤ 10	11-15	≥ 16	< 11	≥ 14
Ácido Nalidíxico	NAL30	≤ 13	14-18	≥ 19		

Tabla 3. Antibióticos utilizados e interpretación del halo de inhibición (CLSI, 2023; EUCAST, 2024.).

3.4. Caracterización genotípica de las cepas y RAM

3.4.1. PCR convencional

3.4.1.1. Extracción del ADN

La extracción del material genético se realizó a partir de colonias aisladas crecidas en TSA o a partir del crecimiento confluyente de las placas de ML.

Con un asa estéril de 1 μL se preparó una suspensión equivalente a una colonia y se diluyó en 600 μL de agua destilada autoclavada en tubos Eppendorf. A continuación, se calentaron las suspensiones durante 5 min a 100 $^{\circ}\text{C}$ para, acto seguido, centrifugarlas

a 11.000 rpm durante 2 minutos. De esta forma, en el sobrenadante quedó el ADN bacteriano, del cual se utilizarán 5 μ L para la reacción de PCR, y en el *pellet* el resto de componentes celulares.

3.4.1.2. Mezcla de reacción

Para la mezcla de reacción se utilizó el reactivo NZYTMTaq II 2x Green Master Mix (NZYTech), el cual ya incluye en su composición MgCl₂, dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y la Taq polimerasa en concentraciones optimizadas, junto con el resto de los reactivos que se muestran en la Tabla 4.

NZY TM Taq II 2x Green Master Mix	Primer F	Primer R	Agua	ADN
12,5 μ L	1 μ L	1 μ L	5,5 μ L	5 μ L

Tabla 4. Cantidades de reactivos para PCR general.

Cabe destacar que el volumen de los *primers* (Anexo) está optimizado para cada gen a amplificar, por lo que la cantidad de agua se ajustó hasta llegar a un volumen de mezcla de reacción de 20 μ L, alcanzando un volumen final de 25 μ L al añadir el material genético.

3.4.1.3. Amplificación del ADN

La amplificación del material genético se realizó en termocicladores modelo Veriti 96-Well Fast Thermal Cycle (Applied Biosystems) de acuerdo con el siguiente programa:

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

3.4.1.4. Revelado de los resultados

La lectura de los resultados se realizó mediante electroforesis convencional en gel de agarosa (Agarose D1 LE, Intron Biotechnology) al 1,5 % o 3 % dependiendo de los genes amplificados. Para la visualización de los productos amplificados se añadieron 3 μ L de Green Safe Premium (Nzytech) por cada 100 mL de gel.

En cada pocillo se cargaron 10 μ L de muestra amplificada, incluyendo los controles negativos y positivos correspondientes. Se emplearon fuentes y cubetas Bio-Rad, aplicando un voltaje de 120 V durante 25-40 min, dependiendo del tamaño del gel y del gen amplificado. Por último, se visualizaron los resultados con luz ultravioleta en un lector Gel Doc XR de Bio-Rad.

De acuerdo con este procedimiento se realizaron PCR para:

- Confirmación de *E. coli* a través de la detección del gen *uidA*, que codifica para una beta-glucuronidasa específica de esta especie.
- Confirmación de *K. pneumoniae* mediante amplificación del gen *kp50233*, marcador específico de la especie, que codifica para una aciltransferasa.
- Determinación del antígeno O25b asociado al serotipo O25b, al cual pertenece el clon pandémico ST131, por medio de la detección del gen *rfbO25b*.
- Identificación de las verotoxinas 1 y 2 (genes *stx1/stx2*) asociadas al patotipo VTEC.
- Identificación del gen de la intimina *eae* y el del pili sexual *bfp*, asociados al patotipo EPEC.
- Detección de los genes de virulencia *iutA*, *kpsM II* y *papAH* codificantes para un sideróforo, una cápsula, y una subunidad de una fimbria adhesiva, respectivamente, asociados al grupo de ExPEC.
- Detección mediante PCR múltiple de los genes *mcr 1-5* asociados con la resistencia a colistina mediada por plásmidos.
- Determinación y tipificación de los genes de resistencia *bla_{BLEE}* (CIT, SHV, CTX-M), para ver el tipo de BLEE.
- Establecimiento del grupo filogenético (GF) de *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E, F) mediante PCR cuádruple (*arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TSpE.4.C2*).

3.4.2. Secuenciación Sanger

Los genes amplificados que fueron enviados a la Plataforma de Secuenciación y Genómica Funcional (Departamento de Genética de la Facultad de Veterinaria, Campus Terra) para **secuenciación Sanger** se obtuvieron realizando una PCR con un volumen final de 50 μ L (49 μ L de mezcla de reacción y 1 μ L de ADN). En este caso se emplean 500 μ L de agua MiliQ para la extracción del material genético de cada cepa, se utilizan puntas con filtro, y la mezcla de reacción se prepara de manera diferente. Se añaden por

separado 0,2 μL de enzima MyTaq™ DNA polymerase (Bioline) y 10 μL de 5x My Taq™ Reaction Buffer (Bioline), el cual ya incluye los dNTPs y el MgCl_2 .

No obstante, estas mezclas son incoloras por lo que, una vez finalice la PCR convencional y antes de proceder a cargar las muestras en el gel de agarosa, se deben añadir en una placa de 96 pocillos 2 μL de un tampón de carga a 5 μL de muestra amplificada para poder visualizar los fragmentos, mezclándolos bien en una de las celdillas antes de cargar los 7 μL en el gel.

Una vez que se comprueba que las muestras y el control negativo se visualizan correctamente (Figura 4), estas son enviadas a la Plataforma de Secuenciación y Genómica Funcional, donde se realizará una secuenciación Sanger. Este procedimiento consiste en la adición de didesoxinucleótidos (ddNTPs) terminadores de la cadena de ADN que está siendo replicada por la polimerasa, de un modo semejante a lo que ocurre en la PCR. Cada ddNTP está marcado con un pigmento diferente en función de la base nitrogenada que contenga, y esta es detectada gracias a un láser que ilumina los fragmentos obtenidos al pasar a través del gel en una electroforesis capilar, dando como resultado un cromatograma con los picos de la secuencia de ADN completa (Crossley *et al.*, 2020).

Siguiendo este procedimiento se secuenciaron en la Plataforma de Secuenciación y Genómica Funcional los genes *bla_{CTX-M}* (realizando una PCR previa de discriminación entre grupo 1 y grupo 9) y los genes *fimH* y *fumC* para determinación del clonotipo (CH). A las secuencias proporcionadas se les realizó un análisis *in silico* en el *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) utilizando las herramientas ResFinder 4.5, KmerResistance 2.2, FimTyper 1.0 y CHTyper 1.0 (<http://www.genomicepidemiology.org/services/>).

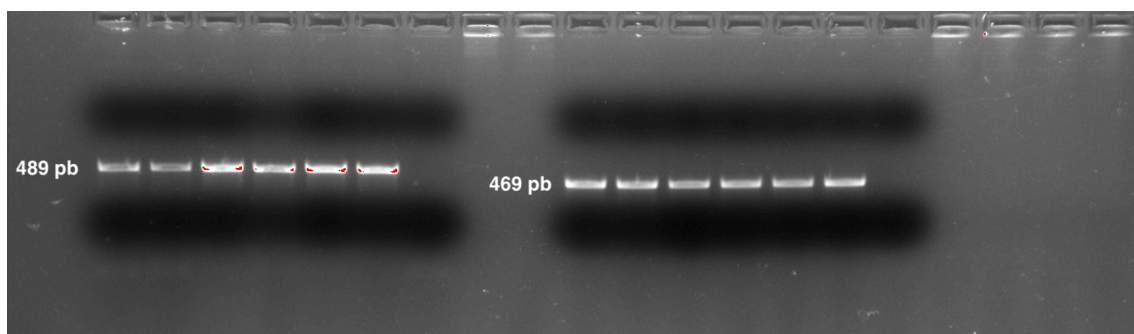


Figura 4. Gel de electroforesis para PCR previa a secuenciación de los genes *fimH*, izquierda, y *fumC*, derecha (*Pb*: Pares de bases).

3.5. Análisis estadístico de los datos

Para establecer una significación estadística a la hora de comparar la prevalencia de RAM y otros indicadores entre diferentes estudios se aplicó el **test exacto de Fisher** de dos colas para determinar el grado de asociación estadística entre las variables, considerándose como significativos valores inferiores a 0,05 ($P < 0,05$).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de las RAM, tanto en la carne como en las heces de *Sus scrofa*, no ha sido analizado en profundidad hasta el momento. Y es que, pese a que el número de publicaciones sobre el tema ha aumentado notablemente en los últimos años, estas se han centrado más en *E. coli* que en *K. pneumoniae* (Torres *et al.*, 2020). En el LREC-USC, no obstante, se ha llevado a cabo, paralelamente a este trabajo, otro estudio sobre “El jabalí como centinela en la perspectiva de una salud única (*One Health*)”, centrado en el análisis de la microbiota en heces de jabalíes procedentes de la misma zona de Asturias, por lo que se establecerán comparaciones entre ambos en la discusión de los resultados.

4.1. Recuperación e identificación de Enterobacteriaceae

4.1.1. Recuperación de Enterobacteriaceae

En primer lugar, se llevó a cabo una identificación fenotípica basada en la morfología de las colonias que crecieron en los medios de cultivo, que permiten además el aislamiento de los microorganismos desde las muestras enriquecidas en el caldo MacConkey. Las colonias compatibles con *E. coli* en ML presentan, en su mayoría, una coloración rojiza propia de bacterias lactosa positivas. En este estudio hubo crecimiento compatible con *E. coli* en ML en todas las muestras analizadas.

Con respecto al medio SCAi, en 8 de las 29 carnes se detectó *K. pneumoniae*, siendo así la prevalencia de *Klebsiella* spp. del 27,6 %. La coloración amarilla de las colonias en este agar (Figura 5, dcha.) es, presuntivamente, indicativa de este género de Enterobacteriaceae causante de infecciones nosocomiales.

Tres de las 29 carnes presentaron crecimiento en el medio cromogénico CHROMID® ESB, detectándose colonias con una coloración compatible con *E. coli* (Figura 5 izda.). Este hallazgo es indicativo de una prevalencia de enterobacterias productoras de BLEE del 10,3 % sobre el total, si bien, con relación a este dato no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) con respecto al 2,5 % que se observó en el estudio de heces de jabalí (2 animales portadores de *E. coli* BLEE sobre un total de 81). En este sentido, algunas publicaciones muestran que tampoco existen diferencias significativas en la prevalencia de cepas RAM entre carnes de especies domésticas como los cerdos y salvajes como los jabalíes (Rega *et al.*, 2022).

Por el contrario, en lo que se refiere al otro agar cromogénico, CHROMID[®] CARBA, no se obtuvo crecimiento compatible en ninguna de las placas, por lo que no se detectaron cepas de enterobacterias productoras de carbapenemasas en estas carnes.

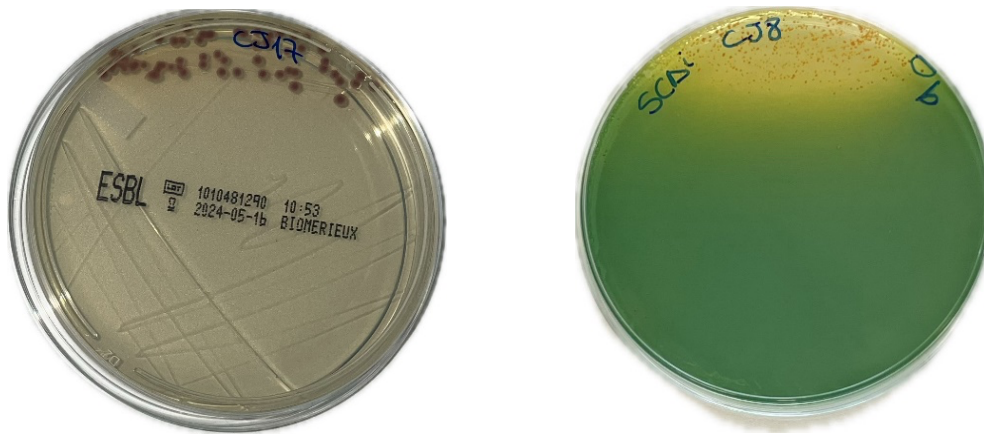


Figura 5. Placa CHROMID[®] ESBL con colonias rojas compatibles con *E. coli* productoras de BLEE (izquierda) y placa con medio SCAi y colonias amarillas compatibles con *K. pneumoniae* (derecha).

Seguidamente, basándonos en técnicas de biología molecular, concretamente en la PCR, se realizó la identificación de las colonias presuntivas de *E. coli* aisladas de ML y de CHROMID[®] ESBL mediante la amplificación del gen *uidA*, con resultado positivo en todas las colonias excepto en 3. Este marcador, el cual codifica para una beta-glucuronidasa, se detecta hasta en un 94 % de las cepas de *E. coli*, por lo que es altamente específico de esta especie (Feng *et al.*, 1991). Las 3 colonias cuya morfología era compatible con *E. coli* pero que mostraron un resultado negativo en la PCR de *uidA*, fueron sometidas a una identificación bioquímica por medio de las galerías API 20 E. La especie se confirmó en 2 de ellas, aunque en una el resultado no fue concluyente y se envió al LASAPAGA para establecer una determinación proteómica de acuerdo con el sistema MALDI-TOF, que confirmó finalmente la especie como *E. coli*.

Por su parte, las 8 colonias aisladas del medio SCAi cuya morfología fue compatible con *Klebsiella* spp. fueron sometidas a otra PCR, en este caso del gen *kp50233*, codificante para una aciltransferasa también específica de *K. pneumoniae* (Bialek-Davenet *et al.*, 2014). En este caso, todas las colonias fueron positivas para dicho marcador. Para validar tanto el medio SCAi para la recuperación de esta especie, como la especificidad de la PCR del gen *kp50233*, las 8 colonias fueron también analizadas mediante MALDI-TOF, confirmándose la identidad de todas ellas como *K. pneumoniae*.

4.1.2. Recuperación de cepas potencialmente zoonóticas

Tras la realización de PCR en los confluentes de las placas de ML para los genes asociados a patotipos VTEC, EPEC, ExPEC y *O25b*, se obtuvieron resultados positivos para los genes *eae* y *bfp* en una de las 29 carnes analizadas (3,4 %) y para *O25b*, *papAH* y *kpsMII* en otra de ellas (3,4 %). Para encontrar las colonias individuales que presentasen dichos genes se realizaron PCR de colonias aisladas (hasta un máximo de 10) recuperándose 2 cepas, cada una de ellas con los genes mencionados, que fueron posteriormente analizadas para filogrupos y clonotipo (CH).

Los genes *eae* y *bfp* (codificadores de la intimina y el pili de unión a células, respectivamente) se asocian con el patotipo de *E. coli* intestinal EPEC típico, causante de diarrea infantil. Este se caracteriza por la adhesión a los enterocitos del intestino delgado por medio de esta intimina, que es un tipo de adhesina. El hecho de que también contenga la fimbria tipo IV codificada por el gen *bfp* (*bundle-forming pilus*), que contribuye del mismo modo a la unión a las células intestinales del hospedador (Kaper, 2005), hace que sean considerados EPEC típicos. Si se tratara de una cepa positiva solo para *eae*, sin *bfp*, sería una EPEC atípica. Estas últimas son más habituales en mamíferos como el jabalí, de hecho, en un estudio llevado a cabo en la Toscana (Italia) se han encontrado en un 3,4% (Bertelloni *et al.*, 2020).

Por otra parte, *papAH* (fimbria adhesiva) y *kpsM II* (cápsula) son factores de virulencia asociados con patotipos de *E. coli* extraintestinales (ExPEC), entre los cuales se encuentran los UPEC causantes de ITU o los NMEC, responsables de sepsis y meningitis neonatal (Johnson *et al.*, 2003). Estos, al igual que los anteriores, favorecen la invasión, colonización y multiplicación de la bacteria en el organismo infectado. Además, el hecho de que esta cepa también haya ofrecido un resultado de PCR positivo para el gen *rfbO25b*, codificante para el antígeno O25b, hace que lo podamos asociar con el clon pandémico ST131.

Contrariamente, ninguna de las muestras presentó los factores de virulencia VT1/VT2, verotoxinas asociadas al patotipo VTEC, ni los genes de resistencia *mcr-1* a *mcr-5* asociados con la resistencia a colistina mediada por plásmidos.

Cabe destacar que en otro trabajo sobre fauna silvestre sí se identificaron y caracterizaron cepas de *E. coli* ST131 y ExPEC en animales como zorros y jabalíes, si bien, no se encontraron cepas EPEC (Viso González, 2017).

4.2. Determinación genotípica y fenotípica de RAM

Una vez identificadas las cepas y establecida la colección se procedió al estudio del perfil de RAM, de forma fenotípica y genotípica. La importancia de realizar ambas determinaciones reside en el hecho de que, en ocasiones, las características genéticas de un microorganismo no se corresponden con rasgos observables debido a la interacción con componentes ambientales como el pH y la temperatura, a fenómenos epigenéticos como la metilación del ADN o a eventos mutacionales (Pierce, 2016).

4.2.1. Determinación genotípica de RAM

El screening por PCR de los genes *bla*_{BLEE} (CIT, SHV, CTX-M) realizado a las 3 colonias (10,3 % de las muestras) recuperadas del medio cromogénico CHROMID® ESB, confirmó que todas ellas presentaban el gen *bla*_{BLEE} CTX-M (2 del grupo 1 y 1 del grupo 9). Para determinar el tipo de CTX-M se envió a secuenciar y, por medio de las herramientas ResFinder 4.5 y KmerResistance 2.2 del CGE, se tipificaron 2 de ellas como *bla*_{CTX-M-15} y 1 como *bla*_{CTX-M-27} (33,33 %). Mediante esta herramienta bioinformática podemos subir nuestras secuencias *forward* y *reverse* en formato “. fasta” y tipificar el gen *bla* concreto de interés.

Cabe destacar que tanto *bla*_{CTX-M-15} como *bla*_{CTX-M-27}, son genes frecuentemente reportados en bacterias implicadas en infecciones humanas (Cave *et al.*, 2023). La enzima CTX-M-15 sí se había detectado previamente en un estudio en porcino, aunque podría haber sido debido a una contaminación humana, mientras que CTX-M-27 solo se tipificó en carne de pollo (Silva *et al.*, 2023). Con respecto a esta última enzima, sí se confirmó su presencia en especies silvestres como zorros, aunque no en jabalíes (Viso González, 2017). En este sentido, las rutas de transmisión de ambos genes deberían de ser analizadas de un modo más exhaustivo y completo para comprobar el posible origen de los mismos.

4.2.2. Determinación fenotípica de RAM

La realización de antibiogramas conforme al procedimiento de disco-placa (Figura 6) se llevó a cabo para 29 cepas de *E. coli* (para las 2 cepas potencialmente zoonóticas, para las 3 que portaban genes BLEE y para 1 cepa representativa de los 24 animales restantes) obteniendo así un perfil de resistencia fenotípica individual de las 29 piezas de carne analizadas.

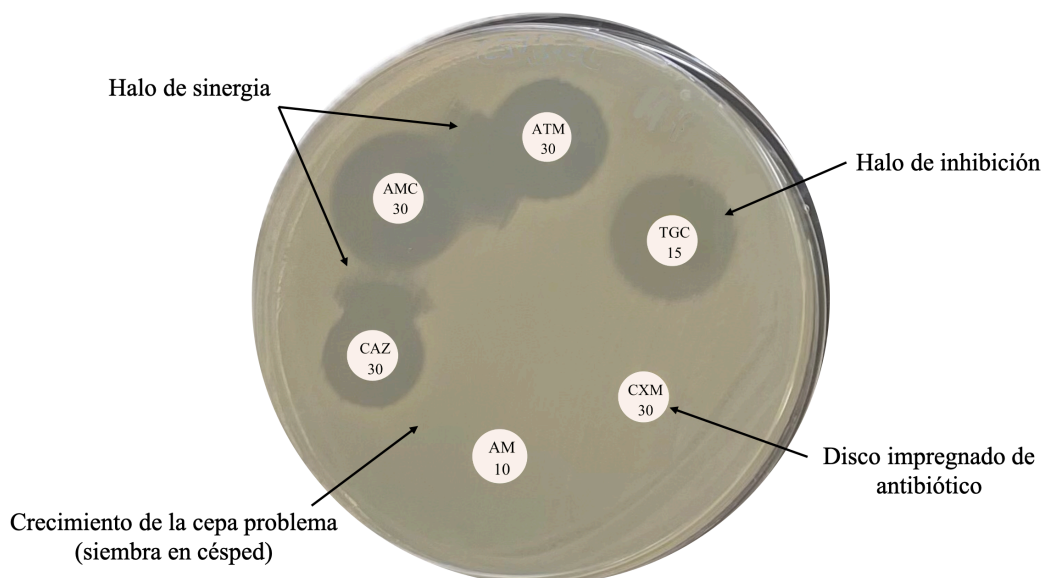


Figura 6. Antibiograma realizado mediante el método de difusión disco-placa en medio MH. Cada disco indica el antibiótico que contiene y la cantidad de este en μg (AMC: amoxicilina-ácido clavulánico; CAZ: ceftazidima; AM: ampicilina; CXM: cefuroxima; TGC: tigeciclina; ATM: aztreonam).

De las 29 cepas sometidas al estudio de sensibilidad, 7 presentaron resistencia a algún antibiótico (24,1 %), aunque ninguna de ellas estaba entre las potencialmente zoonóticas EPEC y ExPEC. Más allá de esto, todas fueron sensibles a ertapenem, cefoxitina, amikacina, colistina, fosfomicina y nitrofurantoína. Por el contrario, ampicilina, doxiciclina y clotrimoxazol son los antimicrobianos frente a los cuales un mayor porcentaje de cepas (> 20 %) se mostró resistente (Figura 7).

Asimismo, un 20,7 % de las cepas de *E. coli* analizadas fueron MDR, es decir, no presentaron sensibilidad frente a al menos un agente antimicrobiano en tres o más categorías distintas (Magiorakos *et al.*, 2012). Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre este porcentaje y el 3,7 % de cepas MDR (3 animales sobre un total de 81) detectadas en el estudio de la microbiota fecal del jabalí llevado a cabo en el mismo grupo de investigación del LREC.

En todos los antibiogramas de cepas productoras de BLEE se observó un **halo de sinergia** (Figura 6) formado entre la ceftazidima, el aztreonam y la amoxicilina-ácido clavulánico. Esto se debe al efecto inhibitorio de betalactamasas que ejerce el ácido clavulánico, dando lugar a una ampliación del halo de inhibición de la ceftazidima y del aztreonam en la dirección del propio clavulánico. Fenotípicamente este efecto se observa con una característica forma de cerradura o de corcho (Drieux *et al.*, 2008).

Por tanto, el mayor número de resistencias observado en la colección estudiada es frente a los antibióticos de la categoría D de la EMA para uso en veterinaria. En este grupo se incluyen antibióticos de primera línea como penicilinas o tetraciclinas, pero que han de usarse con prudencia, evitando su uso innecesario o en tratamientos largos (EMA, 2020). De entre los pertenecientes a la categoría A (uso no autorizado) destaca la resistencia al monobactámico aztreonam (13,8 %).

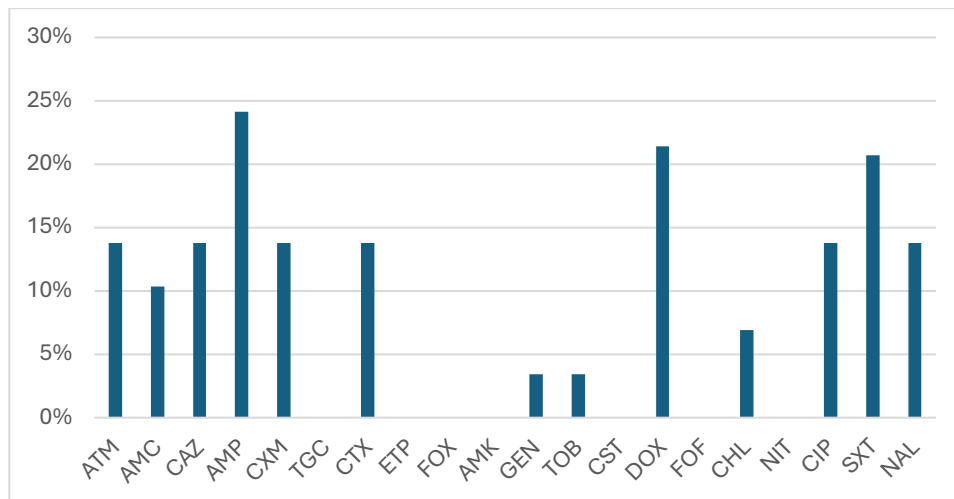


Figura 7. Porcentaje de las cepas analizadas que se mostraron resistentes a cada antibiótico conforme a los criterios del EUCAST-2024 (ATM: Aztreonam; AMC: Amoxicilina-Ácido clavulánico; CAZ: Ceftazidima; AMP: Ampicilina; CXM: Cefuroxima; TGC: Tigeciclina; CTX: Cefotaxima; ETP: Ertapenem; FOX: Cefoxitina; AMK: Amikacina; GEN: Gentamicina; TOB: Tobramicina; CST: Colistina; DOX: Doxiciclina; FOF: Fosfomicina; CHL: Cloranfenicol; NIT: Nitrofurantoína; CIP: Ciprofloxacina; SXT: Clotrimoxazol; NAL: Ácido nalidíxico).

4.3. Caracterización de aislamientos

En vista de los resultados, se consideran como cepas potencialmente zoonóticas y/o de riesgo potencial para los humanos, las detectadas en 5 de las 29 muestras (17,2 %): la ExPEC, la EPEC típica y las 3 productoras de BLEE.

Un patógeno zoonótico es aquel capaz de pasar de animales a humanos produciendo una enfermedad, por lo que todas ellas encajarían dentro de esta definición. Las ExPEC pueden causar septicemia e ITU, las EPEC dan lugar a diarrea infantil y las BLEE podrían pasar sus genes de resistencia a bacterias de la microbiota normal, en caso de que estos estuvieran codificados en plásmidos, o incluso fijarse en la propia microbiota.

Para confirmar este tipo de cuestiones habría que realizar una caracterización genómica más en profundidad, ya que en el presente trabajo solo se han determinado el GF y el CH de esas cepas (Tabla 5).

En cuanto a las dos cepas ExPEC y EPEC, ambas pertenecen al filogrupo B2, el cual se asocia mayoritariamente con infecciones extraintestinales (Clermont *et al.*, 2013). Gracias a los recursos FimTyper 1.0 y CHTyper 1.0 del CGE se ha podido establecer también el clonotipo *in silico* una vez secuenciados los genes *fimH* y *fumC*. En este caso, ofrecen combinaciones CH 67-57 (EPEC) y CH 40-22 (ExPEC). Este último clonotipo se corresponde con el complejo clonal ST131, y se había tipificado previamente en el LREC en mamíferos silvestres como los jabalíes, pero también en aves como las palomas (Viso González, 2017).

Con respecto a las tres cepas productoras de BLEE, todas ellas ofrecen una combinación CH 11-54, la cual podría estar circulando bidireccionalmente entre seres humanos y animales, ya que se ha detectado tanto en animales silvestres y aves como en humanos (Viso González, 2017). Asimismo, son pertenecientes al filogrupo A (Clermont *et al.*, 2013, 2019), asociado con el patotipo InPEC. Además, como se comentó anteriormente, los tipos de enzimas BLEE determinadas, se han identificado en cepas causantes de infecciones humanas (Cave *et al.*, 2023).

En las 29 muestras de carne analizadas en el presente trabajo no se han caracterizado patotipos híbridos, pese a que en algunos estudios sí se han encontrado un tipo de clones híbridos VTEC-EPEC altamente virulentos en aislados de jabalíes (Perrat *et al.*, 2022).

Código cepa	Genes de virulencia	BLEE	GF	CH
CJ3c	<i>kpsM II papAH O25b</i>		B2	40-22
CJ13c		<i>bla_{CTX-M-27}</i>	A	11-54
CJ17b		<i>bla_{CTX-M-15}</i>	A	11-54
CJ21d		<i>bla_{CTX-M-15}</i>	A	11-54
CJ26c	<i>eae bfp</i>		B2	67-57

Tabla 5. Caracterización de las cepas EPEC, O25b y BLEE (CJ: Carne de jabalí; BLEE: Betalactamasa de espectro extendido; GF: Grupo filogenético; CH: Clonotipo).

4.4. Valoración del riesgo microbiológico del consumidor

El establecimiento de la calidad microbiológica con respecto a la presencia de *E. coli* en carne de jabalí se llevó a cabo mediante el recuento de colonias en Petrifilm™ selectivo para esta especie. Un 27,6 % de las muestras (8 de 29) mostraron <10 UFC/g al no contarse ninguna colonia, mientras que en el 72,4 % restante (21 de 29) sí se pudo realizar el conteo de *E. coli*. Aunque no existen demasiados estudios que valoren el riesgo microbiológico del consumidor de carne de caza, estos datos son significativamente superiores ($P < 0,05$) al 21 % de carnes de jabalíes con recuento de *E. coli* superior a 10 UFC/g de otro trabajo realizado en Italia (Rega *et al.*, 2022).

Utilizando como marco el Reglamento (CE) nº 2073/2005, hay que indicar que no existe una especificación para carne de caza, y en concreto para jabalí. Pero si tomamos como referencia la categoría de alimento para preparados de carne en general, se establece un valor satisfactorio de *E. coli* por debajo de 500 UFC/g, aceptable entre 500 y 5000 UFC/g e insatisfactorio por encima de 5000 UFC/g. Conforme a estos criterios, casi un 59 % de las muestras de carne de jabalí analizadas ofrecen una calidad microbiológica no satisfactoria (aceptable o insatisfactoria), con más de 500 UFC/g de *E. coli* (Figura 8).

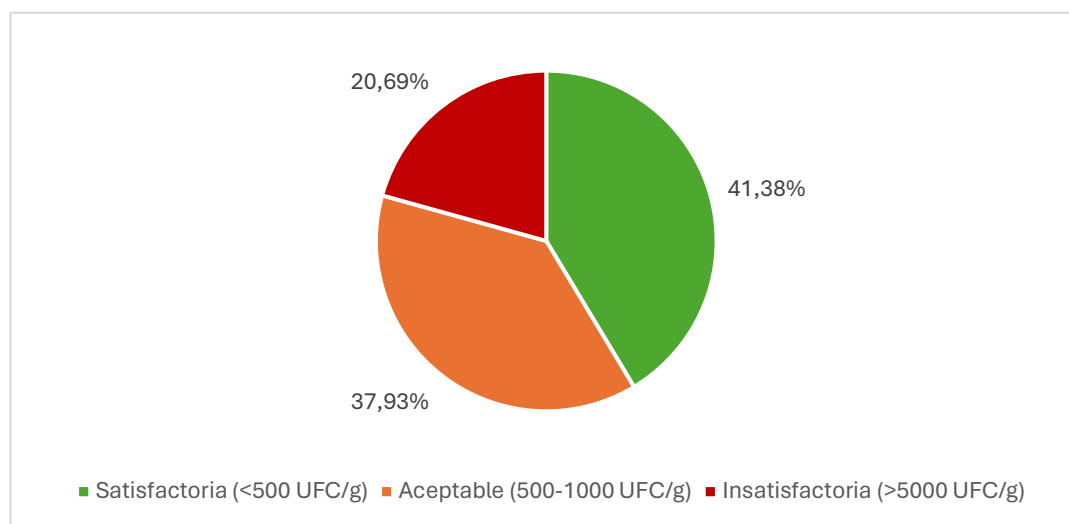


Figura 8. Calidad microbiológica para *E. coli* de las carnes de jabalí conforme al Reglamento (CE) nº 2073/2005 (UFC/g: Unidades formadoras de colonias por gramo).

5. CONCLUSIONES

- I. La carne de jabalí puede ser vehículo de transmisión de enterobacterias potencialmente patógenas para el consumidor, incluidas *E. coli* productoras de BLEE y *K. pneumoniae*.
- II. La caracterización de una cepa de *E. coli* enteropatógena típica, EPEC (*eae* y *bfp*) y una extraintestinal, ExPEC (*kpsM II*, *papAH* y *O25b*), apunta a una posible contaminación de origen humano durante la manipulación de las piezas de carne.
- III. El hecho de que un 20,7 % de los alimentos portaran *E. coli* MDR junto con la detección, en las cepas productoras de BLEE, de los genes *bla*_{CTX-M-15} y *bla*_{CTX-M-27}, típicamente asociados a bacterias colonizadoras de humanos, sugiere una elevada contaminación antropogénica del hábitat de los jabalíes. En este sentido, se debería de seguir explotando el potencial de *Sus scrofa* como centinela del flujo de RAM bajo una perspectiva *One Health*.
- IV. En vista de los hallazgos de este estudio, sería necesario establecer criterios microbiológicos oficiales específicos para *E. coli* en carne de caza, considerando asimismo el análisis de *K. pneumoniae*. También se debería informar a cazadores y consumidores sobre la correcta manipulación y conservación de este tipo de carne para garantizar la seguridad alimentaria.

6. ANEXOS

6.1. Compilación general de *primers*

Gen	Primers	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Tamaño (pb)	T ^a de hibridación (°C)	Referencia
PCR confirmación <i>E. coli</i>					
<i>uidA</i>	uidA-F	GCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGG	503	66	(Gómez-Duarte <i>et al.</i> , 2010)
	uidA-R	GTTGCCCGCTTCGAAACCAATGCCT			
PCR confirmación <i>K. pneumoniae</i>					
<i>kp50233</i>	50233F	GCTCTGGGAGATAGACCGCA	484	67	(Bialek-Davenet <i>et al.</i> , 2014)
	50233R	GCGATSGCAGACCAGATGAAT			
PCR detección del gen <i>rfbO25b</i>					
<i>rfbO25b</i>	<i>rfbO25b</i> . r	TGCTATTCATTATGCGCAGC	300	56	(Clermont <i>et al.</i> , 2008)
	<i>rfb</i> .1bis	ATACCGACGACGCCGATCTG			
PCR detección de genes de virulencia de <i>E. coli</i> extraintestinales y diarreagénicos					
<i>eae</i>	EAE-V3F	CATTGATCAGGATTTTTCTGGT	510	54	(Mora <i>et al.</i> , 2011)
	EAE-MBR	TCCAGAATAATATTGTATTACG			
<i>bfp</i>	BFP-NF1	ATGGTTTCTAAAATCATGAATAAG	262	55	(Díaz Jiménez, 2021)
	BFP-NR1	ATTATTCCGGAATTGCAGATGTGT			(García-Meniño <i>et al.</i> , 2018)
<i>iutA</i>	aer-851F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	301	66	(Johnson <i>et al.</i> , 1997)
	aer-1152R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG			
<i>kpsM II</i>	KpsII f	GCGCATTTGCTGATACTGTTG	272	60	(Johnson & Stell, 2000)
	KpsII r	CATCCAGACGATAAGCATGAGCA			
<i>papAH</i>	papA-F	ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG	720	70	(Johnson & Stell, 2000)
	papA-R	CGTCCCACCATACGTGCTCTTC			

PCR gen <i>mcr</i> (resistencia colistina)					
<i>mcr-1</i>	mcr1_32 0bp_fw	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	58	(Rebelo <i>et al.</i> , 2018)
	mcr1_32 0bp_rev	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG			
<i>mcr-2</i>	mcr2_70 0bp_fw	CAAGTGTTGGTTCGAGTT	715	58	(Rebelo <i>et al.</i> , 2018)
	mcr2_70 0bp_rev	TCTAGCCCGACAAGCATAACC			
<i>mcr-3</i>	mcr3_90 0bp_fw	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	58	(Rebelo <i>et al.</i> , 2018)
	mcr3_90 0bp_rev	AATGGAGATCCCCGTTTTT			
<i>mcr-4</i>	mcr4_11 00bp_fw	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1116	58	(Rebelo <i>et al.</i> , 2018)
	mcr4_11 00bp_rev	TTGGTCCATGACTACCAATG			
<i>mcr-5</i>	MCR5_F W	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	50	(Borowiak <i>et al.</i> , 2017)
	MCR5_R V	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG			
PCR tipificación BLEE					
<i>blaCTX-M</i>	CTX-C3	ATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATG	542	55	(Mora <i>et al.</i> , 2013)
	CTX-C4	ACCGCGATATCGTTGGTGGTGCC			
<i>blaCTX-M grupo1</i>	M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	863	60	(Saladin <i>et al.</i> , 2002)
	M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
<i>blaCTX-M-grupo1</i>	^a CTX-15-F1	GAAGCTAATAAAAAACACACGTGG	1044- 1123	52	(Mora <i>et al.</i> , 2013)
	^a CTX-15-R	GTATGCGCAAGCGCAGGTGG			
<i>blaCTX-M grupo9</i>	CTX-M9-F	GTGACAAAGAGAGTGCAACGG	856	64	(Simarro <i>et al.</i> , 2000)
	CTX-M9-R	ATGATTCTCGCCGCTGAAGCC			
<i>blaCTX-M grupo9</i>	^a CTX-M9-14-14B-24F	GAATACTGATGTAACACGGA	998	44	(García-Meniño <i>et al.</i> , 2018)
	^a CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			

<i>blaCTX-M grupo9</i>	^a CTX-M9-14-14B-24F	GAATACTGATGTAACACGGA	989	52	(García-Meniño <i>et al.</i> , 2018)
	^a CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>blaCTX-M grupo9</i>	^a CTX-M9-14B-F	CCTATACCCGAGGCGCGACAG	1059	44	(García-Meniño <i>et al.</i> , 2018)
	^a CTX-M9-R	AGCTGAAGATGTATATCAAG			
<i>blaCTX-M grupo9</i>	^a CTX-M14-24-F	CTAAATTCTTCGTGAAATAGTG	1049	44	(García-Meniño <i>et al.</i> , 2018)
	^a CTX-M14-24-R	CTGCGTTGTCGGGAAGATACG			
<i>blaSHV</i>	SHV-F2	TTGTCGCTTCTTTACTCGCC	879	64	(Mora <i>et al.</i> , 2013)
	SHV-R2	CCCGGCGATTTGCTGATTTCCG			
PCR clonotipado					
<i>fimH</i>	fimH-F	CACTCAGGGAACCATTCAGGCA	489	54	(Weissman <i>et al.</i> , 2012)
	fimH-R	CTTATTGATAAACAAAAGTCAC			
<i>fumC</i>	fumCF	TCACAGGTCGCCAGCGCTTC	469	56	(Wirth <i>et al.</i> , 2006)
	fumCR	GTACGCAGCGAAAAAGATTC			
PCR grupo filogenético					
<i>chuA</i>	chuA.1b	ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	58	(Clermont <i>et al.</i> , 2013)
	chuA.2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA			(Clermont <i>et al.</i> , 2000)
<i>yjaA</i>	yjaA.1b	CAAACGTGAAGTGTGAGGAG	211	58	(Clermont <i>et al.</i> , 2013)
	yjaA.2b	AATGCGTTCCTCAACCTGTG			
<i>TspE4C2</i>	TspE4C2.1b	CACTATTGTAAGGTCATCC	152	58	(Clermont <i>et al.</i> , 2013)
	TspE4C2.2b	AGTTTATCGCTGCGGGTCGC			
<i>arpA</i>	AceK.f	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	58	(Clermont <i>et al.</i> , 2013)
	ArpA1.r	TCTCCCCATACCGTACGCTA			

<i>trpAgpC</i> (C)	trpAgpC.1	AGTTTTATGCCCAGTGCGAG	219	56	(Lescat <i>et al.</i> , 2013)
	trpAgpC.2	TCTGCGCCGGTCACGCC			
<i>arpA</i> (E)	ArpAgpE.f	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	57	(Lescat <i>et al.</i> , 2013)
	ArpAgpE.r	GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG			
<i>trpA</i>	trpBA.f	CGGCGATAAAGACATCTTCAC	489	56	(Clermont <i>et al.</i> , 2008)
	trpBA.r	GCAACGCGGCCTGGCGGAAG			
<i>ybgD</i> (G)	ybgD.1	TATGCGGCTGATGAAGGATC	177	59	(Clermont <i>et al.</i> , 2019)
	ybgD.2	GTTGACTAAGCGCAGGTCGA			
<i>cfaB</i> (F)	cfaB.1	CTAACGTTGATGCTGCTCTG	384		(Clermont <i>et al.</i> , 2019)
	cfaB.2	TGCTAACTACGCCACGGTAG			

^a *Primers* utilizados en PCR de secuenciación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN). (2022). *Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria 2021-2025*. https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/planes-estrategias/plan-nacional-de-control-de-la-cadena-alimentaria/doc_26_pncoca_2021_2025_v2_espana_tcm30-622467.pdf
- Bertelloni, F., Cilia, G., Bogi, S., Ebani, V. V., Turini, L., Nuvoloni, R., Cerri, D., Fratini, F., & Turchi, B. (2020). Pathotypes and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from wild boar (*Sus scrofa*) in Tuscany. *Animals*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/ani10040744>
- 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>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(12), 3317-3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -lactams and β -lactamase inhibitors: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *6*(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Campos, J., Mourão, J., Silveira, L., Saraiva, M., Correia, C. B., Maçãs, A. P., Peixe, L., & Antunes, P. (2018). Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014–2015. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *51*(1), 151-154. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.006>
- Cantón, R., Oliver, A., Coque, T. M., Varela, M. del C., Pérez-Díaz, J. C., & Baquero, F. (2002). Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(4), 1237-1243. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1237-1243.2002>
- Cave, R., Ter-Stepanyan, M. M., & Mkrtychyan, H. V. (2023). Short- and Long-Read Sequencing Reveals the Presence and Evolution of an IncF Plasmid Harboring *bla* CTX-M-15 and *bla* CTX-M-27 Genes in *Escherichia coli* ST131. *Microbiology Spectrum*, *11*(4). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00356-23>
- CDC. (2024). *Antimicrobial Resistance, Food, and Food Animals*. Antimicrobial Resistance, Food, and Food Animals. <https://www.cdc.gov/food-safety/foods/antimicrobial-resistance.html>
- Clermont, O., Bonacorsi, P., & Bingen, E. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. En *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 66, Número 10).

- Clermont, O., Lavollay, M., Vimont, S., Deschamps, C., Forestier, C., Branger, C., Denamur, E., & Arlet, G. (2008). The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *61*(5), 1024-1028. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn084>
- 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>
- CLSI. (2024). *CLSI*. Recuperado 28 de mayo de 2024, de <https://clsi.org>
- Condalab. (2022). *Agar MacConkey*. 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*, *32*(6), 767-775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Croxatto, A., Prod'hom, G., & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. En *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 36, Número 2, pp. 380-407). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Del Valle Martínez Rojas, D. (2009). Artículo de revisión Betalactamasas tipo AmpC: generalidades y métodos para detección fenotípica. En *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* (Vol. 29, Número 2, pp. 78-83). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000200003&lng=es&tlng=es.
- 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* [Universidad de Santiago de Compostela]. <http://hdl.handle.net/10347/27116>
- Dong, N., Yang, X., Wai-Chi Chan, E., Zhang, R., & Chen, S. (2022). Klebsiella species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). *eBioMedicine*, *79*, 103998. <https://doi.org/10.1016/j>
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: Review and bench guide. En *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 14, Número SUPPL. 1, pp. 90-103). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>
- EFSA. (2014). *E. coli EFSA explains zoonotic diseases*. <https://doi.org/10.2805/62059>
- EUCAST. (2024). *Clinical breakpoints - breakpoints and guidance*. Recuperado 28 de mayo de 2024, de https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

- Feng, P., Lum, R., & Chang, G. W. (1991). Identification of *uidA* Gene Sequences in 3-D-Glucuronidase-Negative *Escherichia coli*. En *Applied and Environmental Microbiology* (Vol. 57, Número 1).
- 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>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1351618>
- Gómez-Duarte, O. G., Arzuza, O., Urbina, D., Bai, J., Guerra, J., Montes, O., Puello, M., Mendoza, K., & Castro, G. Y. (2010). Detection of *Escherichia coli* Enteropathogens by Multiplex Polymerase Chain Reaction from Children's Diarrheal Stools in Two Caribbean-Colombian Cities. *Foodborne Pathogens and Disease*, 7(2), 199-206. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0355>
- Hutchings, M., Truman, A., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. En *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 51, pp. 72-80). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Jiménez Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 1-8. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>
- Johnson, J. R., Stapleton, A. E., Russo, T. A., Scheutz, F., Brown, J. J., & Maslow, J. N. (1997). Characteristics and Prevalence within Serogroup O4 of a J96-Like Clonal Group of Uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 Containing the Class I and Class III Alleles of papG. En *Infection and Immunity* (Vol. 65, Número 6, pp. 2153-2159).
- Johnson, J. R., & Stell, A. L. (2000). *Extended Virulence Genotypes of Escherichia coli Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise*. <https://academic.oup.com/jid/article/181/1/261/893888>
- 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>
- José A. García Rodríguez, Rafael Cantón, J. Elías García Sánchez, M^a Luisa Gómez-Lus, Luis Martínez Martínez, Carmen Rodríguez-Avial, & Jordi Vila. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En *Procedimientos en Microbiología Clínica (SEIMC)*. <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 2, Número 2, pp. 123-140). <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>

- Kaper, J. B. (2005). Pathogenic *Escherichia coli*. En *International Journal of Medical Microbiology* (Vol. 295, Números 6-7, pp. 355-356). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.06.008>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Argüello, H., Berendonk, T., Cavaco, L. M., ... Peixe, L. (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA Journal*, 19(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651>
- Larrosa, M. N., Benito, N., Cantón, R., Canut, A., Cercenado, E., Fernández-Cuenca, F., Guinea, J., López-Navas, A., Moreno, M. Á., Oliver, A., & Martínez-Martínez, L. (2020). From CLSI to EUCAST, a necessary step in Spanish laboratories. En *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 38, Número 2, pp. 79-83). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.09.014>
- Lescat, M., Clermont, O., Woerther, P. L., Glodt, J., Dion, S., Skurnik, D., Djossou, F., Dupont, C., Perroz, G., Picard, B., Catzeflis, F., Andremont, A., & Denamur, E. (2013). Commensal *Escherichia coli* strains in Guiana reveal a high genetic diversity with host-dependant population structure. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 49-57. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2012.00374.x>
- 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*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Melo, M. C. R., Maasch, J. R. M. A., & de la Fuente-Nunez, C. (2021). Accelerating antibiotic discovery through artificial intelligence. En *Communications Biology* (Vol. 4, Número 1). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02586-0>
- Mora, A., Herrera, A., López, C., Dahbi, G., Mamani, R., Pita, J. M., Alonso, M. P., Llovo, J., Bernárdez, M. I., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2011). Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative *Escherichia coli* O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain. *International Microbiology*, 14(3), 121-141. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.142>
- Mora, A., Viso, S., López, C., Alonso, M. P., García-Garrote, F., Dabhi, G., Mamani, R., Herrera, A., Marzoa, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Moulin-Schouleur, M., Schouler, C., & Blanco, J. (2013). Poultry as reservoir for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* O45: K1: H7-B2-ST95 in humans. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4), 506-512. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.08.007>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- OMS. (2023). *Guía AWARE (Acceso, Precaución y Reserva) de la OMS para el uso de antibióticos*. <http://www.wipo.int/amc/es/mediation/rules/>
- O'Neill, J. (2016). *Review on Antimicrobial Resistance. Tackling Drug-Resistant Infections Globally*.

- Perrat, A., Branchu, P., Decors, A., Turci, S., Bayon-Auboyer, M. H., Petit, G., Grosbois, V., Brugère, H., Auvray, F., & Oswald, E. (2022). Wild Boars as Reservoir of Highly Virulent Clone of Hybrid Shiga Toxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Responsible for Edema Disease, France. *Emerging Infectious Diseases*, 28(2), 382-393. <https://doi.org/10.3201/eid2802.211491>
- Pierce, B. A. (2016). *Genética: un enfoque conceptual*. Editorial Médica Panamericana.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. En *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 7, Número 4, pp. 493-512). Future Science Ltd. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Rebello, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., de Frutos, C., Escobar, Malhotra-Kumar, S., Villa, L., ... Hendriksen, R. S. (2018). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Eurosurveillance*, 23(6). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
- 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*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/foods11223662>
- Resolución de 6 de septiembre de 2023, de la Jefatura Territorial de Lugo, por la que se declara la emergencia cinegética temporal por los daños ocasionados por el jabalí en las comarcas de Os Ancares, Chantada, Lugo, A Mariña Central, A Mariña Occidental, A Mariña Oriental, Sarria, Terra Chá y Terra de Lemos. (2023). https://www.xunta.gal/dog/Publicados/2023/20230915/AnuncioG0691-070923-0009_es.html
- Riley, L. W. (2020). *Extraintestinal Foodborne Pathogens*. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519>
- Rodrigues, C. (2020). Isolation of Klebsiella strains from food samples MedVetKlebs consortium. *Institut Pasteur*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.baxtifnn>
- Rodrigues, C., Hauser, K., Cahill, N., Ligowska-Marzeta, M., Centorotola, G., Cornacchia, A., Fierro, R. G., Haenni, M., Nielsen, E. M., Piveteau, P., Barbier, E., Morris, D., Pomilio, F., & Brisse, S. (2022). *High Prevalence of Klebsiella pneumoniae in European Food Products: a Multicentric Study Comparing Culture and Molecular Detection Methods*. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.baxtifnn>
- Russo, T. A., Shon, A. S., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Pomakov, A. O., & Visitacion, M. P. (2011). Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than «classical» *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PLoS ONE*, 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026734>
- Saladin, M., Cao, V. T. B., Lambert, T., Donay, J.-L., Herrmann, J.-L., Ould-Hocine, Z., Verdet, C., Delisle, F., Philippon, A., & Arlet, G. (2002). Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 161-168. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x>

- Silva, A., Silva, V., Pereira, J. E., Maltez, L., Igrejas, G., Valentão, P., Falco, V., & Poeta, P. (2023). Antimicrobial Resistance and Clonal Lineages of *Escherichia coli* from Food-Producing Animals. En *Antibiotics* (Vol. 12, Número 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12061061>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110605>
- Simarro, E., Ferrá, F., Navarro, F., Joaquín, J., Ruiz, J., Miro, E., Miro, M., Gómez, J., Gómez, G., & Mirelis, B. (2000). Salmonella enterica Serovar Virchow with CTX-M-Like-Lactamase in Spain. En *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 38, Número 12).
- Tártara, S. G. (2013). Patógenos Emergentes-Tercera Parte "*Klebsiella pneumoniae* Productora de Carbapenemasas (Kpn-Kpc) " Emerging Pathogens-Part III. *Trasplante*, 33(2), 103-109. www.renal.org.ar
- Torres, R. T., Fernandes, J., Carvalho, J., Cunha, M. V., Caetano, T., Mendo, S., Serrano, E., & Fonseca, C. (2020). Wild boar as a reservoir of antimicrobial resistance. En *Science of the Total Environment* (Vol. 717). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135001>
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. M. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: An overview. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 2, Número SEP). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- 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* [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>
- WHO. (2021). *Tripartite and UNEP support OHHLEP's definition of «One Health»*. <https://www.who.int/news/item/01-12-2021-tripartite-and-unep-support-ohhlep-s-definition-of-one-health>
- WHO. (2024). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024. *WHO*.
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136-1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>