



Universidad de Valladolid

*Detección de bacterias resistentes a
antibióticos en la cadena de
producción porcina.*

TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO 2015/2016

Alumno: LUCAS MICHEL

Tutor Académico: MARTA HERNÁNDEZ PEREZ

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Situación de las zoonosis en Europa y en España.	4
1.2 Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	5
1.3 Antibióticos β -lactámicos.....	6
1.3.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.	7
1.3.2 Diagnóstico.....	8
1.4 <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA).....	8
1.4.1 Epidemiología de las infecciones causadas por MRSA.....	9
1.4.2 Diagnóstico.....	10
2. Objetivos.	11
3. Materiales y Métodos.....	12
3.1 Muestras.....	12
3.2 Medios de Cultivo.....	12
3.3 Tratamiento de las Muestras.....	12
3.4 Conservación de los aislados mediante congelación.....	14
3.5 Confirmación de los aislados seleccionados mediante PCR.....	14
3.5.1 Extracción rápida de ADN.	14
3.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	14
3.5.2.1 Confirmación de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	14
3.5.2.1.1 Preparación de gel de Agarosa.	15
3.5.2.1.2 Electroforesis y tinción.....	15
3.5.2.2 Confirmación de <i>S. aureus</i> por PCR a tiempo real.....	16
3.5.2.3 Detección de genes de resistencia <i>mecA</i> y <i>mecC</i> en <i>S. aureus</i>	16
3.5.2.3.1 Preparación de gel de Agarosa.	17
3.5.2.3.2 Electroforesis y tinción.....	17
4. Resultados y Discusión.....	18
4.1 Muestras.....	18
4.2 Detección de <i>E. coli</i> productora de β -lactamasas de Amplio Espectro (ESBL) y resistentes a Carbapenémicos (CRE).	20
4.2.1 Confirmación de <i>E. coli</i> por PCR convencional.....	21
4.3 Detección y confirmación de <i>S. aureus</i> resistentes a meticilina (MRSA).....	22
4.3.1 Confirmación de <i>S. aureus</i> por PCR a tiempo real.....	22
4.3.2 Detección molecular de genes de resistencia <i>mecA</i> y <i>mecC</i>	23
5. Conclusiones.....	25
6. Agradecimientos.....	26
6. Bibliografía.....	27

1. Introducción

El empleo de antibióticos en animales destinados a la alimentación humana es imprescindible para preservar el abastecimiento de los alimentos de origen animal, así como garantizar la Salud de la población. Sin embargo, gran parte del uso global, no está destinado al tratamiento de animales enfermos, sino a la prevención de infecciones o, simplemente, para promover el crecimiento de los animales involucrados en la cadena alimentaria. Aunque este uso se prohibió por la Unión Europea en 2006, está permitido en otros países como EE.UU. En este país, más del 70% de los antibióticos definidos por la FDA como importantes medicamentos para el tratamiento de enfermedades en los humanos se utilizan en animales (Davis y col., 2011).

Desde un punto de vista científico, el uso de antibióticos a gran escala constituye una amenaza para la salud humana, para los animales y para la garantía de la seguridad alimentaria, dado que fomenta el desarrollo de resistencias, las cuales pueden comprometer la efectividad de un antibiótico o bien transmitir dichas resistencias a otras bacterias con el consumo del propio alimento. Además, un gran número de animales que viven en las proximidades de la población, o en condiciones no higiénicas, pueden actuar como reservorios de resistencias y acelerar su propagación. Existen, sobre todo en entornos de cría intensiva, muchas oportunidades para que bacterias resistentes a antibióticos sean transferidas de un animal a otro (Davis y col., 2011).

Es por tanto la cadena de producción cárnica uno de los alimentos implicados en la transmisión y dado que los países integrantes del G20 cuentan con el 80% del total de la producción mundial de carne (FAO data, 2016), una gran parte del uso de antibióticos del ganado y el desarrollo de resistencias, recae actualmente en ellos y son los países que deberían y están tomando medidas al respecto.

De hecho, el problema del uso de antibióticos en la ganadería y su impacto en el desarrollo de resistencias a los mismos, ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las mayores amenazas para la salud mundial y en 2015 definió su *Plan de Acción Global*, requiriendo a los países miembros el desarrollo de un Plan de Acción Nacional para hacer frente a la resistencia antimicrobiana, el cual incorpore consideraciones en cuanto al uso de antibióticos en animales. Este tema también ha sido reconocido por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) y por la Organización de Naciones Unidas sobre Alimentos y Agricultura (FAO). Y a nivel nacional, en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) aparece entre las prioridades en el programa nacional de investigación y a nivel

autonómico, en los programas del Nuevo Mapa de Investigación e Innovación del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

En este trabajo nos centramos en la investigación de resistencias a antibióticos en bacterias aisladas en la cadena de producción porcina. Investigamos la presencia de bacterias que pueden ser transmitidas por alimentos como son los Enterobacteriaceae y *Staphylococcus aureus*, ambas responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias de carácter zoonótico.

1.1 Situación de las zoonosis en Europa y en España.

Se denominan zoonosis las enfermedades que pueden transmitirse directa o indirectamente entre animales y humanos, por ejemplo, por el consumo de alimentos contaminados o por el contacto con animales infectados.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority, EFSA) publica un informe anual sobre la situación de las zoonosis en Europa, de acuerdo a la Directiva 2003/99/UE. La EFSA es una agencia independiente, financiada por la Unión Europea (UE), que se encuentra en Parma (Italia) y que fue creada en 2002 como respuesta a la demanda de la sociedad en relación a los problemas relacionados con la seguridad alimentaria y la capacidad de los organismos reguladores en la protección de los consumidores. Es el organismo responsable de examinar los datos de zoonosis, resistencias antimicrobianas y brotes alimentarios enviados por los Estados Miembros, y de elaborar el informe de estos resultados. En España, la coordinación del informe se realiza por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA). La información la proporcionan las Subdirecciones Generales de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad y la de Medios de Producción Ganaderos del MAGRAMA, la Subdirección General de Coordinación de Alertas y Programación de Control Oficial de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y los Servicios de Sanidad Animal de las Consejerías de Agricultura y Ganadería de las Comunidades Autónomas.

En el Informe de la EFSA 2014, se recogen los datos del año 2012 sobre zoonosis, agentes zoonóticos y brotes alimentarios ocurridos en los 27 países europeos proporcionados por los distintos gobiernos y por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC). La EFSA y el ECDC analizaron los datos conjuntamente, y los resultados se incluyeron en este informe, que cubre 10 zoonosis y brotes alimentarios. Entre ellos, se notificaron 214.268 casos confirmados en humanos de *Campylobacter*, esta zoonosis sigue siendo la más notificada en la UE, aunque el

número de casos ha disminuido respecto a 2011. En el mismo año se notificaron 91.034 casos confirmados de Salmonelosis, un 4,7% menos que el año anterior y en el periodo 2008-2012 se ha observado una tendencia significativamente descendente, lo que se asume se debe a los programas de control de *Salmonella* en aves aplicados en los países europeos. En ambas zoonosis, el principal alimento implicado fue la carne de pollo. En cuanto al número de casos de listeriosis en Europa aumentó ligeramente respecto a 2011 y en 2012 se notificaron 1.642 casos humanos confirmados. En este microorganismo se observa una tendencia creciente con una tasa de letalidad elevada, cercana al 18%. Los productos alimenticios en los que se ha aislado con más frecuencia *Listeria monocytogenes* por encima de los límites permitidos han sido los procedentes de la pesca. Y por último *Escherichia coli* productora de toxina shiga o vero (ECST/ECVT) disminuyó en número de casos, un 40% menos en 2012 (5.671 frente a 9.485 casos en 2011) debido al gran brote que se produjo en Alemania y Francia asociado al consumo de semillas germinadas, por la cepa O104:H4. No obstante, aun eliminando los datos de 2011, la tendencia para el periodo 2008-2012 es creciente. En relación a los alimentos en los que se encuentra esta bacteria, está mayoritariamente asociada a la carne y al ganado vacuno. España notificó 31 casos confirmados en 2012 de este microorganismo según indicó el Laboratorio Nacional de Referencia del Centro Nacional de Microbiología del ISCIII (tasa de 0,07 frente a 1,15 de la UE). La tendencia en España, al igual que en la UE, es de aumento los últimos años.

Otras zoonosis de las que se presenta la situación en el informe y que numéricamente no son tan importantes son: Tuberculosis producida por *M. bovis*, *Brucelosis*, *Trichinella*, *Toxoplasma*, *Rabia*, *Fiebre Q (Coxiella burnetti)* y *Fiebre del Nilo Occidental (FNO)*.

http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/noticias_efsa/2015/agentes_zoonoticos.shtml

Ya que en este trabajo nos centramos en la Familia Enterobacteriaceae, y en *S. aureus* a continuación se describe brevemente sus características taxonómicas, funcionales y genómicas principales.

1.2 Familia *Enterobacteriaceae*.

Los miembros de esta familia son aerobios/anaerobios facultativos, no forman esporas, y son móviles por flagelos peritricos, excepto los géneros *Klebsiella*, *Shigella* y *Yersinia* (a 37°C) que carecen de ellos. Tienen requerimientos nutricionales simples, fermentan la glucosa con o sin producción de gas, reducen los nitratos a nitritos, son oxidasa negativa (a excepción del género *Plesiomonas*) y catalasa positiva. Una

importante característica taxonómica que diferencia los diversos géneros de enterobacterias es el tipo y la proporción de productos de fermentación producidos por la fermentación de la glucosa. Se pueden distinguir dos amplios perfiles: la fermentación ácido mixta y la fermentación butanodiólica (Madigan, Martinko, Dunlap, y Clark, 2009). En general las especies de esta familia cumplen siete criterios básicos:

1. Son bacterias Gram negativas, la mayoría bacilos, otros cocobacilos y otros pleomórficos.
2. Son de fácil cultivo.
3. Son oxidasa negativo (excepto *Plesiomonas*, que es oxidasa positivo), es decir, carecen de la enzima citocromo oxidasa.
4. Son capaces de reducir nitrato en nitrito.
5. Son anaeróbicos facultativos.
6. Son fermentadores de carbohidratos en condiciones anaeróbicas con o sin la producción de gas (en especial glucosa y lactosa), y oxidadores de una amplia gama de sustratos en condiciones aeróbicas.
7. Muchos géneros tienen un flagelo que sirve para desplazarse, aunque algunos géneros no son móviles.

La familia *Enterobacteriaceae* está asociada a una gran variedad de enfermedades como sepsis, infecciones intraabdominales, respiratorias, urinarias, etc. El tratamiento de estas infecciones está basado fundamentalmente en la terapia con fármacos antimicrobianos. Existen diversos grupos de antimicrobianos con actividad frente a enterobacterias. Los antibióticos más utilizados son los β -lactámicos asociados con otras familias de antimicrobianos como los aminoglucósidos o las quinolonas (Livermore y Woodford, 2006). Sin embargo, las bacterias han ido desarrollando mecanismos de defensa contra estos antibióticos. Estos mecanismos de resistencia pueden ser adquiridos (como nuevo material genético procedente de otra bacteria), o generarse por mutaciones cromosómicas en el ADN de la bacteria, como se comenta posteriormente.

1.3 Antibióticos β -lactámicos.

Los antibióticos β -lactámicos constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más empleada en la práctica clínica. No solo poseen una gran eficacia terapéutica, sino que además no son tóxicos para el hombre debido a que actúan bloqueando las enzimas biosintéticas del peptidoglucano, las cuales las encontramos solo en las células bacterianas.

Los antibióticos β -lactámicos son agentes bactericidas que producen su efecto a través de dos mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana. La última fase de la síntesis de la pared bacteriana consiste en la formación de los tetrapéptidos a partir de los pentapéptidos, mediante pérdida de uno de los aminoácidos terminales. Esto lo llevan a cabo unas transpeptidasas que se localizan en el espacio periplásmico. El anillo β -lactámico presenta una similitud estructural con la región del pentapéptido al que se unen estas enzimas (el extremo D-Alanina-D-Alanina), de forma que bloquean este paso al unirse covalentemente a ellas impidiendo la formación de la pared (Suarez y Gudiol, 2009).

Para que el antibiótico sea activo, es necesario que esté unido a otros radicales, obteniendo diferentes propiedades en el compuesto resultante. Esto da lugar a diferentes grupos de β -lactámicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactamas e inhibidores de las β -lactamasas.

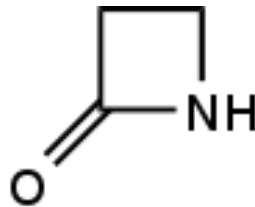


Figura 1: Anillo β -lactámico.

Entre los antibióticos β -lactámicos encontramos los carbapenos. Son antibióticos derivados de la tienamicina, la cual se obtiene de un compuesto que produce *Streptomyces catleya*. Sus propiedades antibacterianas la convertían en un antibiótico ideal pero era químicamente inestable (Kahan y col., 1979). Su estructura contiene un anillo β -lactámico fusionado a un anillo insaturado de 5 átomos. Es el grupo de β -lactámicos con mayor espectro de actividad, por lo que deben utilizarse exclusivamente en infecciones producidas por microorganismos resistentes al resto de β -lactámicos, limitándose su uso al ámbito hospitalario (Rodrigo, 2010). Los principales carbapenos son: imipenem, meropenem, ertapenem y doripenem.

Frente a enterobacterias, los carbapenos tienen una elevada actividad, ya sea en cepas sensibles o en resistentes a otros antimicrobianos, incluidos los β -lactámicos.

1.3.1 Mecanismos de resistencia a los antibióticos.

La resistencia a los antimicrobianos es un problema con implicaciones terapéuticas, epidemiológicas, microbiológicas y de salud pública. El problema de la resistencia se puede ver como una ecuación con dos componentes principales: el de los antibióticos que inhiben los organismos susceptibles y selecciona los resistentes; y la

resistencia genética de un microorganismo seleccionada por el antimicrobiano (Levy y Marshall, 2004).

En las bacterias, los mecanismos de resistencia empleados son: alteración de la permeabilidad de la membrana, modificación enzimática del antimicrobiano, expulsión activa del agente terapéutico, alteración de la diana de acción, protección de la diana, hiperproducción de la diana o, de manera más infrecuente, desarrollo de nuevas vías metabólicas (Martinez-Martinez y Calvo, 2010).

El mecanismo más importante de resistencia a los carbapenems en enterobacterias es la producción de carbapenemasas, son enzimas que hidrolizan los carbapenems pero también actúan frente a otros β -lactámicos, aunque su espectro depende de la especificidad de cada enzima. Dicha resistencia también puede ser debida a la combinación de β -lactamasas tipo AmpC o, en menor medida, β -lactamasas de espectro extendido, combinadas con la disminución de la permeabilidad de la membrana externa, ya que por sí solas su capacidad hidrolítica frente a carbapenems es muy pobre (Papp-Wallace, Endimiani, Taracila, y Bonomo, 2011).

1.3.2 Diagnóstico

La detección fenotípica de Enterobacterias gram negativas resistentes a carbapenems (CRE) y las de espectro extendido (ESBL) se puede realizar, entre otras formas, mediante la utilización de medios selectivos cromogénicos.

1.4 *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)

El género *Staphylococcus* comprende 35 especies y 17 subespecies de bacterias Gram-positivas de forma esférica, aisladas o en cadena, y con una serie de caracteres fisiológicos y bioquímicos característicos, la mayoría de ellas capaces de colonizar al hombre y a muchas especies animales en piel y mucosas. *S. aureus* es una especie del género con forma de coco, anaerobia facultativa, Gram-positiva, productora de coagulasa y catalasa, inmóvil y no formadora de esporos. Se estima que alrededor del 30% de los individuos sanos están colonizados en piel y mucosas por este patógeno primario y oportunista (Lozano y col., 2011), que produce alrededor de 240.000 casos de enfermedades de origen alimentario en los Estados Unidos, representando una de las causas más importantes de intoxicación alimentaria de origen bacteriano (Hanson, 2011; Scallan y col., 2011). En Europa, el último informe publicado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), sobre las tendencias y fuentes de zoonosis, agentes zoonóticos, y brotes alimentarios en el año 2013, puso de manifiesto que las

intoxicaciones causadas por las enterotoxinas estafilocócicas son responsables del 7,4% de todos los brotes informados por la UE (EFSA, 2015). Además, *S. aureus* es un portador frecuente de genes de resistencia a antibióticos, circunstancia que a corto plazo, complica el tratamiento y aumenta de forma significativa los costes de su control, y a medio y largo plazo, compromete el tratamiento de este tipo de infecciones. Su resistencia a la meticilina está mediada por la presencia de los genes *mecA* o *mecC*, los cuales codifican una proteína adicional de unión a la penicilina (designada PBP2a o PBP2'), que presenta una baja afinidad por los antibióticos del grupo de β -lactámicos (Matsushashi y col., 1986; García-Álvarez y col., 2011).

1.4.1 Epidemiología de las infecciones causadas por MRSA

La epidemiología de MRSA es extremadamente compleja y, en las últimas décadas, se ha convertido en uno de los mayores problemas de Salud Pública a nivel mundial. De hecho, la emergencia de la resistencia a los antibióticos es uno de los puntos prioritarios tanto en el marco de la estrategia *One Health*, como en países como Reino Unido, donde se han establecido políticas nacionales de alta prioridad para combatir la diseminación de bacterias resistentes a los antibióticos (www.gov.uk/government/collections/antimicrobial-resistance-amr-information-and-resources). Son varios los factores principales que han influido en este hecho. Dos de ellos son la emergencia de determinados linajes en los ambientes comunitarios (en individuos sanos, de forma asintomática, y actuando como reservorios del patógeno) y en animales, tanto en aquellos destinados a la producción de alimentos, como en los animales de compañía, y segundo, la detección del patógeno en alimentos de origen animal, lo que constituye un riesgo para la inocuidad alimentaria, contribuyendo a la dispersión de las cepas mejor adaptadas evolutivamente.

La emergencia de los linajes CA-MRSA tiene una gran importancia en la epidemiología de MRSA dificultando la prevención y control de las infecciones, ya que colonizan de forma asintomática al ser humano que actúa como reservorio del patógeno. Además, desde el año 2005 se han detectado aislados de MRSA del tipo de secuencia (ST) 398, capaces de colonizar cerdos y humanos relacionados profesionalmente con la cría de estos animales en varios países europeos (Voss y col., 2005; Witte y col., 2007). Estudios posteriores han revelado también la presencia de este linaje en otros animales destinados a la producción de alimentos, y por tanto ha sido designado como MRSA asociado al ganado (livestock-associated MRSA (LA-MRSA)). Estas cepas actúan como reservorios genéticos de resistencia, y podrían jugar un papel muy importante en la evolución adaptativa de MRSA; de hecho, el gen de resistencia a

meticilina *mecC*, recientemente descubierto, fue detectado originariamente en ganado bovino, y en la actualidad se detecta cada vez con más frecuencia en el entorno hospitalario como causa de infección (García-Álvarez y col., 2011; Shore y col., 2011; Pantosti, 2012).

En tercer lugar, la emergencia de MRSA en los animales de producción ha suscitado gran preocupación respecto al papel potencial de los alimentos asociados como vehículos de infección, o en la diseminación de los linajes más adaptados evolutivamente. A pesar de que la EFSA considera que el riesgo de contraer infecciones por MRSA a través de los alimentos es bajo, varios estudios han demostrado formalmente la existencia de infecciones transmitidas por alimentos y, por tanto, estos no deberían descartarse como ruta potencial de transmisión de estas variantes de *S. aureus* (Kluytmans y col., 1995; Jones y col., 2002).

1.4.2 Diagnóstico

La identificación de MRSA se lleva a cabo mediante diversas metodologías incluyendo el cultivo de la muestra en medios de cultivo selectivos; pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos, por difusión en disco, microdilución en caldo y dilución en agar; detección de genes *mecA/mecC* por PCR; y mediante la detección de la proteína PBP2a mediante aglutinación. Es importante tener en cuenta que los aislados de MRSA con el gen *mecC*, pueden ser diagnosticados equivocadamente como SASM (*S. aureus* sensibles a meticilina) debido a la divergencia de este gen con su homólogo *mecA* (69% y 63% de identidad a nivel de ADN y aminoácidos, respectivamente), con graves consecuencias para los pacientes y sesgando la monitorización de su prevalencia (Paterson y col., 2014a). Por tanto, es necesario introducir nuevas herramientas más fiables para la detección de estos aislados, como el sistema de PCR multiplex desarrollado por Stegger y col. (2012), que permite la detección de ambos genes.

2. Objetivos.

Los objetivos planteados para la realización de este estudio fueron:

- Detección de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y de Enterobacterias (*E. coli* y grupo *KESC*) productores de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) y resistentes a Carbapenos (CRE) empleando medios de cultivo cromogénicos selectivos.
- Confirmación de *E. coli* productora de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) y resistentes a Carbapenos (CRE).
- Confirmación de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) y de la presencia de genes de resistencia a meticilina en dicho microorganismo.

3. Materiales y Métodos

3.1 Muestras.

Se analizaron 122 muestras de heces de cerdo provenientes de mataderos localizados en diferentes zonas de España. Las muestras se conservaron a -80 °C.

3.2 Medios de Cultivo.

-*Agua de Peptona Tamponada (APT) (Oxoid)*: Medio basal empleado para disolver la muestra sólida.

-*Agar Brilliance MRSA 2 (Oxoid)*: Medio de cultivo cromogénico y selectivo que permite la selección presuntiva de colonias de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (MRSA). Las colonias positivas se visualizan de color azul.

- *Agar Baird Parker con yema de huevo y telurito, B-P (BioLife®)*: Medio selectivo para el aislamiento y enumeración de *Staphylococcus aureus* coagulasa positivos.

-*Caldo McConckey (Oxoid)*: Medio de cultivo diferencial con púrpura de bromocresol para la detección de coliformes. Si hay crecimiento son enterobacterias y si el medio vira a amarillero son enterobacterias fermentadoras de la lactosa (grupo coliformes).

-*Agar Brilliance ESBL/ Brilliance CRE (Oxoid)*: Medio de cultivo cromogénico que combina, en formato biplaca, un medio para la selección de bacterias productoras de β -Lactamasas de Amplio Espectro (ESBL) junto a otro medio que sólo permite el crecimiento de *Enterobacterias Resistentes a Carbapenémicos (CRE)*.

ESBL: • Azul o Rosa: *E.coli*.

- Verde: *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.* y *Serratia spp.*

CRE: • Azul: *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*

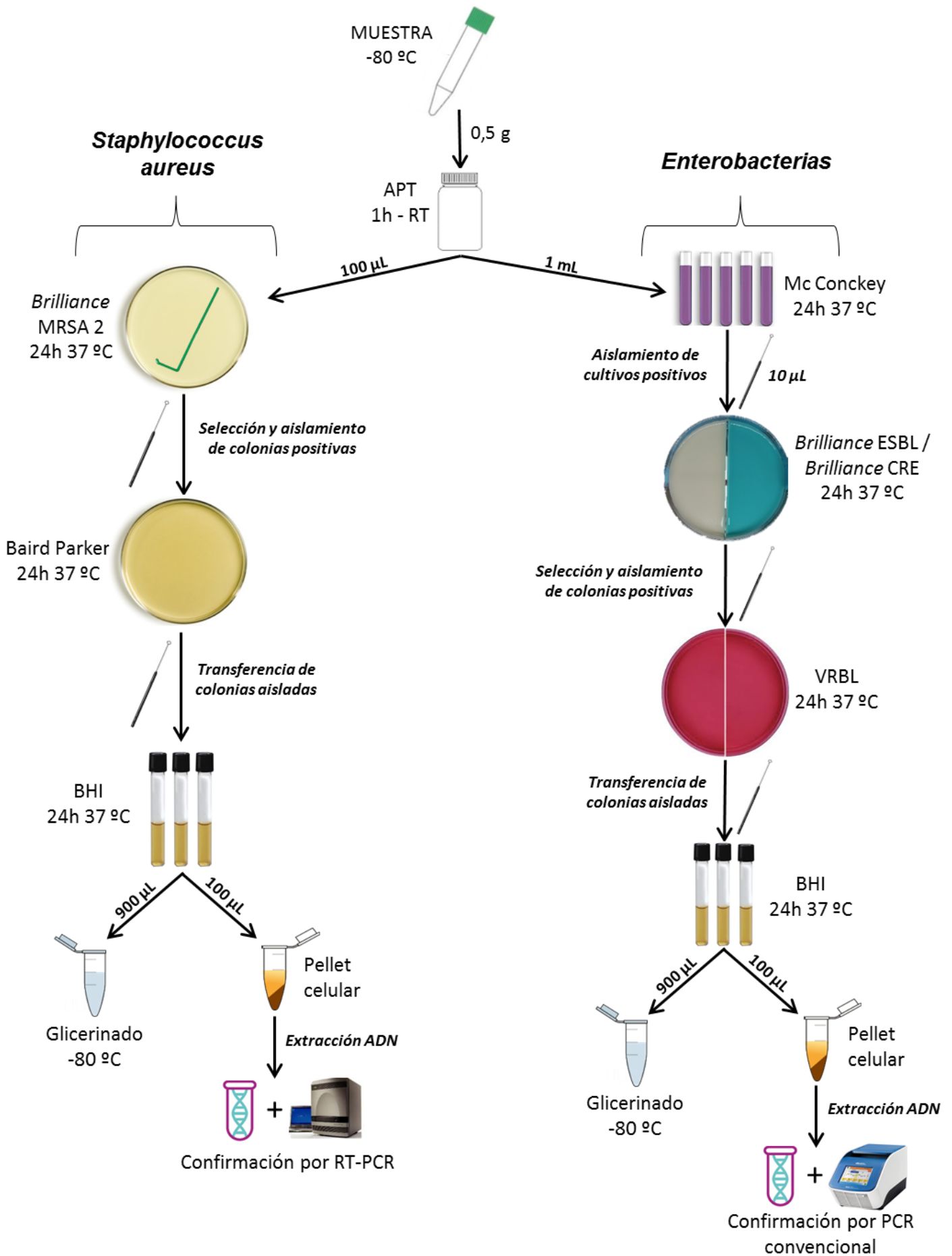
- Rosa pálido: *E.coli*.

- *Agar Bilis y Rojo Violeta con Lactosa, VRBL (BioLife)*: Medio de cultivo selectivo y diferencial que sirve para el aislamiento y enumeración de organismos coliformes.

-*Caldo Infusión cerebro corazón, BHI (BD)*: Medio líquido para el cultivo de patógenos y no patógenos, incluyendo bacterias aerobias y anaerobias.

3.3 Tratamiento de las Muestras.

Las muestras se descongelaron, se pesaron 0,5 g, se resuspendieron en 2 ml de agua de peptona tamponada, y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente. Luego se transfirieron al medio de cultivo correspondiente.



3.4 Conservación de los aislados mediante congelación.

Los aislados seleccionados se conservaron mediante congelación a -80°C , utilizando glicerol como agente crioprotector, a una concentración final del 20% (v/v).

Se tomaron 900 μl del cultivo y se pasaron a un criotubo con 300 μl de glicerol al 80%. Los glicerizados se homogeneizaron mediante agitación suave y se conservaron a -80°C .

3.5 Confirmación de los aislados seleccionados mediante PCR.

Las colonias positivas obtenidas en Agar *Brilliance* MRSA 2 se sometieron a confirmación para *S. aureus*, mientras que en Agar *Brilliance* ESBL/ *Brilliance* CRE sólo se confirmaron las muestras positivas para *E. coli*, ambas mediante PCR. La confirmación requiere una extracción previa del material genético de los aislados.

3.5.1 Extracción rápida de ADN.

El protocolo de extracción es el siguiente:

- I. Se concentraron 100 μl del cultivo de cada aislado, mediante centrifugación (10000 rpm, durante 5 minutos, a 4°C).
- II. Se añadieron 500 μl del buffer PBS 1X (*Sigma*) sobre el precipitado.
- III. Se resuspendió completamente el precipitado mediante agitación, y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos.
- IV. Se eliminó el sobrenadante y se añadió al precipitado bacteriano 200 μl de buffer Tris-HCl 10 mM, pH 8 (*Qiagen*). Se resuspendió el precipitado mediante agitación.
- V. Se incubó a 95°C durante 20 minutos, en agitación (900 rpm). Luego de la incubación se agitaron los tubos y centrifugaron a 13.000 rpm, 5 minutos.
- VI. Se transfirió el sobrenadante (70-100 μl) a un tubo nuevo.
- VII. Se emplearon 2 μl de la muestra de ADN obtenida, como ADN molde en la PCR.
- VIII. Las muestras de ADN se almacenaron a 4°C durante una semana o por más tiempo a -20°C .

3.5.2 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

3.5.2.1 Confirmación de *E. coli* por PCR convencional.

Las posibles colonias de *E. coli* positivas que fueron aisladas del medio de cultivo Agar *Brilliance* ESBL/ *Brilliance* CRE, se confirmaron mediante la técnica de PCR convencional.

Para llevar a cabo dicha PCR se utilizaron los siguientes componentes y se aplicaron las condiciones indicadas:

<i>E. coli.</i>			
Reactivos PCR	Concentración final	Condiciones de Termociclado	
Tampón de PCR (Biotools)	1 X	95°C, 5 min.	1 ciclo
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	1,5 mM	95°C, 2 min. 50°C, 1 min 72°C, 1 min.	30 ciclos
dNTPs (BioLine)	0,8 mM		
Primer <i>ECuspAF</i> (MWG)	300 nM		
Primer <i>ECuspAR</i> (MWG)	300 nM		
ADN polimerasa (Biotools)	0,8 U/reacción	72°C, 10 min.	1 ciclo
ADN molde	2 µl/reacción		
Volumen reacción PCR: 20 µl. Tamaño producto amplificación: 880 pb (aprox.)			

Diana	Nombre	Primer	Secuencia 5'–3'
<i>Escherichia coli</i> <i>uspA</i> gen	<i>ECuspAF</i>	Forward	ccg ata cgc tgc caa tca gt
	<i>ECuspAR</i>	Reverse	acg cag acc gta ggc cag at

3.5.2.1.1 Preparación de gel de Agarosa.

El gel de agarosa (*Pronadisa*) para la electroforesis se preparó al 1,5% de la siguiente manera:

- I. Se tomaron 220 ml de buffer TAE 1X (40 mM Tris-Acetato y 1 mM EDTA)
- II. Se añadieron 3,3 g de agarosa a la solución de Buffer arriba mencionada.
- III. Se calentó la mezcla hasta que rompió hervor. La solución debe quedar transparente, sin rastros de agarosa.
- IV. Se dejó enfriar evitando que solidifique y se vertió sobre el molde para formar el gel.

3.5.2.1.2 Electroforesis y tinción

Los productos de PCR obtenidos se mezclaron con tampón de carga 6X (Azul de bromofenol 0,25% (p/v), sacarosa 40% (p/v), a una concentración final 1X (v/v); y se cargaron 6 µL de la mezcla obtenida, en el gel. Para el desarrollo de la electroforesis, se aplicó una corriente entre 90 y 120 V, hasta que el frente indicador del tampón de carga recorrió las $\frac{3}{4}$ partes de la longitud total del gel (1 h-1,5 h). En cada gel se incluyó el marcador de peso molecular 100 pb Ladder (*Biotools*).

Se realizó una tinción post-electroforesis en una solución de GelRed 1X (*Biotium*), durante 30 min-1 h. La visualización de los geles de agarosa y la adquisición de las imágenes se realizó con el sistema Gel Doc (*BioRad*) y el software Quantity One 1-D (*BioRad*).

3.5.2.2 Confirmación de *S. aureus* por PCR a tiempo real.

Las colonias positivas para *S. aureus* en medio *Agar Brilliance MRSA 2* se confirmaron mediante PCR a tiempo real, empleando sondas TaqMan y el equipo ABI7500 (*Applied Biosystems*).

<i>S. aureus</i>. Trnčíková y col., 2009.			
Reactivos PCR	Concentración final	Condiciones de Termociclado	
Master Mix PCR (Roche)	1 X	95°C, 1 min.	1 ciclo
Primer <i>fmhb4416F</i> (MWG)	300 nM	95°C, 1 min. 60°C, 1 min.	50 ciclos
Primer <i>aurR</i> (MWG)	300 nM		
Sonda TaqMan <i>aurP</i> (MWG)	200 nM		
ADN molde	2 µl/reacción		
Volumen reacción PCR: 20 µl. Tamaño producto amplificación: 103 pb (aprox.)			

Diana	Nombre	Oligo	Secuencia 5'–3'
<i>S. aureus</i> <i>AcrB/AcrD/AcrF</i> gen	<i>fmhb4416F</i>	Forward	cta gct tta ttt cag cag gtg acg at
	<i>aurR</i>	Reverse	tca aca tct ttc gca tga ttc aac ac
	<i>aurP</i>	Sonda TaqMan	6FAM-ctt gct ccg ttt cac cag gct tcg gtg-TAMRA

3.5.2.3 Detección de genes de resistencia *mecA* y *mecC* en *S. aureus*.

Se confirmó la presencia de genes de resistencia a Meticilina (*mecA* y *mecC*) en *S. aureus* mediante PCR convencional.

<i>S. aureus</i>. Detección múltiple <i>mecA</i> y <i>mecC</i> (Stegger y col. 2012)			
Reactivos PCR	Concentración final	Condiciones de Termociclado	
Tampón PCR (Roche)	1X	95°C, 5 min.	1 ciclo
Primer Mix (MWG)	400 nM (cada primer)	95°C, 1 min. 59°C, 1 min. 72°C, 1 min.	35 ciclos
MgCl ₂ (Applied Biosystems)	2 mM		
dNTPs (Roche)	0,2 mM		
FastStart Taq ADN Polimerasa (Roche)	1U/reacción		
ADN molde	2 µl/reacción	72°C, 7 min.	1 ciclo
Volumen reacción PCR: 25 µl. Tamaño producto amplificación: 162 pb <i>mecA</i> (aprox.) 138 pb <i>mecC</i> (aprox.)			

Diana	Nombre	Primer	Secuencia 5'-3'	
<i>S. aureus</i> MecA/MecC gen	<i>mecA</i>	<i>mecA</i> P4	Forward	tcc aga tta caa ctt cac cag g
		<i>mecA</i> P7	Reverse	cca ctt cat atc ttg taa cg
	<i>mecC</i>	<i>mecAlga25F</i>	Forward	gaa aaa aag gct tag aac gcc tc
		<i>mecAlga25R</i>	Reverse	gaa gat ctt ttc cgt ttt cag c

3.5.2.3.1 Preparación de gel de Agarosa.

Igual que en 2.4.2.1.1 pero a una concentración final de agarosa del 2% (p/v).

3.5.2.3.2 Electroforesis y tinción

Igual que en 2.4.2.1.2, pero se cargaron 10 µL de la mezcla de producto de PCR y tampón de carga, en el gel.

4. Resultados y Discusión

4.1 Muestras

Los resultados revelan que las muestras de heces de cerdo provenientes de mataderos de toda España (Figura 3) contienen bacterias resistentes a antibióticos, específicamente a algunos del grupo de los β -lactámicos.

En la figura que aparece a continuación se señalan las zonas a partir de las cuales se realizó el muestreo para llevar a cabo este estudio.



Figura 2: En el mapa aparecen marcadas las zonas de donde provienen las muestras.

A continuación se representa una tabla donde se observa la localización o zona específica de la cual provienen y los resultados obtenidos, tanto para la detección de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) como de posibles *Enterobacterias* productoras de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) y/o *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos (CRE). Dentro de estos últimos nos centramos en el estudio específico de *E. coli* y los miembros del grupo KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Citrobacter*).

Tabla 1: Nº de muestras (Total) y MRSA, ESBL y CRE positivas para *S. aureus*, *E. coli* y *KESC*.

Muestras		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>		<i>KESC</i>	
		MRSA2	ESBL	CRE	ESBL	CRE
Zona	Total	+	+	+	+	+
Almería	2	1	1	1	0	0
Barcelona	13	0	9	7	3	1
Castellón	7	1	5	3	3	1
Cuenca	2	0	0	0	1	0
Girona	6	1	5	2	2	0
Granada	2	0	1	1	1	1
Huesca	22	4	16	13	2	3
Jaén	1	0	1	1	0	1
León	1	0	1	1	0	0
Lérida	16	3	10	8	2	2
Malaga	3	0	0	0	0	0
Murcia	14	0	7	5	1	2
Navarra	3	2	0	0	0	0
Ourense	6	0	5	4	1	0
Pontevedra	2	0	1	1	0	0
Segovia	3	1	0	1	0	0
Sevilla	4	0	1	1	0	0
Soria	2	0	1	0	1	0
Teruel	3	0	2	1	0	1
Toledo	4	0	0	1	0	1
Valencia	1	0	0	0	0	0
Valladolid	1	0	0	0	0	0
Zaragoza	4	1	3	1	1	1
TOTAL	122	14	69	52	18	14

Del total de muestras estudiadas (122), 14 de ellas dieron positivo para *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA).

Para el estudio de *Enterobacterias* productoras de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) y/o *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos (CRE) los resultados fueron:

- Para *E. coli*: 69 Muestras positivas para ESBL, mientras que un total de 52 lo fueron para CRE.
- Para *KESC*: un total de 18 muestras dieron positivas para ESBL. En cuanto a CRE, 14 dieron resultado positivo.

Podemos evidenciar de forma general que existe un mayor número de bacterias con ESBL y CRE que MRSA para las muestras tratadas. Sin embargo, Schmithausen y col., 2015, al contrario de los resultados obtenidos en este trabajo, observaron que era más frecuente la adquisición de MRSA que de ESBL en cerdos de granja. Esto

demuestra que la transmisión de resistencia entre bacterias en la cadena de producción porcina tal vez varíe dependiendo del ambiente, la exposición a antibióticos y las especies bacterianas presentes (Schmithausen y col., 2015).

En cuanto al grupo KESC, el número de muestras positivas es bastante menor para ESBL y CRE respecto de las observadas en *E. coli*. Dentro de este grupo de bacterias el porcentaje de muestras positivas es muy similar entre los dos grupos.

Al parecer el consumo o empleo de antibióticos en el campo veterinario es el responsable de la dispersión de bacterias resistentes a antibióticos entre los animales de granja (Wegener, 2003). De hecho, Schmithausen y col., 2015, detectaron que cuánto más frecuente fue el uso de antibióticos β -lactámicos en las granjas en estudio, mayor presencia de cepas de bacterias resistentes a β -lactámicos observaron, como por ejemplo para MRSA y ESBL, en cerdos.

4.2 Detección de *E. coli* productora de β -lactamasas de Amplio Espectro (ESBL) y resistentes a Carbapenémicos (CRE).

En la tabla siguiente se observan solo las muestras positivas para ESBL y CRE de *E. coli* y su aislamiento al medio VRBL para su posterior selección.

Tabla 3: N° de muestras (Total) y muestras de ESBL, CRE y VRBL positivas para *E. coli*.

Muestras		<i>E. coli</i>			
		ESBL	VRBL	CRE	VRBL
Zona	Total	+	+	+	+
Almería	2	1	1	1	1
Barcelona	13	9	8	7	7
Castellón	7	5	5	3	3
Girona	6	5	5	2	2
Granada	2	1	1	1	1
Huesca	22	16	16	13	13
Jaén	1	1	1	1	1
León	1	1	1	1	1
Lérida	16	10	10	8	8
Murcia	14	7	7	5	5
Ourense	6	5	5	4	3
Pontevedra	2	1	1	1	1
Segovia	3	0	0	1	1
Sevilla	4	1	1	1	1
Soria	2	1	1	0	0
Teruel	3	2	2	1	1
Toledo	4	0		1	1
Zaragoza	4	3	3	1	1

A excepción de 2 muestras, el resto de las muestras transferidas al medio VRBL para su posterior aislamiento y selección crecieron de manera adecuada, a diferencia de lo observado con MRSA al ser transferidas a Baird Parker. Si bien las muestras positivas para KESC también se aislaron en VRBL, nos centramos en *E. coli* ya que es la bacteria que se confirmó mediante PCR.

4.2.1 Confirmación de *E. coli* por PCR convencional

De las muestras positivas de *E. coli* para ESBL y CRE se llevó a cabo una PCR convencional para confirmar la presencia dicha bacteria. En la figura que aparece a continuación se presentan los resultados para cada muestra (en total se realizaron 9 geles pero se pone sólo uno de ellos y se omiten el resto de figuras por una cuestión de espacio). En las muestras positivas aparece una banda amplificada que coincide en el número de pb del control positivo empleado, de alrededor de 880 pb, lo que descarta la presencia de falsos positivos. En cada extremo del gel se visualizan los marcadores de peso molecular que van de 100 a 1000 pb.

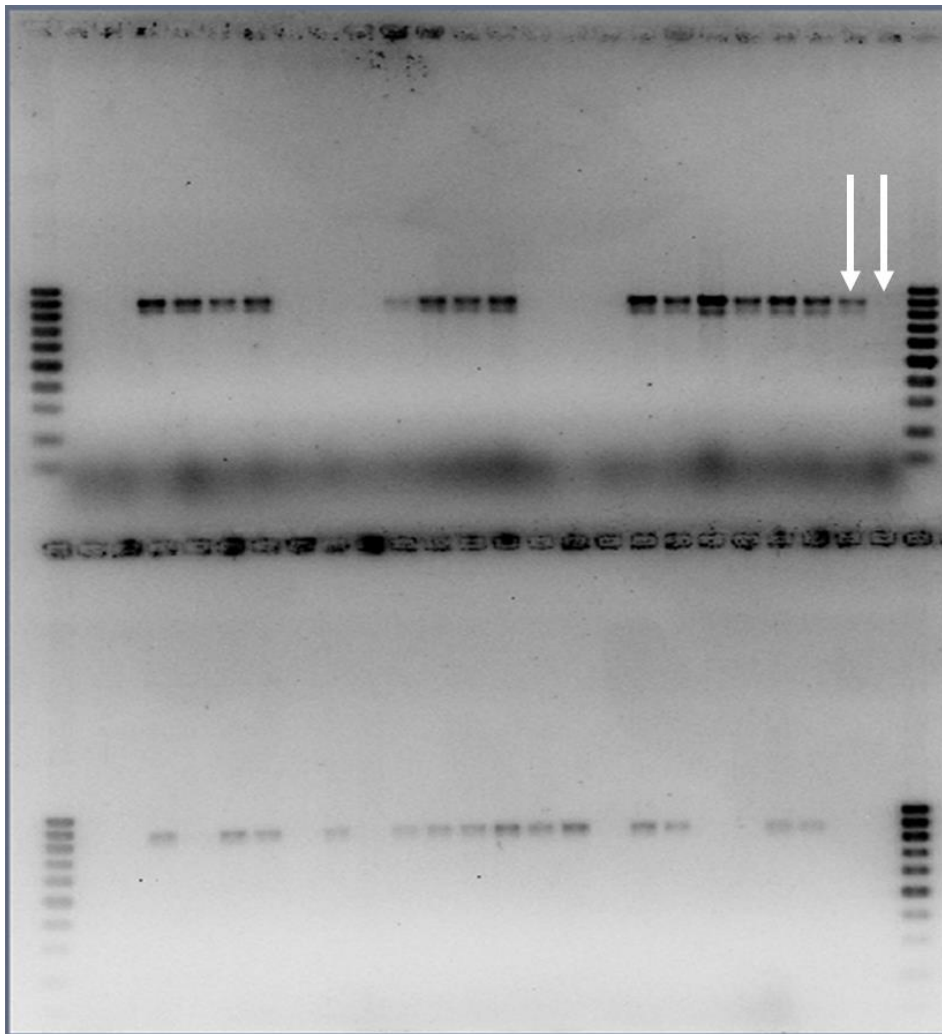


Figura 3: Gel de electroforesis para confirmación de *E. coli*. Las flechas en blanco señalan los controles positivo y negativo correspondientes.

Los geles muestran resultados tanto en cepas ESBL como en CRE. Si bien el medio cromogénico especifica que la aparición de colonias de un determinado color (azul o rosa para ESBL y rosa pálido para CRE) corresponde a *E. coli*, observamos a través de la confirmación por PCR que muchas de las colonias aisladas, posibles *E. coli* resistentes o productoras, son negativas para esta prueba. Al ver los geles se diferencian claramente calles en la que no se ha producido la amplificación específica para confirmar la presencia de *E. coli*. En otros casos si se observa dicha amplificación y podemos confirmar su presencia.

Varios estudios han demostrado que una mayor exposición de los animales a los antimicrobianos se asocia con una mayor prevalencia de resistencia en *E. coli* (Berge y col., 2005, Bosman y col., 2014, Burow y col., 2014, Li y col., 2014, Simoneit y col., 2014)

4.3 Detección y confirmación de *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA)

Las muestras para MRSA positivas al medio MRSA-2 se transfirieron a Baird Parker para su selección y aislamiento. Tan sólo 4 muestras crecieron en este medio selectivo para *S. aureus* con las características propias que son colonias de color negro con un halo de lipólisis refringente alrededor. El medio de cultivo empleado para la detección rápida de MRSA presenta resultados discordantes con el BP, que se deben estudiar genéticamente. La muestra 232, además, mostró un crecimiento muy pobre en BP y no se visualizó el halo característico de esta especie en el medio empleado. Sin embargo se seleccionó para su confirmación por PCR en tiempo real.

Tabla 2: Nº de muestras (Total) y muestras de MRSA y Baird Parker positivas.

Muestras		<i>S. aureus</i>	
		MRSA2	Baird Parker
Zona	Total	+	+
Almería	2	1	1
Castellón	7	1	1
Girona	6	1	0
Huesca	22	4	2
Lérida	16	3	1
Navarra	3	2	0
Segovia	3	1	0
Zaragoza	4	1	0

4.3.1 Confirmación de *S. aureus* por PCR a tiempo real

Mediante PCR a tiempo real se confirmó la presencia de *E. coli* en las muestras 5 y 101 mientras que la muestra 232 fue negativa. Falta confirmar la muestra 67.

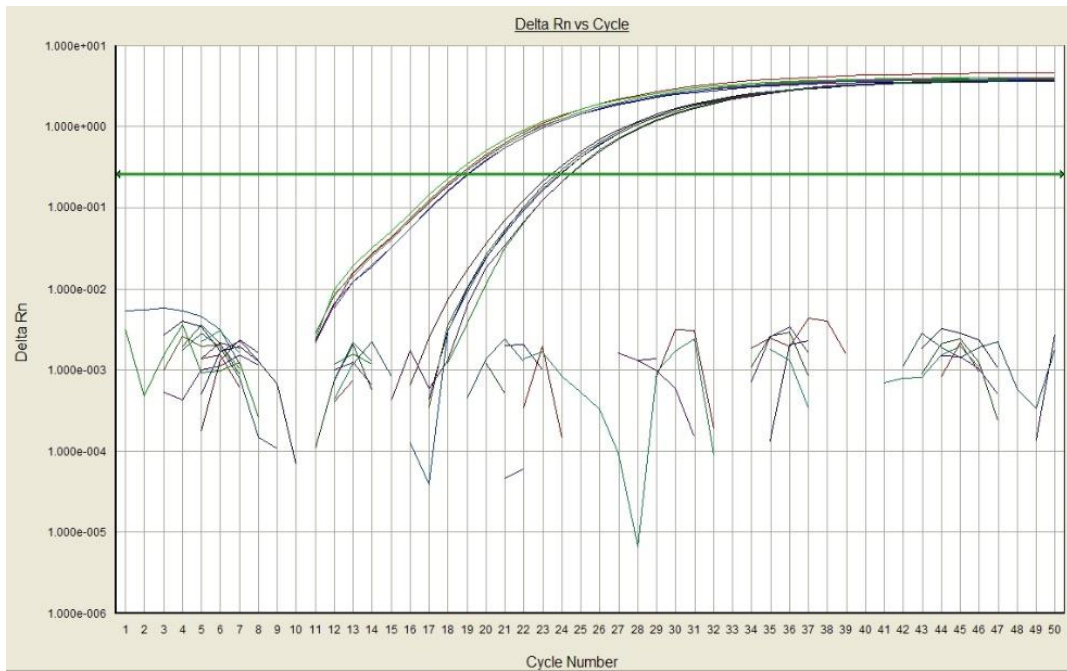


Figura 4: Gráfica de PCR a tiempo real para *S. aureus*

De esta manera podemos confirmar que las muestras anteriores (5 y 101), positivas en medio de cultivo MRSA2, pertenecen a la especie *S. aureus* a partir de su confirmación por medio de PCR a tiempo real.

4.3.2 Detección molecular de genes de resistencia *mecA* y *mecC*.

Las muestras anteriores de MRSA se sometieron a detección de genes que codifican para resistencia a Meticilina (*mecA* y *mecC*) a través de PCR convencional. Los resultados obtenidos evidencian la presencia del gen *mecA* en las muestras confirmadas anteriormente (5 y 101), mientras que la muestra 232 negativa para *E. coli*, no presenta ninguno de estos genes, en concordancia con el resultado anterior.

No se detectó la presencia del gen de resistencia *mecC* en ninguna de las muestras ensayadas.

En la figura que parece a continuación puede observarse lo anteriormente citado. En cada extremo del gel aparecen los marcadores de peso molecular que van de 100 a 1000 pb. Ello se condice con el tamaño de los controles positivos usados para *mecA* 162 pb (pocillo 8 de 11, de izquierda a derecha) y *mecC* de 138 pb (pocillo 9 de 11, de izquierda a derecha), observándose un desplazamiento mayor por parte de *mecC* en el gel. El pocillo 10 corresponde al control negativo empleado.

Las muestras en cuestión se añadieron de izquierda a derecha desde el pocillo 2 al pocillo 6. Las tres primeras bandas pertenecen a la muestra número 5, el pocillo siguiente (negativa) a la muestra 232, y las dos bandas siguientes corresponden a la muestra 101.

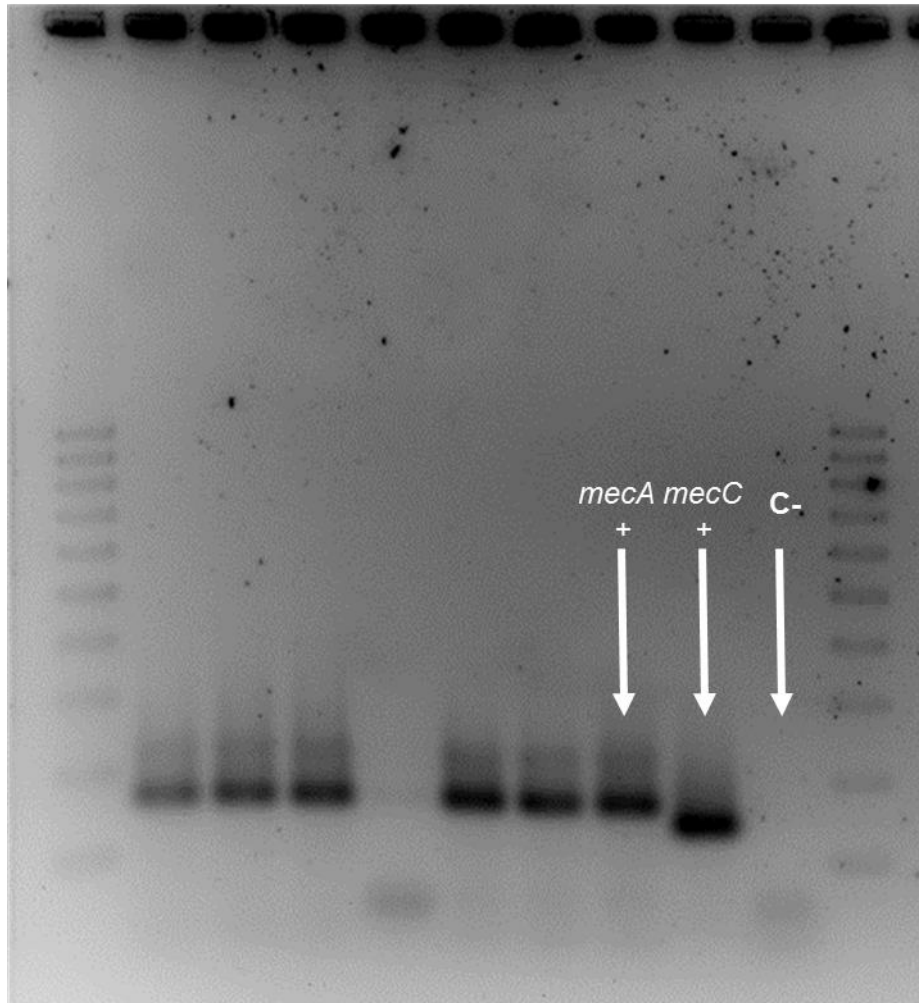


Figura 5: Gel de electroforesis para la detección de *mecA* y *mecC*. En la figura aparecen señalados con flecha blanca los controles positivos para *mecA* y *mecC*, y el control negativo.

La detección genotípica de *mecA* se usa ampliamente como estándar de referencia para la identificación de MRSA, si se emplea como prueba primaria o de confirmación (Chambers, 1997). Sin embargo la presencia de *mecA* no asegura la expresión de dicho gen, pero de acuerdo a los resultados que venimos obteniendo es posible que dicho gen se esté expresando y sea el que confiera la resistencia a la cepas de *E. coli* de este ensayo.

Existen correlaciones significativas o asociaciones positivas entre el uso veterinario de antimicrobianos y la resistencia a los mismos en animales productores de alimentos, que ya han sido demostrados a nivel nacional y europeo (Chantziaras y col., 2014, ECDC / EFSA / EMA, 2015, García-Migura, 2014).

5. Conclusiones

En general concluir que efectivamente, se aíslan microorganismos con resistencias a antibióticos de animales de la cadena alimentaria. En concreto de este estudio podemos concluir que:

1. La detección mediante medios cromogénicos de *S. aureus* resistente a Meticilina (MRSA) en las muestras fue del 11,4% y en el grupo de Enterobacterias KESC se dieron valores de aislados resistentes similares, mientras que la presencia de resistencias en *E.coli* fue manifiestamente superior, aproximadamente de casi el 50% de las muestras analizadas.
2. Las provincias de Lérida y Huesca, unas de las provincias con mayor censo porcino, presentan los valores de aislados con resistencias más altos.
3. En general, la incidencia de *Enterobacterias* productoras de β -lactamasas de amplio espectro (ESBL) resultó en valores superiores que el número de *Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos (CRE).
4. Los medios cromogénicos no son 100% específicos y requieren de una identificación adicional, en nuestro caso utilizamos la confirmación por PCR, para obtener un resultado fiable.
5. Se necesita la comprobación de los resultados mediante antibiograma siguiendo las recomendaciones internacionales anuales (CLSI, EUCAST) para el dictamen final.

6. Agradecimientos

A Marta Hernández Perez, tutora de este trabajo, por recibirme y brindarme la posibilidad de realizar mi TFM. Por su ayuda y buena disposición.

A Lorena López Enríquez, por su buena predisposición, su ayuda y paciencia. Por acompañarme y haber dedicado gran parte de su tiempo para el desarrollo de este trabajo.

A mi familia, a quién dedico este logro, por brindarme su apoyo constante. Por estar siempre presente a pesar de la distancia y ayudarme en todo momento.

A mis amigos y compañeros de Máster, con los que compartí tantos buenos momentos, por recibirme y tratarme como uno más desde el primer día.

Al Programa Becar y mi País, por permitirme realizar el Máster en España a través de su programa y asegurarse de que no me faltase nada en ningún momento.

6. Bibliografía.

- Berge, A.C., Atwill, E.R., Sisco, W.M., (2005). Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev Vet Med.* 69(1-2):25-38.
- Bosman, AB., Wagenaar JA., Stegeman, JA., Vernooij, JC., Mevius, DJ., (2014). Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* in veal calves is associated with antimicrobial drug use. *Epidemiol Infect.* 142(9):1893-904.
- Burow, E., Simoneit, C., Tenhagen, BA., Käsbohrer, A., (2014). Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance in porcine *E. coli* - a systematic review. *Prev Vet Med.* 113(4):364-75.
- Chambers HF (1997). Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*; 10: 781–791.
- Chantziaras I., Boyen F., Callens B. and Dewulf J. (2014). Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 69 (3): 827-834.
- Davis MF, Price L, Liu C, and Silbergeld EK (2011). An ecological perspective on U.S. industrial poultry production: the role of artificial ecosystems on the emergence of drug-resistant bacteria from agricultural environments. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 3, 244-250.
- ECDC, EFSA, EMA. ECDC/EFSA/EMA (2015). first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*; 13: 4006.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2015). EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal*, 13: 4036.
- Gao L., Tan Y., Zhang X., Hu J., Miao Z., Wei L. and Chai T. (2015). Emissions of *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum β -Lactamase Resistance from Pig Farms to the Surrounding Environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(4), 4203-4213
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK,

- Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. (2011). Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis.*, 11(8):595-603.
- Garcia-Migura L., Hendriksen RS, Fraile L. and Aarestrup FM., (2014). Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology Vol 170, Issues 1–2, Pages 1–9.*
- Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (11th ed.) McGraw-Hill Interamericana.
- Hanson BM, Dressler AE, Harper AL, Scheibel RP, Wardyn SE, Roberts LK, Kroeger JS, Smith TC (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infect Public Health*, 4(4):169-74.
- Jones RN, Sadera HS, Fritsche TR (2005). Comparative activity of doripenem and three other carbapenems tested against Gram-negative bacilli with various β -lactamase resistance mechanisms. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease Vol 52, Issue 1, p 71–74.*
- Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., Birnbaum, J. (1979). Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of Antibiotics*, 32(1), 1-12.
- Kluytmans JA., Mouton JW, Ijzerman EPF, Vandenbroucke-Grauls CM, Maat AW, Wagenvoort JH and Verbrugh HA (1995). Nasal Carriage Of *Staphylococcus aureus* As A Major Risk Factor For Wound Infections After Cardiac Surgery. *J Infect Dis.* 171 (1): 216-219.
- Levy, S. B., & Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: Causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10 (12 Suppl), S122-9.
- Li, P., Wu, D., Liu, K., Suolang, S., He, T., Liu, X., Wu, C., Wang, Y., Lin, D., (2014). Investigation of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and enterococci isolated 29 from Tibetan pigs. *PLoS One.* 9(4):e95623.
- Livermore, D. M., & Woodford, N. (2006). The beta-lactamase threat in *enterobacteriaceae*, *pseudomonas* and *acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, 14(9), 413-420.

- Lozano C., Gómez-Sanz E., Benito D, Aspiroz C, Zarazaga M., Torres C., (2011). *Staphylococcus aureus* nasal carriage, virulence traits, antibiotic resistance mechanisms, and genetic lineages in healthy humans in Spain, with detection of CC398 and CC97 strains. *International Journal of Medical Microbiology*. Volume 301, Issue 6, Pages 500–505.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. M., Dunlap, P. V., & Clark, D. P. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos* (12th ed.). Madrid (España): Pearson.
- Martinez-Martinez, L., & Calvo, J. (2010). Development of resistances to antibiotic drugs: Causes, consequences and importance to the public health system. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28 Suppl 4, 4-9.
- Matsushashi M. Ishino F., Tamaki S., Nakajima-Iijima S.s Tonioka S., Nakagawa J, Hirata A., Sprati B.G., Tsuruok T., Inoove S. & Yamada Y. (1986), Mechanism of action of β -lactam antibiotics: inhibition of peptidoglycan transpeptidases and novel mechanisms of action, in "Trends in antibiotic research". Japan Antibiotics Research Association, Tokyo, pp. 99-114
- Pantosti A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance in human health. *Frontiers in Microbiology*, Review article 127, vol. 3, p19 – 30.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943-4960.
- Rodrigo C., (2010). Use of antibiotics in the paediatric population. [Uso de los antimicrobianos en la población pediátrica] *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(5), 310-320.
- Scallan E., Griffin PM., Angulo FJ., Tauxe RV., and Hoekstra RM., (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Unspecified Agents. *Emerging Infectious Diseases journal*, Volume 17, Number 1.
- Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F., El-Jade M., Reif M, Hack S., Meilaender A., Montabauer G., Fimmers R., Parcina M., Hoerauf A., Exner M., Petersen B., Bierbaum G., Bekeredjian-Ding I. (2015). Analysis of Transmission of MRSA and ESBL-E among Pigs and Farm Personnel. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0138173>
- Shore CA, Deasy EC, Slickers P., Brennan G., O'Connell B., Monecke S., Ehricht R. and Coleman DC (2011). Detection of *Staphylococcal* Cassette Chromosome *mec* Type

- XI Carrying Highly Divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ*, and *ccr* Genes in Human Clinical Isolates of Clonal Complex 130 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Vol. 55 no. 8, 3765-3773
- Simoneit, C., Burow, E., Tenhagen, BA., Käsbohrer, A., (2014). Oral administration of antimicrobials increase antimicrobial resistance in *E. coli* from chicken--a systematic review. *Prev Vet Med.* 118(1):1-7.
- Stegger M., Andersen PS., Kearns A, Pichon B., Holmes MA., Edwards G., Laurent F., Teale C., Skov R. and Larsen AR. (2012). Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. *Clin Microbiol Infect*; 18: 395–400
- Suarez, C., & Gudiol, F. (2009). Beta-lactam antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129.
- Trnčíková T., Hrušková V., Oravcová K., Pangallo D., Kačíková E. (2009). Rapid and Sensitive Detection of *Staphylococcus aureus* in Food Using Selective Enrichment and Real-Time PCR Targeting a New Gene Marker. *Food Anal. Methods*, 2: 241.
- Verraes C., Van Boxstael S., Meervenve EV., Van Coillie E., Butaye P., Catry B., Athénaïs de Schaetzen M., Van Huffel X., Imberechts H., Dierick K., Daube G., Saegerman C., Jan De Block, Dewulf J. and Herman L. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 10, 2643-2669.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., and Wulf M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Pig Farming. *Emerging Infectious Diseases journal* Volume 11, Number 12.
- Wegener HC. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development.. *Curr Opin Microbiol*; 6(5):439–45. PMID: 14572534.
- Witte W.; Strommenger B.; Stanek C.; Cuny C. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 13 (2), S. 255-258