



PROPUESTA A PREMIO ACADEMIA

Título: Primeros hallazgos de resistencia antimicrobiana en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales en la producción porcina en Cuba

Autores Principales: Ivette Espinosa Castaño¹ y Michel Báez Areas¹

Otros Autores: Karelía Martha Marrero Moreno³, Vincent Perreten², Evelyn Lobo¹, Siomara Martínez¹, Marta Mora Llanes², Alexandra Collaud², Pastor Alfonso Zamora¹, Rosa Elena Hernández³.

Colaboradores: Gysleibis Miranda Silva¹, Marisela Santos¹, Yaday Alfonso Mirabal¹, Belkis Corona González¹, María Iriam Percedo Abreu¹, Aleika Iglesias Lozano¹, Odalys Uffo Reynoso¹, Nivian Montes de Oca Martínez¹, Ondina León Días¹, Mercedes Martha Mora Llanos³, Tania García Morey³, Odalys Pérez Benitez, Norma González Socorro³

Otras entidades participantes:

Unidad Ejecutora Principal del Resultado: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria¹.

²Instituto de Bacteriología Veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad de Berna, Suiza

³CPHEM Centro Provincial Higiene y Epidemiología, Matanzas

⁴Matadero `` Empresa Cárnica Nueva Paz``

Mayabeque, 2017

Título: Primeros hallazgos de resistencia antimicrobiana en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales en la producción porcina en Cuba

Unidad Ejecutora Principal del Resultado: Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria¹.

Autores: Ivette Espinosa¹ y Michel Báez¹

Otros Autores: Karelía Martha Marrero Moreno³, Vincent Perreten², Evelyn Lobo¹, Siomara Martínez¹, Marta Mora Llanes², Alexandra Collaud², Pastor Alfonso Zamora¹, Rosa Elena Hernández³

Colaboradores: 13

Resumen

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un desafío para la salud humana y animal. La OMS, FAO y OIE, bajo el enfoque de Una Salud, se han pronunciado para su contención en el más breve plazo posible. En Cuba la magnitud de la RAM en la crianza animal ha sido poco investigada. El presente estudio caracterizó la resistencia antimicrobiana en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina en provincias de la región occidental, constituyendo una contribución local a las acciones globales que se desarrollan. Las cepas de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* identificadas, a partir de cerdos con procesos respiratorio, fueron resistentes a tetraciclina y espectinomicina y sensibles a antibióticos β -lactámicos y quinolonas, sin embargo expresaron otras formas de resistencia como la formación de biopelículas y de células persistentes, que contribuyen a tolerar estos antibióticos, lo cual explica fracasos terapéuticos y las infecciones recurrentes que ellas causan. La estrategia *in vitro* de uso combinado de antimicrobianos fue efectiva en la inhibición de estos atributos de resistencia. La presencia de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina fue detectada por primera vez en cerdos sacrificados en matadero con destino al consumo humano. Se estableció la composición de los clones que conforman estas cepas y se comprobó la presencia del clon pandémico USA300-ST8. Otro resultado fue la presencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), en granjas y mataderos, con capacidad para la transmisión de genes móviles de resistencia y alta implicación en los esquemas de tratamiento. La información obtenida permite orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar la diseminación de estas bacterias y su transmisión entre hombres y animales. Los resultados están avalados por 10 publicaciones, destacando: International Journal of Antimicrobial Agent (FI:4. 307) y Polish Journal of Microbiology (FI:0,993), entre otros eventos y trabajos de tesis. No se ha presentado a premio anteriormente.

2. Aporte científico personal de cada autor al resultado

Ivette Espinosa Castaño: Definió la temática y diseñó gran parte del trabajo experimental, análisis e interpretación de los resultados obtenidos, preparó los manuscritos para publicación. Participó en los muestreos de las investigaciones, en la adecuación de los protocolos de experimentación, así como en el análisis científico-práctico de los resultados. Es autor y coautor de las publicaciones y eventos presentados. Fue tutor de la tesis de Grado y tutor de una tesis de maestría. **20%**

Michel Área Báez: Participó en los muestreos de las investigaciones, en el análisis científico-práctico de los resultados, ejecutó parte del trabajo experimental preparó manuscritos para su publicación, es ejecutor de una tesis de maestría. **20%**

Karelia Martha Marrero Moreno: Contribuyó de forma decisiva en la selección y colección de las muestras de interés, en el municipio de Matanzas para la detección de enterobacterias productoras de betalactamasas, en la ejecución del trabajo experimental en el análisis científico-práctico de los resultados **16%**.

Vincent Perreten: Aporte personal Trabajó en el diseño y desarrollo de las investigaciones, en el montaje de las técnicas de laboratorio y en el análisis científico-práctico y discusión de los resultados. Es autor en la publicación y eventos presentados. **10%**

Evelyn Lobo Rivero: Contribuyó de forma decisiva en la coordinación para la toma de las muestras de interés. Contribuyó en el análisis de los resultados y en la consulta con especialistas nacionales. **8%**

Pastor Alfonso Zamora: Contribuyó en el análisis y discusión de los resultados y en la consulta con especialistas nacionales. **8%**

Siomara Martínez Marrero: Contribuyó en el análisis y discusión de los resultados y en la consulta con especialistas nacionales **6%**

Alexandra Collaud: Aporte personal Trabajó en la preparación de los medios y soluciones utilizados en todos los experimentos y en la realización de los experimentos. Participó en el análisis práctico de los resultados. **6%**

Rosa Elena Hernández: participó en el trabajo experimental relacionado con la identificación por pruebas bioquímicas de enterobacterias. **6%**

Colaboradores: 13 Gysleibis Miranda Silva¹, Marisela Santos¹, Yaday Alfonso Mirabal¹, Belkis Corona González ¹, María Iriam Percedo Abreu¹, Aleika Iglesias Lozano¹, Odalys Uffo Reynoso¹, Nivian Montes de Oca Martínez¹, Ondina León Días¹, Mercedes Martha Mora Llanos³, Tania García Morey³, Odalys Pérez Benitez, Norma González Socorro³

Autor para la correspondencia: Ivette Espinosa Castaño Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apdo. 10, San José de Las Lajas 3270
espinosa@censa.edu.cu

III. Comunicación corta

La resistencia antimicrobiana (RAM) es un evento de importancia en la salud humana y animal. El uso indiscriminado de los antibióticos y su impacto en la RAM, han sido reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que en el año 2015 definió un *Plan de Acción Global*, requiriendo de los países miembros un Plan Nacional. La Organización Mundial de Salud Animal (OIE) y la Organización de Naciones Unidas sobre Alimentos y Agricultura (FAO), también se han sumado a este propósito. Las estrategias para la contención de la RAM, se apoyan en investigaciones que aporten datos locales sobre tendencias en la resistencia y faciliten los análisis de riesgos para su contención (OMS, 2015).

La crianza del cerdo en Cuba, es la principal fuente de proteína para la población, por tal motivo preservar su salud es prioridad. Las bacterias patógenas que afectan la salud porcina precisan un diagnóstico adecuado que incluye además, los perfiles de susceptibilidad microbiana (SM) para garantizar un correcto uso de los antibióticos. Debido al alarmante incremento de la RAM, es necesario detectar la posible presencia de bacterias con potencial zoonótico o comensales, que contienen genes de resistencia en elementos móviles (plásmidos), que se propagan a través de la transferencia horizontal. Estas bacterias colonizan al cerdo y pueden ser diseminadas en la cadena de producción de alimentos, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), son las especies de mayor impacto (Schmithausen y col., 2015).

Las infecciones causadas por SARM en humanos son un reto, por su virulencia y la multiresistencia, asociada a elementos genéticos móviles de amplia propagación, se describen clones pertenecientes a las secuencias tipos (ST), ST1, ST8, ST80, ST59, ST30 diseminados a nivel global. La ST8 (clon USA300) presenta tres factores de virulencia: el elemento móvil para el catabolismo de la arginina (ACME I), casete cromosómico staphylococico *mec* (SCC*mecIVa*) y la leucocidina de Pantón–Valentine (LPV). Este clon causa infecciones a pacientes en la comunidad (SARM-AC) y en el ámbito hospitalario (SARM-AH). USA300 con el casete SCC*mecIVc* y negativo para ACME emergió en el norte de Sur América y se ha denominado Variante Latinoamericana (USA300-VL) (García y col., 2014; Schmithausen y col., 2015). En Cuba USA300 fue reportado en el año 2015 en infecciones asociadas a la comunidad (Leiva y col., 2015) y USA300–VL no ha sido identificado hasta el momento. Los cerdos principalmente a nivel mundial portan el linaje ST398, asociados al ganado (SARM-AG), pero hasta el momento no existen datos publicados sobre SARM-AG en Cuba.

El incremento de intoxicaciones alimentarias y de procesos urémicos por cepas de *E.coli* productoras de BLEE resistentes a betaláctamicos, en pacientes en la comunidad, sugiere su diseminación en diferentes entornos, como la crianza intensiva de especies animales para el consumo humano (Schmithausen y col., 2015). A partir de estos antecedentes el objetivo general de este trabajo fue determinar la resistencia a antibióticos en especies de bacterias patógenas (*S.suis* y *P.multocida*), zoonóticas (SARM) y comensales (Enterobacterias productoras de BLEE) asociadas a la crianza porcina en Cuba.

Los estudios se realizaron en el laboratorio de Bacteriología Animal del CENSA, que por procedimientos de diagnóstico de rutina, dispone de una colección de cepas patógenas de *S. suis* y *P. multocida*, establecida desde el año 2002-2016, obtenida de cerdos (categoría preceba y ceba), enfermos con procesos respiratorios y artritis, procedentes de granjas ubicadas en las provincias Mayabeque, Pinar del Río y Matanzas. Para la detección de SARM se tomaron 285 exudados nasales en cerdos de matadero procedentes de las provincias Mayabeque (n=67), Matanzas (n = 90) y Cienfuegos (n = 128) en el año 2015, mientras la detección de enterobacterias productoras de BLEE se realizó a partir de 200 hisopados tomados del recto de animales sanos, (categoría pre-ceba), de manos de

personal, superficies, así como de utensilios para la alimentación y manipulación de animales en tres granjas y dos mataderos en Matanzas durante los años 2016 y 2017.

La metodología general se basó en el uso de técnicas de ácido nucleicos, reacción en cadena de la polimerasa (PCR de sus siglas en inglés), la secuenciación, la tipificación por geno-serotipificación, la aglutinación con antisueros específicos y las pruebas de difusión con discos según el CLSI (2016).

En la crianza porcina cubana los problemas respiratorios son la segunda causa de muerte (DSA, 2016), son procesos complejos por su etiología, en los que aún el diagnóstico precisa discriminación microbiológica, clasificación intra-especie, acorde a estándares internacionales. *S.suis* ocasiona procesos respiratorios y sistémicos (artritis, meningitis y endocarditis), incluso en humanos con riesgo ocupacional, es una especie heterogénea, en la cual se incluyen 33 serotipos diferentes en cuanto a su distribución y virulencia. El estudio de la diversidad intra-especie de las cepas de *S. suis* que forman parte de la colección evidenció los siguientes serotipos capsulares en las cepas que fueron aisladas entre los años 2008-2015. 1, 1/2, 2, 3, 9, 13, 23, 24, 31, donde el serotipo 2 fue el más frecuente y se aisló de animales con neumonía y artritis. *P. multocida* es una bacteria asociada a la neumonía porcina y conformada por 5 serotipos capsulares (2). El serotipo capsular A de *P. multocida* se encontró mayoritariamente, y con muy baja frecuencia el D, todos aislados de cerdos con neumonía.

El estudio de la SM reveló un incremento en la resistencia de los aislados de *S. suis* y *P. multocida* colectados a partir del año 2008, con respecto a los aislados de los años 2002-2004. La tetraciclina y espectinomicina, de uso común en la ganadería porcina, no fueron efectivos *in vitro* para ninguno de los aislados de ambas especies. Los antimicrobianos que mostraron mayor eficacia fueron los betalactámicos, quinolonas y sulfametoxazol/trimetoprim.

La detección de expresiones de resistencia transitoria en cepas de *S.suis* y *P.multocida* que fueron sensibles a betalactámicos y quinolonas, reveló la capacidad de resistir a estos compuestos. Las cepas no tipificadas de *S. suis* formaron biopelículas que fueron más resistentes a penicilina, que su contraparte en crecimiento plantónico, las cepas de *P. multocida* no formaron biopelículas. La combinación de penicilina y el agente mucolítico N-acetil cisteína permitió la reducción en la formación de las biopelículas de *S.suis in vitro*.

Por otra parte, las cepas de *S. suis* y *P. multocida* que fueron sensibles en las pruebas de difusión con discos, formaron células persistentes, bajo la acción de β -lactámicos y quinolonas. Esta es la primera vez que se describe la formación de células persistentes por *P.multocida* y corrobora este comportamiento previamente descrito por otros autores en cepas de *S.suis* (Willenborg y col., 2014). El ensayo de potenciación mostró que es posible la erradicación de células persistentes *in vitro* a través de las combinaciones de aminoglucósido (gentamicina) con glicerol y gentamicina con arginina, La manifestación de estos fenotipos de resistencia transitoria no asociada a cambios genéticos puede explicar fracasos terapéuticos y recurrencia en infecciones respiratorias, que suelen presentarse en forma subclínica, reduciendo la capacidad pulmonar y la eficiencia en la ganancia en peso del animal.

En cuanto a la detección de bacterias con potencial zoonótico, en este trabajo se encontró una prevalencia de 7,7% de SARM en exudados nasales de cerdos. La estructura genética de los aislados, evidenció tres grupos clonales: grupo 1 (PFGE I) clon ST8-t024-IV, SCC*meclVa*, *dru* dt9g [LPV+/ACME I+] (9/22) con genes para las enterotoxinas *sek* y *seq*, genes de resistencia a β -lactámicos, macrólidos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas similar al clon USA300. El segundo grupo USA300-VL, (PFGE II) ST8-t008-IV, SCC*meclVc*, *dru* dt7j [LPV+/ACME-] (9/22), *sek-seq* solo presentó resistencia a β -lactámicos. La tercera agrupación (PFGE III) comprendió clones de la ST5, *spa* t010, SCC*meclVc*, *dru* dt10a [LPV-,

ACME-] (4/22), los cuales portan los genes para varias enterotoxinas y mostraron resistencia a β -lactámicos y aminoglucósidos. Este estudio reveló que cerdos en Cuba son colonizados por SARM, predominantemente asociados al clon pandémico USA300-ST8, el cual causa severas infecciones en piel, tejidos blandos y neumonía necrotizante, fatal en humanos.

En granja y matadero en Matanzas, se detectaron 16 cepas de *E. coli* BLEE positivas por pruebas fenotípicas y genotípicas. La detección por PCR reveló una mayor frecuencia del gen *bla* CTX-M, acorde a la situación epidemiológica que se describe en la actualidad para las enzimas BLEE. Este estudio evidencia la diseminación de cepas de *E.coli* BLEE+ en ámbitos no clínicos, existiendo reservorios de dichos microorganismos en la microbiota intestinal en los animales, que pueden ser un vehículo importante para su transferencia al hombre y a otros animales.

Finalmente el trabajo aporta resultados concluyentes que explican la necesidad de evaluar las propuestas terapéuticas para controlar las infecciones por *S.suis* Y *P.multocida*. Demuestra que la microbiota nasal e intestinal de animales sanos destinados al consumo humano, supone un reservorio de genes de resistencia que al estar localizados en estructuras genéticas con una alta capacidad de movilización, pueden ser fácilmente diseminados entre bacterias de origen animal y en el entorno humano. Los resultados proporcionan las bases para los análisis de los factores que contribuyen al aumento alarmante de estas bacterias resistente en diferentes ecosistemas, lo que exigirá el trabajo conjunto y coordinado de todos los sectores implicados en la cadena de producción y consumo de cerdos en Cuba. Por primera vez en Cuba se caracterizan la resistencia microbiana de especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina, lo cual es una contribución local a las acciones globales para la contención de la RAM.

Referencias

1. OMS. Proyecto de plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos Resistencia a los antimicrobianos Organización mundial de la salud 68 Asamblea mundial de la Salud A 68/20.2015.
2. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, et al. (2015) Analysis of Transmission of MRSA and ESBLE among Pigs and Farm Personnel. PLoS ONE 10 (9):
3. García ML, Hendriksen RS, Fraile L and Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. Veterinary Microbiology. 2014(170); 1–9.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (CLSI). (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 26th ed. CLSI Supplement Informational Supplement M100S. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, USA
5. Leiva Peláez O, Stojanov M, Zayas Tamayo AM, Barreras García G, González Alemán M, Martínez Ceballos, L., et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 4 Cuban hospitals. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 81:1–3.
6. Willenborg J, Willms D, Bertram R, Goethe R and Valentin-Weigand P. Characterization of multi-drug tolerant persister cells in *Streptococcus suis*. BMC Microbiology. 2014; 14:120.
7. Wang S., Y. Y., Y. Zhao, H. Zhao, J. Bai, J. Chen, Y. Zhou, C. Wang and Y. Li 2016. "Sub-MIC Tylosin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation and results in differential protein expression." Frontiers in Microbiology 7: 9.
8. Bram Van den Bergh, Maarten Fauvart, Jan Michiels. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters FEMS Microbiol Rev (2017) 41 (3): 219-251.

La **originalidad e impacto científico** de este trabajo están dados por la siguiente contribución al conocimiento:

1. Por primera vez en Cuba se determinan mecanismos de resistencia en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina, lo cual es una contribución local a las acciones globales para la contención de la RAM.
2. Se confirma el diagnóstico según estándares internacionales de dos especies patógenas para el cerdo *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis*
3. Se identifican cepas de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* resistentes *in vitro* a tetraciclina y espectinomicina, y se revela que aún cuando son susceptibles a otros antibióticos como β -lactámicos y quinolonas, llegan a expresar otras formas de resistencia como la formación de biopelículas y de células persistentes que contribuyen a recidivas de las infecciones que ellas causan
4. Las estrategias de uso combinado de agentes antimicrobianos *in vitro* demostraron resultados favorables en la destrucción de biopelículas de *S.suis*, con el uso de Penicilina y N-acetyl cisteína, y de las células persistentes de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* mediante la combinaciones gentamicina con glicerol y arginina.
5. Se determina por primera vez la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en cerdos sacrificados en matadero con destino al consumo humano. Se estableció la composición de los clones que conforman estas cepas y se comprobó la presencia del clon pandémico USA300-ST8.
6. Se determina por primera vez la presencia de cepas de *E.coli* productoras de BLEE a partir de muestras de hisopados rectales, manos de operarios, superficies e instrumentos de trabajo, sugiere que estas instalaciones son reservorios de estas cepas y facilitan su diseminación desde el excremento de los cerdos al ambiente circundante.
7. Se detectaron mayoritariamente cepas de *E.coli* productoras de BLEEs del tipo CTX-M y en menor medida del tipo TEM, acorde a la situación epidemiológica actual para las enzimas BLEE.

La importancia práctica del trabajo radica en:

1. La información obtenida es de valor para orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar la diseminación de estas bacterias zoonóticas y su transmisión entre el hombre y los animales, al revelar su presencia.
 2. Se dispone de las siguientes colecciones microbianas: *S.suis*, *P.multocida*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y *Escherichia coli* productora de Betalactamasa de espectro extendido (BLEE) identificadas y caracterizadas en cuanto a virulencia y mecanismos de resistencia, que son útiles:
- ✓ Como controles en investigaciones para el desarrollo y aplicación de ensayos de diagnóstico.
 - ✓ En el estudio de expresiones de resistencia adquirida y transitoria de nuevas cepas correspondientes a estas especies y de otras especies.
 - ✓ En la evaluación de propuestas antimicrobianas (extractos de plantas, péptidos, combinaciones de medicamentos ya existentes) *in vitro* e *in vivo*.

4. DESCRIPCIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA DETALLADA DEL RESULTADO

4.1 Introducción

Los antibióticos son de gran utilidad para el control de las infecciones bacterianas. Sin embargo, la resistencia antimicrobiana (RAM) que es la capacidad de los microorganismos de resistir a la acción de los antibióticos, es uno de los eventos de mayor impacto en el control de infecciones en la salud humana y veterinaria en la actualidad. Las consecuencias de una infección por microorganismos resistentes incluyen, mayor duración de la misma, tratamientos prolongados, incremento de la mortalidad y de los costos de la atención médica y veterinaria (CLSI, 2016, Aarestrup, 2004; Seiffert y col., 2013).

Los estudios de RAM en la crianza animal son escasos, a nivel mundial, incluso para aquellas bacterias que resultan patógenas para determinadas especies de interés económico como es el cerdo. La crianza del cerdo en Cuba, es un renglón de importancia y constituye la principal fuente de proteína animal para la alimentación de la población. Por tal motivo, la preservación de la salud en esta especie y el diagnóstico y control de las enfermedades que la afectan, es un tema de prioridad en la porcicultura, así como la aplicación de medidas que garanticen la bioseguridad y baja difusión de bacterias comensales y zoonóticas (Vilda Figueroa., 1994). Este trabajo está orientado al estudio de mecanismos de resistencia en: dos bacterias patógenas para el cerdo (*Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida*) y en especies que constituyen un riesgo en la cadena de producción de alimentos de origen porcino *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) por su carácter de zoonosis y Enterobacterias comensales productoras de betalactamasas de espectro extendido BLEE.

En Cuba, en la crianza porcina los problemas respiratorios constituyen la segunda causa de muerte, según informes de la (DSA, 2016). El diagnóstico del Complejo respiratorio porcino (CRP) se basa en el examen clínico y no se realiza la confirmación microbiológica y la clasificación intra-especie, acorde a los estándares internacionales, de los microorganismos que participan, a pesar de la naturaleza polimicrobiana de esta condición. *S. suis* y *P. multocida* son dos especies frecuentes en estos procesos, según informes de la DSA, en los últimos 5 años, pero no existen datos sobre la susceptibilidad microbiana (SM) de las mismas o posibles mecanismos de resistencia.

S. suis ocasiona además de procesos respiratorios, infecciones sistémicas (meningitis y endocarditis), en humanos constituye una zoonosis para el personal con riesgo ocupacional y resulta más común en países asiáticos. En humanos la meningitis es la presentación más frecuente se reporta mortalidad entre un 5 a 10% (Gottschalk y col 2005; Huaijie H y col., 2013). Esta bacteria es una especie heterogénea, que agrupa 33 serotipos según la composición de los polisacáridos de la cápsula, con diferencias en cuanto a su distribución y virulencia, de ellos el serotipo 2 presenta la mayor distribución a nivel mundial, en este serotipo se agrupan las cepas de mayor patogenicidad asociadas a procesos clínicos respiratorios, a eventos invasivos como meningitis, septicemia. (Lun., 2007; Zhijie Liu y col., 2013). En Cuba, con anterioridad a los resultados de este trabajo no existían datos sobre la

diversidad intra-especie de las cepas que circulan en regiones del país, específicamente de los serotipos más frecuentes.

P. multocida es una bacteria Gram negativa, asociada a la neumonía porcina, conformada por cinco serotipos capsulares con diferencias en su rango de hospedero. Cada serotipo se asocia con un hospedero específico, pero no completamente restringido al mismo (Urlick y col., 2005). Aún, cuando se espera que el serotipo capsular A sea el más frecuente acorde a los reportes a nivel mundial para infecciones en el cerdo, en Cuba tampoco existe información sobre los serogrupos capsulares de *P. multocida* que afectan al cerdo.

En las bacterias, los mecanismos que le permiten la resistencia consisten en: alteración de la permeabilidad de la membrana, modificación enzimática del antimicrobiano, expulsión activa del agente terapéutico, alteración, protección o hiperproducción de la diana o, de manera más infrecuente, desarrollo de nuevas vías metabólicas. Estos mecanismos son adquiridos a través de cambios genéticos, mutaciones, delecciones o inserciones mediante la incorporación de elementos genéticos móviles (secuencias de inserción, transposones o plásmidos), de ahí su denominación como resistencia adquirida (Martínez-Martínez y Calvo, 2010).

Sin embargo, existen otras manifestaciones de resistencia, aún no consideradas en la práctica previa a la prescripción y cuyos mecanismos tampoco han sido esclarecidos. Este tipo de resistencia ocurre sin cambios genéticos, son denominadas como “resistencia transitoria” o “tolerancia fenotípica” y consisten en la producción de biopelículas y la formación de células persistentes (Gang Zhou y col., 2015). Las bacterias que muestran estos fenotipos de resistencia, son sin embargo, sensibles en pruebas convencionales de susceptibilidad antimicrobiana, por lo que se espera que el tratamiento antimicrobiano sea efectivo, pero al expresar estas formas de tolerancia ocurren fracasos terapéuticos y recidivas de las infecciones. Estos eventos son regulados por la densidad celular bacteriana, sistemas toxinas-antitoxinas y otros reguladores universales, le permiten a la población perpetuarse al tolerar las condiciones adversas como la presencia de antibióticos (Bram Van den Bergh y col., 2017).

En los últimos años se han descrito diferentes metodologías que simulan la formación de biopelícula *in vitro* y permiten determinar la actividad antimicrobiana en estas condiciones, mientras para la detección de células persistentes se utilizan las curvas de letalidad (Merle y col., 2012). Para ambas expresiones de crecimiento bacteriano en presencia de condiciones adversas (biopelículas y células persistentes), se recomiendan diferentes estrategias para su erradicación *in vitro*, como son las combinaciones de antibióticos o moléculas biocidas (Aslam y col., 2007) y de aminoglucósidos y metabolitos carbonados, conocido como ensayo de potenciación para la erradicación de células persistentes (Allison y col., 2011).

Grenier y col., 2009 describieron la formación de biopelículas para *S. suis*, mientras Willenborg y col., 2014 demostraron la formación de células persistentes para *S. suis*, para *P. multocida* aun no ha sido descrita la formación de estos eventos. Sin embargo en ambos microorganismos no se ha informado el efecto de estrategias combinadas para la erradicación de estas formas de crecimiento celular (biopelículas y células persistentes), *in vitro*, por lo que uno de los aspectos que se abordará en este estudio es la capacidad de expresar tolerancia fenotípica por cepas de *S. suis* y *P. multocida* de origen porcino y evaluar combinaciones de moléculas para su

erradicación, previo a estas investigaciones se establecerán las condiciones para la confirmación de especies y serotipificación, según estándares internacionales.

Las posibilidades de diseminación de los genes bacterianos de resistencia a los antimicrobianos son múltiples, debido a que es una propiedad codificada en el material genético. Además de ser transmitido a las siguientes generaciones bacterianas (transmisión vertical), también pueden ser transferidos o captado por otras bacterias físicamente próximas (transmisión horizontal), tanto de la misma especie como de especies filogenéticamente alejadas, a través de conjugación, transformación o transducción, con la consiguiente pérdida de eficacia terapéutica de uno o varios de esos agentes antimicrobianos tanto en la medicina humana como en la veterinaria y esto acontece a su vez durante la cadena de producción de alimentos de origen animal (Madigan y col., 2004; Martínez, 2009; FAO, 2016).

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 favorecer la transmisión de dichas resistencias a otras bacterias con el consumo del propio alimento. 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 y a humanos (Davis y col., 2011). En este trabajo nos centramos en la investigación de dos grupos de bacterias con riesgo de ser transmitidas al humano en la crianza porcina, por el consumo de alimentos contaminados o por el contacto con animales colonizados: SARM y Enterobacteriaceae productoras de BLEE ambas responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Lozano y col., 2011).

La epidemiología de SARM y de las enterobacterias BLEE es compleja y, en las últimas décadas, se ha convertido en uno de los mayores problemas de Salud Pública a nivel mundial. Son varios los factores principales que han influido en este hecho, 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 (Mediavilla y col., 2012).

La emergencia de los linajes SARM-CO (adaptado a la comunidad, de sus siglas en Inglés CA-MRSA) tiene una gran importancia en su epidemiología dificultando la prevención y control de las infecciones, ya que colonizan de forma asintomática al ser humano que actúa como reservorio del patógeno. Algunos clones de SARM aislados de humanos pertenecen a las secuencias tipo: ST1, ST8, ST80, ST59 y ST30 se han propagado en todo el mundo. Entre ellos, ST8, también conocido como el clon USA300, se ha establecido como una de las principales cepas epidémicas a nivel mundial que causan infecciones tanto en la comunidad como en los hospitales (HA-SARM). El clon USA300 se caracteriza por el elemento móvil catabólico de arginina (ACME) I, el casete cromosómico *mec* (SCC*mec*) IVa y la leucocidina de Pantón-Valentine (PVL). Otra cepa epidémica asociada a infecciones en la comunidad, estrechamente relacionada con USA300, ha surgido en el norte de Sudamérica y es conocida como la variante USA300-Latinoamericana (USA300-LV).

Esta variante difiere del clon USA300 por presentar la región SCC $_{mecIVc}$ y la ausencia del ACME (Mediavilla y col., 2012).

Desde el año 2005 se han detectado aislados de SARM 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). En el año 2011 en Cuba, las infecciones humanas causadas por SARM se asociaron predominantemente con el clon USA300, y la variante latinoamericana no fue identificada (Leiva y col., 2015). Aunque estos linajes generalmente no están asociados a los cerdos como portadores, los cuales son colonizados principalmente por el linaje ST398 de SARM (LA-SARM) asociado al ganado (Wettstein Rosenkranz y col., 2014), no se puede excluir la presencia de clones epidémicos humanos en cerdos. Dado que en Cuba no existían datos sobre la presencia de SARM en cerdos, decidimos investigar su situación epidemiológica en cerdos sacrificados en mataderos y representativos de tres provincias del país.

La presentación de procesos infecciosos en la comunidad intoxicaciones alimentarios o procesos urémicos por Enterobacterias resistentes a β -lactámicos, las evidencias de una rápida diseminación de estas cepas resistentes y de genes de resistencia entre humanos, y también entre animales ha orientado las investigaciones también a las infecciones adquiridas en la comunidad y sus entornos para este mecanismo de resistencia (Florence Crombé y col., 2013; Jean-Winoc Decousser y col., 2017).

En bacterias gramnegativas, específicamente en Enterobacterias uno de los mecanismos predominantes de la resistencia a antibióticos β -lactámicos es la producción de β -lactamasas. Las β -lactamasas, son enzimas que pueden ser codificadas en cromosomas o en plásmidos y presentan una amplia diversidad. Las BLEE son las que mayor riesgo ofrecen para la salud animal y humana, pueden ser ampliamente propagadas. Estas enzimas inactivan el anillo β -lactámico de cefalosporinas de amplio espectro y monobactámicos, mediante hidrólisis. Las estrategias de laboratorio para discriminar entre la amplia familia de betalactamasas se basan en el empleo de métodos fenotípicos y moleculares, en la actualidad existen diversos ensayos, pero a su vez se incrementa la familias de estas enzimas que complican la detección fenotípica de las mismas ((Claire Verraes y col., 2013 Jean-Winoc Decousser y col., 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el problema del uso de antibióticos en la ganadería y su contribución al desarrollo de resistencias a los mismos como una amenaza para la salud mundial y en el año 2015 definió su *Plan de Acción Global*, el cual es apoyado por la Organización de Naciones Unidas sobre Alimentos y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Salud Animal (OIE). Esta estrategia global requiere de los países, el desarrollo a su vez de un Plan de Acción Nacional para hacer frente a la resistencia antimicrobiana y en los mismos es preciso incorporar aspectos relacionados al consumo de antibióticos en animales, y caracterización de los mecanismos de resistencia de las bacterias que son frecuentes en cada región(OMS, 2015).

En Cuba existen programas para la vigilancia y monitoreo de las enterobacterias productoras de betalactamasas en instalaciones hospitalarias y con menor medida en la comunidad. Así han sido detectadas cepas de *Klebsiella* spp productoras de BLEE en instalaciones hospitalarias de diferentes provincias del país (Dianelys y col., 2012).

Sin embargo en la medicina veterinaria en Cuba no existen estudios que aborden la identificación de los eventos descritos anteriormente, específicamente la susceptibilidad y otras formas de resistencia en cepas patógenas como puede ser *S.suis* y *P.multocida*. Así como la presencia de especies con potencial zoonótico y comensales, específicamente SARM, o enterobacterias productoras de BLEE, en las cuales los mecanismos que soportan su resistencia, favorecen la diseminación vertical, horizontal y la multirresistencia.

Objetivo general:

Determinar la resistencia a antibióticos en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina en Cuba.

Objetivos específicos:

1. Identificar eventos de resistencia transitoria a los antibióticos en cepas patógenas de *S.suis* y *P.multocida* para la crianza porcina.
2. Determinar la presencia y estructura poblacional de la bacteria zoonótica *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en la crianza porcina.
3. Caracterizar la producción de β -lactamasas de espectro extendido en Enterobacterias comensales asociadas a la crianza porcina.

4.2 Materiales y métodos generales.

4.2.1 Aspectos éticos del estudio

Se tuvo en cuenta el previo consentimiento informado de todo personal involucrado en la investigación para la toma de muestra. Los administrativos de la unidad y del servicio veterinario otorgaron el permiso para la toma de muestra de los animales incluidos en el estudio. Los cerdos seleccionados para la toma de muestra fueron mantenidos en condiciones de manejo y tenencia propias de cada unidad.

4.2.2 Reactivos, se utilizaron los siguientes antibióticos: Ampicilina, Enrofloxacin para *P.multocida*, Penicillina y Enrofloxacin para *S.suis* y Gentamicina para ambas especies y el agente mucolítico N-acetylcisteína (NAC), las soluciones stock se prepararon siguiendo recomendaciones CLSI 2016, se esterilizaron con filtro de tamaño de poro 0.22 μ m. Todas las alícuotas se conservaron a -20°C y se protegieron de la luz. Los metabolitos empleados en el ensayo de potenciación fueron: Arginina, Fructosa, Glicerol, Glucosa, Manitol, Rafinosa, almidón y Trealosa) Sigma-Aldrich.

4.2.2. Enfoque y tipo de investigación

Se realizó un estudio descriptivo observacional de tipo transversal dirigido a la detección de:

- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en mataderos de la provincia de Mayabeque
- Enterobacterias productoras de BLEEs en unidades porcinas de Matanzas.

4.2.3 Origen de las cepas y aislamientos

Cepas de *S.suis* y *P.multocida*: Forman parte de la colección del laboratorio de Bacteriología animal, ubicado en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. Las

cepas se aislaron de muestras de órganos y tejidos de animales enfermos procedentes de granjas ubicadas en las provincias Pinar del Río, Mayabeque y Matanzas. Estas muestras se recibieron como parte de procedimientos de diagnóstico de rutina en dicho laboratorio, desde el año 2002, La colección comprende aislados representativos del período 2002-2016. (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de cepas de *S.suis* según el sitio de aislamiento y el año

Año	Pulmón	Feto abortado	Descarga vaginal	Absceso	Bazo	Riñón	Total
2002-2008	15						
2009-2012	23	1	1	3			
2013-2016	4		1	2	1	1	
Total	35	1	2	5	1	1	45

Las muestras de órganos se sembraron en los medios de cultivo agar sangre, agar chocolate, agar MacCokey (BioCen), se incubaron a 37°C, durante 48-72 horas en presencia de CO₂ (Genbox, oxoid) y en condiciones de aerobiosis. La identificación de las bacterias se realizó según las características culturales (morfología, tamaño, elevación, coloración de las colonias), las pruebas tintoriales, tinción de Gram, las pruebas bioquímicas oxidasa (Oxoid) y los sistemas API (Biomeriux), (api 20NE y api20Strep Biomeriux) según las instrucciones del fabricante.

Aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM): Las muestras se tomaron en el matadero perteneciente a la Empresa Cárnica situada en Nueva Paz, provincia Mayabeque. Un total de 285 exudados nasales se colectaron en tres días diferentes en cerdos de ceba terminal procedentes de las provincias Mayabeque (n=67), Matanzas (n = 90) y Cienfuegos (n = 128). Los aislados se obtuvieron en agar selectivo (ORSAB) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido) suplementado con 3,5 mg /L de cefoxitina, después de un cultivo en dos etapas, pre-enriquecido y selectivo en caldo, como ha sido descrito anteriormente (Wettstein Rosenkranz y col., 2014).

Aislados de Enterobacterias productoras de BLEE: Las muestras se colectaron durante los meses de julio-septiembre del 2016 y mayo del 2017 en tres granjas de producción porcina que se denominaron (A, B, C) y en dos mataderos (M-1 y M-2), localizados en el Municipio de Matanzas, de la Provincia de Matanzas. Se transportaron al Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Matanzas según las medidas de bioseguridad para el traslado de muestras y en refrigeración. Las muestras se tomaron con hisopos estériles y se distribuyeron según el sitio de aislamiento como muestra (Tabla 2).

Tabla 2: Distribución de muestras para aislamiento de Enterobacterias en instalaciones de producción porcina en Matanzas.

Instalación porcina	Hisopado de animales	Operarios	Agua	Comederos y tetinas	Ambiente superficies	Instrumentos de trabajo	Total	%
Granja A	8/10	2/8	1/3	9/20	2/16	-/-	22/52	42,30 a
Granja B	0/12	0/8	0/3	0/16	1/13	-/-	1/52	1,92 b
Granja C	1/10	0/4	1/2	0/4	0/2	-/-	2/22	9,09 c
Matadero 1	3/10	1/6	0/2	0/2	4/13	1/6	9/40	22,50 a
Matadero 2	3/10	0/6	1/2	0/2	2/9	1/5	7/34	20,58 a
Total	15/52	3/32	3/12	9/39	9/53	2/12	41/200	20,50

Los hisopados rectales se tomaron de animales aparentemente sanos correspondientes a las categorías preceba y ceba. Todas la muestras de hisopados se introdujeron en tubos eppendorf que contenían el medio Caldo Müller–Hilton (Biocen, 4030) suplementado con cefotaxima a 2 µg/mL (Lili y col., 2015).

Identificación: La discriminación entre las enterobacterias y no enterobacterias se realizó por la prueba de oxidación/fermentación, mediante la siembra en medio Hugh and Leifson (Oxoid), se incubaron a 37 °C en condiciones aerobias y no aerobias mediante la adición de parafina líquida durante 18 horas (Kan *et al.*, 2011). Además, se determinó la capacidad de los microorganismo de utilizar los hidratos de carbono: glucosa, lactosa, con producción o no de gases (CO₂ y H₂), junto con la producción o no de ácido sulfhídrico (H₂S), mediante la inoculación en tubos de cultivo que contenían el medio agar KIA (Biocen, 4012). Se determinó la capacidad de emplear el citrato como única fuente de carbono, mediante la siembra en agar citrato de Simmons (Biocen, 4008), la capacidad de hidrolizar la urea mediante la siembra en Base Agar urea (Biocen, 4058) y la Motilidad y producción de indol a través de la adición del reactivo Kovacs (bioMérieux, Francia), el medio agar Lisina y Hierro (LIA) (Biocen, 4010) basada en la descarboxilación de la lisina, formación de sulfuro de hidrogeno y fermentación de la dextrosa (Koneman 1997 y MacFaddin, 2000). La confirmación se realizó por el empleo de los sistemas comerciales API 20 E (bioMérieux, Francia, 2002), según las condiciones prescritas por el fabricante.

4.2.4 Conservación de cepas

Las cepas se conservaron mediante congelación a -20°C, utilizando glicerol como agente crioprotector, a una concentración final del 20% (v/v). Se tomaron 250 µl del cultivo en fase exponencial y se adicionaron a un criotubo con 250 µl de glicerol al 40% en medio de cultivo. Los glicerizados se homogeneizaron mediante agitación suave. Las cepas se conservaron en criotubos en medios específicos para cada microorganismo suplementados con glicerol al 20%. Los medios utilizados fueron Caldo Todd Hewitt (TH) para *S.suis* y caldo cerebro corazón (CCC) para *P.multocida*, SARM y Enterobacterias BLEE+.

4.2.5 Determinación de la susceptibilidad *in vitro* a los antimicrobianos

Se realizó por el método de Kirby-Bauer o difusión en Agar con Discos, según las recomendaciones del CLSI, 2016. Brevemente consistió en la preparación de suspensiones bacterianas en Solución salina fisiológica a partir de cultivos en placas y el ajuste con el patrón 0.5 de la escala Mac Farland, equivalente a 1×10^8 ufc/mL. Se realizó la inoculación en placas de agar Columbia para *S.suis* suplementado con sangre ovina al 5%, mientras para *P.multocida*, SARM y enterobacterias se utilizó el medio Agar Müller Hinton (Biocen, 4013). En todos los casos se aplicó un hisopo estéril embebido de la suspensión microbiana, por toda la superficie para asegurar una distribución constante del inóculo, se esperaron de 3-5 min y se colocaron manualmente los discos con pinzas estériles a una distancia de 2cm uno de otro y a 1,5 cm del borde de la placa. Se utilizó las cepas de *E. coli* ATCC 25922 como control del ensayo. Se procedió a la lectura del diámetro del halo incluyendo al disco. La clasificación de la sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia de las cepas se basó en los siguientes criterios según cada microorganismo:

***S.suis*:** Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, 2016), específicamente para la especie *Streptococcus pneumoniae*, pero se tuvieron en cuenta otros trabajos específicos para este microorganismo Escudero y col., 2007; Chunping Zhang y col., 2015)

***P.multocida*:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Enterobacterias productoras de BLEE: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorios (CLSI, 2016)

4.2.6 Confirmación de las especies por identificación molecular:

***S.suis*:** se siguieron las condiciones descritas por Marois y col, 2004 para la detección de un fragmento de 297pb por PCR, correspondiente a la región que codifica para el ARNr16s (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados en las reacciones de PCR

Genes	Talladel amplicón (pb)	Secuencia de oligonucleotidos (5'-3')	Condiciones PCR (°C/segundo)			Referencias
			Des.	Hib.	Ext.	
ARNr16S <i>S.suis</i>	297pb	cagtatttaccgcatgtagatat	94/30	60/30	72/30	Marois y col, 2004
		gtaagataccgtcaagtgagaa				
Cps 2 (serotipo capsular 2 <i>S.suis</i>)	642pb	caaacgcaaggaattacggtatc	95/60	58/60	72/60	Smith y col 1999
		gagtatctaaagaatgcctattg				
Cps 9 (serotipo capsular 9 <i>S.suis</i>)	303pb	gggatgattgctcgacagat	95/60	55/60	72/60	Silva y col., 2006
		ccgaagtatctgggctactga				

<i>P.multocida</i> KMT1SP6 KMT1T7	496pb	gctgtaaacgaactcgccac	95/60	55/60	72/60	Townsend y col.1998
		atccgctatttaccagtg				
<i>P.multocida</i> CPSA	1044pb	tgccaaaatcgagtcag	95/60	55/60	72/60	
		ttgccatcattgtcagtg				
<i>P.multocida</i> Cps D	657pb	ttacaaaagaaagactaggagccc	95/60	55/60	72/60	
		catctaccactcaaccatcatcag				
		ccgttccgctattacaaac				

***P.multocida*:** se siguieron las condiciones descritas por Townsend y col.1998 para la amplificación por PCR de un fragmento (460pb) entre los promotores SP6 y T7 (Tabla 3).

SARM: La identificación de SARM se realizó por el método de MALDI-TOF / MS, del inglés matrix-assisted laser desorption/ionisation time of-flight mass spectrometry (microflex LT, BrukerDaltonics).

4.2.6. 1 Ensayos moleculares (PCR)

Extracción de ADN a partir de colonia

Todas las extracciones de ADN para (*S.suis*, *P.multocida* y *Enterobacterias*) se realizaron siguiendo el siguiente procedimiento: a partir de una colonia se suspendió una asada en 100 µl de agua destilada estéril, en tubos de micro centrífuga de 1.5 ml, se sometió a una temperatura de 100°C durante 10 minutos. Pasado este tiempo se colocaron en hielo por 20 minutos. Se centrifugó a 5000 g durante 15 minutos, y se tomaron 5 µl del sobrenadante (ADN) para agregarlos a la mezcla de PCR.

SARM. Se partió de un cultivo puro joven de *S. aureus* en agar sangre. Las colonias se resuspendieron en 100µL de una solución de buffer TE y lisostafina 100µg/ml. Esta suspensión se incubó a 37°C por 15min. Posteriormente se adicionó 460µL de buffer lisis con la siguiente composición (volumen final de 200mL 20mL de Tris-HCl, 1M, pH 8.0, 100µL de Tween 20, 48mg de proteinasa K (Roche) y 180mL de H₂O). Esta última suspensión se incubó a 60°C por 45min para luego inactivar las enzimas a 95°C por 15min. El lisado se conservó a -20°C hasta su posterior uso. El material obtenido en este paso fue utilizado en todas las pruebas moleculares subsiguientes.

Reacción de PCR

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µL y los reactivos se añadieron en las siguientes proporciones: 12.5µL de Master Mix (Promega), 7,5µL Agua bidestilada estéril, Cebadores 1.5µL de cada uno y 2µL de ADN.

Los cebadores para la amplificación de genes de *S. suis*, *P.multocida* y Enterobacterias BLEE+ se sintetizaron en el Centro de Ingeniería genética y Biotecnología (CIGB) y la secuencia de los mismos, la región diana, y la referencia aparecen en (Tabla 3). Los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador (Mastercycler). Mientras los cebadores para la amplificación de marcadores en las cepas de SARM se sintetizaron en el Institute de bacteriología Veterinaria Universidad de Berna, Switzerland.

Visualización de los productos de PCR: Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% en TBE 0.5x con Bromuro de Etidium (1mg/mL) en un Transiluminador de luz ultravioleta (Pharmacia Lkb), se utilizó un marcador de peso molecular de 1 Kb (Promega). Cada amplificación realizada, además, incluyó un control negativo con agua y se realizaron dos réplicas de cada amplificación.

4.2.8 Tipificación de las especies bacterianas

4.2.8.1 Serotipificación de *S.suis*:

S.suis: Los aislados de *S. suis* se cultivaron en 5 mL de caldo TH (Oxoid). Los cultivos se centrifugaron por 15 min a 3000 rpm, se resuspendieron en solución salina 0.9%. El ensayo de seroaglutinación se realizó por coagglutinación con la cepa de referencia de *S.aureus* Cowan y un panel de 35 sueros hiperinmunes obtenidos como describen previamente Higgins and Gottschalk, (1990) y Gottschalk et al., (1993). Los antisueros fueron donados amablemente por el Dr. Marcelo Gollschalk como parte de un proyecto LACREG de colaboración entre el CENSA y la Universidad de Montreal, Canadá.

4.2.8.2 Geno-serotipificación de *S.suis* y *P.multocida*:

S.suis: las cepas de los serotipos 2 y 9 se confirmaron por PCR como se describe se en el acápite 4.2.6.1 y se utilizaron los cebadores y condiciones de amplificación descritas por Smith y col (1999) para amplificar un fragmento de 647pb correspondiente al locus de la glicosiltransferasa del tipo capsular 2 y según Silva y col., 2006 para la amplificación de un fragmento de la glicosyltransferasa del tipo capsular 9. (Tabla 3).

P.multocida: los tipos capsulares A y D se amplificaron según la metodología propuesta por Townsend y col.2001. (Tabla 3).

4.2.8.3 Tipificación de SARM

Electroforesis en campo pulsátil: El análisis del genotipo de las cepas de SARM mediante electroforesis en campo pulsátil (ECP) utilizó la endonucleasa de baja frecuencia de corte *Sma*I, la cual permite digerir el DNA en fragmentos grandes. La digestión se llevó a cabo con 50U de la enzima de restricción *Sma*I en un volumen de 300µL (260µL H₂O + 35µL buffer restricción + 5µL de la enzima) a 25°C durante 18h. La electroforesis se utilizó en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5x. en un

sistema CHEF-DRIII (BioRad), Utilizando como tampón TBE al 5x + 9mg/L de Tiourea. La interpretación de los diferentes patrones de bandas obtenidos se tuvo en cuenta el criterio descrito por Tenover, (1995), con la variación que en nuestro caso se colocaron números romanos diferentes para genotipos propios y subtipos para una mejor diferenciación de los clones.

Tipificación de secuencias multilocus. Este método consistió en la secuenciación de siete genes codificantes de enzimas metabólicas bacterianas ("housekeeping genes"). En este caso se utilizaron los fragmentos internos de los siguientes genes *arcC* (carbonato kinasa), *aroE* (Shikimato deshidrogenasa), *glpF* (glicerol kinasa), *gmK* (guanilatokinasa), *pta* (fosfato acetiltransferasa), *tpi* (trifosfatoisomerasa), *yqil* (acetil coenzima A acetiltransferasa). La realización de este método se llevó a cabo en tres fases: 1) Extracción del ADN cromosómico bacteriano, 2) Amplificación por PCR de los genes metabólicos, 3) Reacción de secuenciación. La reacción de amplificación de los fragmentos internos de los siete genes se realizó en un equipo termociclador Biometra T Professional (BiometraGmbH, Germany). En cada reacción se utilizaron los siguientes componentes: buffer para PCR a una concentración de 1x, MgCL2 1,5mM, dNTPs a 250µM, los iniciadores de los genes se utilizaron a una concentración de 85pm en reacciones independientes y se describen en la (Tabla 4), (Enright, 2000). A la reacción se le añadió 1 unidad de Taq polimerasa Solis, 1µL del ADN molde y finalmente se le añadió H2O hasta completar un volumen final de 30µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 min de desnaturalización a 94°C, 30 ciclos de amplificación (Desnaturalización 30 segundos a 94°C, 30 segundos para hibridación a 52°C y 1 min a 72°C para la extensión), la última fase de extensión 7 min a 72°C y posterior mantenimiento en frío a 4°C. Los productos de PCR fueron purificados mediante el sistema NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit (Biocientífica SA), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la electroforesis en gel de agarosa para verificar la intensidad de las bandas. La placa se secuenció en un equipo automático modelo ABI Prism 3100 geneticanalyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Análisis de las secuencias. Una vez obtenidas las secuencias, los cambios nucleotídicos ocurridos en las cepas estudiadas se analizaron usando el programa Sequencher 4.10.1 software (Gene CodesCorporation, Ann Arbor, MI). Estas secuencias fueron comparadas con sus homólogas almacenadas en la página web www.mlst.net. Así se obtuvo un alelo para cada gen y el perfil alélico de las cepas dio lugar al tipo secuencial correspondiente (Sequencetype, ST).

Tipificación del gen de la proteína A de SARM .Se realizó por amplificación por PCR de la región X del gen de la proteína A de *S. aureus*, purificación del producto amplificado y secuenciación se siguió la misma metodología descrita en el acápite anterior. Los cebadores utilizados fueron los descritos por Harmsen y col. . 2003 y las secuencias se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Secuencia de cebadores utilizados en la amplificación de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM)

Genes	Secuencia de oligonucleotidos (5'-3')	Condiciones PCR (°C/segundo)			Referencias
		Des.	Hib.	Ext.	
<i>spa</i> (<i>S.aureus</i>)	AGACGATCCTTCGGTGAGC	94/30s	52/ 30s	72/1min	Harmsen y col l., 2003
	GCTTTTGCAATGTCATTACTG				
<i>dru</i>	GTTAGCATATTACCTCTCCTTGC	94/1min	52/ 1min	72/1min	Goering y col.,2008
	GCCGATTGTGCTTGATGAG				
<i>primerA</i>	GTTTCCCAGTCACGATC NNN		30/ 2h	65/10min	Diseñados por IVB
<i>primerB</i>	GTTTCCCAGTCACGATC	95/30seg	52/ 30s	72/1min	Diseñados por IVB
<i>arc up</i>	TTG ATT CACCAGCGCGTATTGTC	94/30s	52/ 30s	72/1min	Enright y col., 2000
<i>arc dn</i>	AGGTATCTGCTTCAATCAGCG	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>aro up</i>	ATCGGAAATCCTATTTACATTC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>arodn</i>	GGTGTTGTATTAATAACGATATC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>glp up</i>	CTAGGAACTGCAATCTTAATCC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>glp dn</i>	TGGTAAATCGCATGTCCAATTC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>gmK up</i>	ATCGTTTTATCGGGACCATC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>gmK dn</i>	TCATTAAC TACAACGTAATCGTA	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>pta up</i>	GTAAAAATCGTATTACCTGAAGG	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>ptadn</i>	GACCCTTTTGTTGAAAAGCTTAA	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>tpi up</i>	TCGTTCACTCTGAACGTCGTGAA	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>tpidn</i>	TTTGACCTTCTAACAATTGTAC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>yqi up</i>	CAGCATACAGGACACCTATTGGC	94/30s	52/ 30s	72/1min	
<i>yqidn</i>	CGTTGAGGAATCGATACTGGAAC	94/30s	52/ 30s	72/1min	

Microarreglos de ADN. Para el estudio del contenido genético de las cepas de *S. aureus* aisladas de cerdos, se realizó una técnica de microarrays. La caracterización del contenido genético de las cepas se llevó a cabo con el método comercial Staphylococcus genotyping; Alere Technology, Waltham, MA). Este kit permite la detección de los genes que codifican marcadores de especie, determinantes de resistencia, exotoxinas y super antígenos, proteínas de adhesión, tipos capsulares. Esta técnica también permite determinar el tipo de SCCmec.

Caracterización del cassette cromosómico SCCmec. En todos los aislamientos de SARM se determinó el tipo de SCCmec mediante una reacción de PCR. Se amplificaron algunos de los elementos más característicos de cada tipo de SCCmec, según el método descrito por Kondo y col., 2010.

4.2.9 Determinación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos:

Se seleccionaron 16 aislados de *P. multocida* y de *S. suis* correspondientes a 2 períodos de tiempo diferentes 2002-2004 y 2008-2016 y se realizó la evaluación de la susceptibilidad a diferentes antibióticos siguiendo la metodología reportada por Comité Nacional para la Estandarización de los Laboratorios clínicos (CCLS) 2002(9). Para cada entidad se utilizaron los siguientes discos de antibióticos:

S.suis: Penicilina (10ug); Ampicillina/Sulbactam (20ug); Norfloxacin (10ug); Gentamicina (10ug); Erythromycin (15ug); Oxitetracycline (30ug); spectinomycin (10ug); Chloramphenicol (30ug); Cepholet (30ug) y trimethoprim/sulphamethoxazole (25ug).

P.multocida: amoxicillin (30µg); neomycin (30µg); erythromycin (15µg); tetracycline (30µg); trimethoprim/sulphamethoxazole (25µg), spectinomycin (25µg); amikacin (30µg), chloramphenicol (30µg), ácido nalidixico (30µg) y Cepholet (30µg) .

4.2.10 Ensayo de mínima concentración inhibitoria (MCI):

S. suis y P. multocida: El ensayo se realizó con la finalidad de determinar la MCI de los antibióticos betalactámicos y quinolonas a utilizar en el ensayo de persistencia (curva de letalidad). Cultivos exponenciales de cada cepa se diluyeron hasta aproximadamente $5 \cdot 10^5$ CFU/ml-1 en Muller Hinton Broth (*P. multocida*) y Todd Hewitt Broth (*S. suis*) y se incubó con una concentración de antibióticos en un rango de diluciones dobles ($500-1 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 16 a 20 h. La densidad óptica se midió a 595 nm utilizando un lector de placas de microtitulación (SUMA, PR-621, Cuba) y se definió la MIC como la concentración más baja de antibiótico que no excedió la DO de 0,01 (Andrews JM. 2001)

SARM: Se determinaron la MIC a 19 antibióticos, mediante microdilución en caldo Mueller-Hinton, utilizando la placa de susceptibilidad (Sensititre EUST Thermo Fisher Scientific Oxoid Ltd., Basingstoke, Reino Unido), siguiendo las directrices y criterios de interpretación del Comité Europeo de Ensayos de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) (<http://www.eucast.org>).

4.2.11 Determinación de la formación de biopelículas por *S. suis* y *P. multocida*:

Para la evaluación de la capacidad de formar biopelículas se seleccionaron las siguientes cepas y se realizó el ensayo de adherencia.

***S. suis*.** serotipo1 (Ss181, ss1S), serotipo 1/2 (Ss1/2M), serotipo 2 (Ss213, Ss211), serotipo 3 (Ss36, Ss364), serotipo 8 (Ss8O), serotipo 9 (SsS9A), serotipo 16 (Ss16X) y 4 aislados no tipificables - (SsNTF, SsNTV, SsS9Q, SsNTY). Se utilizaron 8 cepas del serotipo A de *P. multocida*.

***P. multocida*:** Cepas PM21, PM29, PM 5, PM14, PM8K, PM19

Ensayo de adherencia para *S. suis* y *P. multocida*

Para *S. suis* se realizó según las condiciones descritas por (Grenier *et al.*, 2009) las cepas de *S. suis* se cultivaron en Todd Hevit Broth (THB) hasta (1×10^8 CFU · ml⁻¹). Alícuotas de 0.05 ml se adicionaron a placas conteniendo un medio (MM). Para *P. multocida* las cepas se cultivaron en el caldo de Soja de Triptone (TSB) suplementado con 5% de suero bovino fetal (TSBFB) hasta (1×10^8 CFU · ml⁻¹). A continuación, se añadieron alícuotas de 0,05 ml en pocillos que contenían el medio (TSBFB) y se incubaron en presencia de 10% de CO₂ y en aerobiosis. Las células adherentes de ambos patógenos se cuantificaron por Densidad óptica (OD) a $\lambda = 492$ nm un lector de placas (SUMA, PR-621, Cuba).

Evaluación de la actividad antibacteriana sobre biopelículas y células plantónicas de *S. suis*.

La actividad antibacteriana de Penicilina y N-acetyl cistein NAC se determinó sobre células plantónicas y en biopelículas mediante el método de microdilución acorde al Comité de estándares de laboratorios documento M100-S18 (CLSI, 2008). Se realizaron diluciones seriadas de Penicilina ($500-0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) y NAC ($16-0.016 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) en medio THB. Alícuotas con una concentración celular de 5×10^5 CFU · ml⁻¹ se inocularon en pocillos con cada agente antimicrobiano. El efecto sobre las biopelículas se evaluó como se describió anteriormente pero las diluciones de los antibióticos se realizaron en MM. La actividad combinada (Penicilina and NAC se realizó según (Mackay *et al.*, 2000) y se utilizaron dos concentraciones de NAC (4 y 8 mg).

4.2.12 Determinación de la producción de células persistentes por curvas de letalidad en cepas de *S. suis* y *P. multocida*:

Cepas bacterianas: se emplearon 4 cepas de *S. suis* (SsS2, SsS3, SsS9 y SsNT) y 4 cepas de *P. multocida* (PM5, PM21, Pm29 y PM8K). Las cepas se seleccionaron por mostrar previamente susceptibilidad a betalactámicos Penicilina *S. suis* y ampicilina *P. multocida*) y quinolona (Enrofloxacin) para ambas especies en las pruebas de Agar difusión con discos y MCI. Se obtuvieron cultivos en fase estacionaria de *S. suis* en medio TH, y de *P. multocida* en CCC se diluyeron en cada medio, se determinó la concentración de células viables mediante conteo de las UFC en placas de Agar Columbia suplementadas con sangre ovina al 5%. Los cultivos se dividieron en alícuotas de 500µl en eppendorf y se adicionó cada antibiótico (Penicilina y Enrofloxacin) para *S. suis* y (Ampicilina y Enrofloxacin) para *P. multocida* por separado a una concentración equivalente a 100xMCI se incubaron durante diferentes períodos de tiempo a 37°C, se incluyó un control positivo que no contenía antibiótico. Al finalizar los tiempos de incubación, los cultivos se centrifugaron a 5000g durante 10 minutos y

se realizó un lavado con solución salina en iguales condiciones, se determinó el número de células persistentes por medio de recuento en placa. Las curvas de crecimiento–letalidad se realizaron a largo plazo siguiendo las condiciones descritas anteriormente, los recuentos en placa se realizaron a 24 y 48 horas posteriores a la adición de cada antibiótico.

4.2.13 Ensayo de potenciación con aminoglucósido y metabolitos carbonados para la erradicación de células persistentes de *S. suis* y *P. multocida*: Se siguió la metodología propuesta por Orman y col., (2016), con pequeñas modificaciones. Primeramente se procedió a la obtención de células persistentes posterior al tratamiento durante 24 horas con penicilina a una concentración final de 100 µg/mL.

Las células persistentes se lavaron en Medio M9 y se ajustaron una concentración equivalente a 1×10^5 células persistentes en medio M9. Se realizaron alícuotas a partir de la suspensión anterior en tubos eppendorf y se añadieron la solución de gentamicina y metabolito de carbono, se consideró un control donde no se añadió ninguna fuente de carbono y en su lugar 10 µL de agua. Las fuentes de carbono empleadas fueron: arginina, glucosa, ribosa, almidón, glicerol. Después de la incubación, los cultivos se centrifugaron a 5000g durante 10 minutos y se lavaron en solución salina, para realizar el recuento del número de células persistentes, mediante la siembra en medios sólidos.

4.2.14 Determinación de la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) por Enterobacterias

Detección fenotípica de BLEE por enterobacterias

Prueba tamiz: Se realizó para todos los aislados clasificados como Enterobacterias. El método consistió en una prueba de difusión en agar con discos, para la cual se utilizaron los siguientes discos de antibióticos, considerados “indicadores” procedentes de la casa comercial Liofilchem: tres discos de cefalosporinas de tercera generación ceftazidima (CAZ, 30µg), ceftriazona (CRO, 30 µg), cefotaxima (CXT, 30µg), un disco de cefalosporina de cuarta generación cefepime (FEP, 30µg), un disco de monobactamen aztreonam (ATM, 30 µg) y un disco de la cefamicina cefoxitin (FOX, 30µg), una vez colocados los discos las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por 16 a 20 horas. Se procedió a la lectura (diámetro del halo incluyendo al disco). La presencia de potenciales BLEE se sospechó cuando se obtuvieron halos de inhibición para los discos CAZ, CRO, CXT, FEP y ATM iguales o inferiores a 17, 19, 22, 18 y 17mm respetivamente y un halo igual o superior a 14 mm para el disco FOX (22).

Prueba de sinergia de doble disco: La producción de BLEE se determinó por la técnica de sinergismo de doble disco propuesta por Jarlier *et al* 1988 (22) y siguiendo los lineamientos establecidos por CLSI, 2016 (22). Consistió en situar un disco que contiene amoxicilina y el inhibidor de betalactamasa, ácido clavulánico (AUM) en la relación 20/10 µg, próximo a discos de betalactámicos indicadores CXT (30 µg), CAZ (30 µg), FEP (30 µg) y AZM (30 µg) a una distancia lineal de 20 mm del disco central. Si la cepa es productora de BLEE, se observa una ampliación del halo de inhibición de cefotaxima, ceftazidima, cefepime o aztreonam en la zona próxima

al disco con amoxicilina-ácido clavulánico (sinergia) o presencia de una "zona fantasma" (inhibición del crecimiento) entre las cefalosporinas o aztreonam y el inhibidor.

Prueba de epsilometría (E- test)]: Se realizó para las cepas que resultaron positivas en la prueba tamiz descrita anteriormente, se siguió el procedimiento estándar para la realización de un antibiograma por difusión con discos y se aplicaron tiras comerciales de Etest®, según las directrices del fabricante (Liofilchem), específicamente se emplearon tiras de plástico no poroso de 5cm de largo y 5 mm de ancho, que contienen ceftazidima (CAZ) en una mitad con una concentración decreciente de 32 µg/mL hasta 0.5 µg/mL y la otra mitad contiene desde 4 µg/mL hasta 0.064 µg/mL con 4 µg/mL de ácido clavulánico en concentración fija. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó observando el punto en que la elipse de inhibición interceptó la escala impresa en la tira. Se leyó el extremo del antibiótico sin el ácido clavulánico y el extremo que contenía ácido clavulánico, se dividieron las dos concentraciones en ese orden y un resultado positivo para BLEE fue cuando la proporción es ≥ 8 y negativo < 8 .

Ensayos moleculares: Los aislados bacterianos positivos en la prueba tamiz; se analizaron por la técnica molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés, *Polymerase chain reaction*), específicamente para los genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* y *bla_{CTX-M}* relacionados con la producción de BLEE (23, 24,25). A partir de una colonia se suspendió una asada en 100 µl de agua destilada estéril, en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml, se sometió a una temperatura de 100 °C durante 10 minutos. Pasado este tiempo se colocaron en hielo por 20 minutos. Se centrifugó a 5000g durante 15 minutos y se tomaron 5 µl del sobrenadante (ADN) para agregarlos a la mezcla de PCR. La mezcla de PCR se realizó en un volumen final de 25 µL, las cantidades utilizadas fueron: 12, 5 µL de Master Mix (Promega), 1.5µL de cada cebador (20pmoles) y 7,5µL Agua MilliQ estéril. Las condiciones de la reacción y las secuencias de los cebadores aparecen en la Tabla 5 .Los cebadores se sintetizaron en el Centro de Ingeniería genética y Biotecnología (CIGB). Los ensayos de PCR se realizaron en un termociclador (Mastercycler).

Tabla 5: Secuencia de cebadores utilizados en la amplificación de genes de betalactamasas de espectro extendido (BLEE)

Gen	Talla (pb)	Secuencia de oligonucleotidos (5'-3')	Condiciones PCR (°C/segundo)			Referencias
			De s.	Hib .	Ext.	
<i>bla_{TEM}</i>	1100	ATTCTTGAAGACGAAAGGGC	94/	60/	72/6	(Briñas <i>et al.</i> , 2005) (24)
		ACGCTCAGTGGAACGAAAAC	60	40	0	
<i>bla_{CTX-M-1}</i> group	1049	GTTACAATGTGTGAGAAGCAG	94/	62/	72/4	(Costa <i>et al.</i> , 2008) (25)
		CCGTTTCCGCTATTACAAAC	45	45	5	
<i>bla_{SHV}</i>	500	TCAGCGAAAAACACCTTG)	96 /	55/	72/	(Costa <i>et al.</i> , 2008) (25)
		TCCCGCAGATAAATCACCA				

Análisis estadístico

Los resultados de la actividad antimicrobiana de penicilina y N-acetylcisteína sobre células plantónicas y sésiles de *S.suis* se expresaron como porcentaje de inhibición del crecimiento tanto de células plantónicas como sésiles con respecto a un grupo control no tratado. Los experimentos se realizaron con tres réplicas biológicas. Se realizó un análisis de varianza seguida de una comparación múltiple por el método de Bonferroni con un nivel de significación $p < 0.05$ y mediante el programa SPSS versión 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Los valores de UFC obtenidos en los recuentos celulares durante los experimentos de persistencia para *S.suis* y *P.multocida* se transformaron a log 10 priori al análisis estadístico con el programa Microsoft Excel.

Los resultados se expusieron en una base de datos y se organizaron acorde al lugar de procedencia, sitio de aislamiento, identificación del microorganismo (género y especie), perfil de susceptibilidad antimicrobiana, según los antibióticos empleados, detección fenotípica de BLEE por los métodos de cribado antes mencionados, así como su confirmación por los métodos moleculares realizados. El análisis de los resultados se realizó mediante estadística descriptiva se determinó la frecuencia y el porcentaje para el análisis de los resultados, ordenando los datos obtenidos en tablas y gráficas con el fin de facilitar la interpretación de la información.

4.3- Resultados y discusión

4.3.1 Caracterización de la susceptibilidad a los antibióticos en cepas patógenas de *S.suis* y *P.multocida* para la crianza porcina.

Una de las cuestiones, que más incide en el uso incorrecto de los antibióticos, es la no realización de un diagnóstico adecuado, que permita confirmar la especie bacteriana causante de un proceso clínico y evaluar su susceptibilidad, para garantizar una prescripción correcta. En el caso de las bacterias, es preciso abordar la estructura intra-especie, pues existen especies con una alta variabilidad, donde es posible encontrar cepas virulentas y otras no, que incluso pueden formar parte de la microbiota del hospedero. *S.suis* y *P.multocida* constituyen dos ejemplos de bacterias en las cuales existe una alta variabilidad intra-especie, previo al estudio de la susceptibilidad de estas cepas se aplicó la metodología establecida internacionalmente para la confirmación de cada especie y su tipificación.

Es importante destacar que las cepas de *S.suis* y *P.multocida* que conforman la colección se seleccionaron cuando mostraron un crecimiento puro y preponderante en la siembra primaria, lo cual indica su asociación a los procesos clínicos que presentaron los animales de los cuales fueron aisladas. En cuanto a las características culturales, las cepas de *S.suis* formaron colonias puntuales, mucoides, con hemólisis alfa en medio agar-sangre Columbia (Biomérieux) y fueron negativas para la prueba catalasa.

En la tinción de Gram se observaron cocos gran positivos, estas características son presuntivas del género *Streptococcus* como describen Staats y col., (1997). La identificación por la galería de pruebas bioquímicas API 20 Strep, confirmó la pertenencia a *S.suis*. Mientras los aislados correspondientes al género *Pasteurella* mostraron colonias medianas mucoides, grises y cocobacilos gran negativos en la

tinción de Gram y no crecieron en Agar Mac Conkey, la identificación por la galería de pruebas bioquímicas API NE, confirmó la pertenencia a *P.multocida*.

En las infecciones respiratorias fundamentalmente bronconeumonía y neumonía, *S.suis*, suele ser considerado como una entidad oportunista o secundaria a los procesos respiratorios primarios originados por virus o micoplasmas y en ocasiones no se tiene en cuenta su presencia para el control de estos procesos. Sin embargo, en Europa, América del Norte y del Sur, existen reportes cada vez más frecuentes de su incidencia en los procesos respiratorios (Berthelot-Herault y col, 2005, Messier y col, 2008, Gottschalk y col., 2013). La participación de *P.multocida* en neumonías porcinas ha sido notablemente reconocida (Pijoan y col., 1995 y De Jong, 2006).

La presencia de *S.suis* en los abscesos de animales con artritis y en órganos de un feto abortado, reveló la participación de esta bacteria asociada a procesos invasivos en nuestras producciones porcinas. En la actualidad *S.suis* es una de las especies más importantes en la industria porcina, su capacidad de infectar diferentes órganos, ocasiona diversas patologías como artritis, endocarditis, meningitis y otitis media, es muy típico en estos procesos un curso agudo, fibrinosupurativo e inflamatorio (Madsen y col., 2002b, Beineke y col., 2008).

La identificación bioquímica de todos los aislados correspondientes a *S.suis* y *P.multocida* fue confirmada mediante PCR especie-específica, se obtuvo una banda de 294 pb para *S.suis* (Figura 1) y de 497pb para *P.multocida*. Estos resultados constituyen la primera confirmación molecular utilizando marcadores conservados descritos para la taxonomía y definición de especies en cepas de *S.suis* y *P.multocida* de origen cubano asociados a procesos clínicos en cerdos. Este resultado permitió implementar ensayos de PCR simple para la detección de ambas entidades directamente de colonias, de cultivos primarios con solo 24 horas de incubación, que mostraron un crecimiento aparente para estas bacterias.

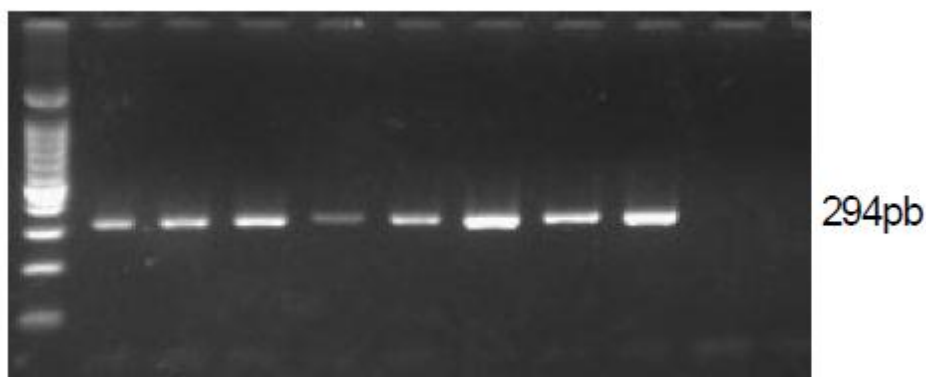


Figura 1: Muestras representativa del total de cepas de *S.suis* que amplificaron un producto de PCR del gen del ARNr. Línea1 Marcador de peso molecular de 100 pb, línea 2-8 producto de PCR y línea 9 control negativo.

La tipificación capsular es uno de los principales aspectos a considerar en la clasificación intra-especie en las bacterias que producen cápsulas. En ambos géneros se reporta la producción de material capsular sobre la superficie de la bacteria y estos polisacáridos capsulares contribuyen a la patogenicidad (Smith.,

1999; Towenson., 2001). La tipificación capsular mediante métodos fenotípicos se realiza fundamentalmente a través de ensayos de seroaglutinación utilizando antisueros de referencia, por lo general es una actividad realizada en pocos laboratorios, fundamentalmente catalogados de referencia debido a la dificultad en muchas ocasiones que representa obtener todas las cepas y los respectivos antisueros que existen para cada serotipo descrito. Para *S. suis* se describen 33 serotipos (Golschalk *et al.*, 1998), mientras para *P. multocida* cinco, atendiendo, en ambas entidades a la composición del material capsular (Townsend y col., 2001), en la tabla 6 se observa la distribución de serotipos de *S. suis* en la colección de cepas evaluadas, según el sitio de aislamiento. El serotipo 2 resultó el más frecuente.

Tabla 6: Distribución de serotipos (número de cepas) de *Streptococcus suis* aisladas de cerdos enfermos en Cuba entre 2002-2016

Órgano	Serotipos de <i>S.suis</i>															
	1	1/2	2	3	4	8	9	13	15	16	19	23	24	31	34	NT
Pulmón	1	1	15	3	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	9
Absceso			2													
Feto			2													
Bazo			1													
Riñón			1													

Las diferencias geográficas y temporales relacionadas a la epidemiología y prevalencia de los serotipos de *S. suis* han sido bien documentadas. En Asia, el serotipo 2 prevalece como responsable de más del 70% de las infecciones sistémicas (Wei y col., 2009). En algunos países Europeos con una industria porcina desarrollada como Holanda y Alemania el serotipo 9 ha emergido como el más común (Wisselink y col, 2006). En el Reino Unido los serotipos 1 y 14 desempeñan un importante papel en procesos invasivos en lechones, mientras el serotipo 7 se asocia a bronconeumonía en Scandinavia y Alemania. En Canadá y los Estados Unidos, los serotipos 2, 1/2 y 3 son los de mayor prevalencia (Fittipaldi y col, 2011). La mayor cantidad de aislados clínicos de *S. suis* en Canadá proceden de pulmones de lechones (Messier y col., 2008), los resultados de este trabajo concuerdan con la epidemiología que presentan Canadá y EU en cuanto a los serotipos encontrados y su asociación en mayor medida a procesos respiratorios.

Los ensayos de PCR han devenido como una opción rápida para la identificación de los tipos capsulares, pues permiten detectar la potencialidad para expresar un serotipo determinado. Los resultados de la geno-serotipificación de *P. multocida* evidenciaron 16 cepas del tipo capsular A y 2 del tipo capsular D. Para esta bacteria se describe la asociación del tipo capsular-hospedero, de los 5 tipos capsulares descritos solo A y D se han encontrado en el cerdo. El serotipo A de mayor impacto en la mayoría de los países como causante de neumonías, mientras el D además de la neumonía también es responsable de la rinitis atrófica y muestra una prevalencia más baja en la mayoría de los países, lo cual coincide con los resultados de este

trabajo, con excepción de Asia y Australia donde este serotipo presenta un mayor impacto, aunque no precisamente como causante de rinitis atrófica (Tang y col., 2009). La implementación de los ensayos de PCR-para la geno-serotipificación de *S.suis* fue posible a partir de las cepas previamente confirmadas según la reacción antigénica por aglutinación, en la actualidad el laboratorio de Bacteriología animal del CENSA dispone de procedimiento para definir el serotipo de *S.suis* a través de PCR.

Una vez confirmada la identidad de las cepas de *S. suis* y *P. multocida*, la prueba de susceptibilidad microbiana reveló que el 80%, de las cepas correspondientes al período que comprende los años 2008-2016 en ambas especies, resultaron resistentes a la tetraciclina, uno de los fármacos de mayor uso en veterinaria para el control de procesos respiratorios y el 100% fueron resistentes a espectinomicina.

El 68,75% de las cepas de *S. suis* mostraron resistencia múltiple a los antimicrobianos evaluados. Resultados similares fueron obtenidos por (Aarestrup y col., 2008), quienes también observaron aumento de la resistencia en el tiempo, en casos de aislados de cerdos y humanos respectivamente, para macrólidos y tetraciclinas. La emergencia de cepas resistentes indica que los regímenes terapéuticos y la susceptibilidad a estas drogas, deben ser estimados con anterioridad al tratamiento.

Entre un 65 y un 90% de las cepas de *S. suis* resultaron sensibles a la cefalotina, ampicilina/sulbactam y penicilina. El mecanismo común de resistencia en géneros bacterianos afines, específicamente entre los enterococos, se debe a la producción de beta-lactamasas. Aunque los mecanismos de resistencia en cepas de *S. suis* no están bien dilucidados y aún no existen evidencias de producción de estas enzimas, algunos estudios afirman que las modificaciones en las proteínas de unión a la penicilina, como la alteración del peso molecular o disminución de la afinidad por este antibiótico, están involucrados en la resistencia (Wisselink y col., 2006).

El 94% de los aislados de *P.multocida* mostraron multiresistencia a 3 antimicrobianos. La mayoría de los genes de resistencia descritos hasta la fecha para *P.multocida* se encuentran en plásmidos pequeños o en transposones conjugativos (Wilkie y col., 2001; Wu y col., 2003), que podrían ser de fácil diseminación.

El incremento de patrones de resistencia en ambas entidades asociadas a procesos clínicos en el cerdo es un aspecto al cual debe dedicarse gran atención. Un uso prudente de los antimicrobianos con el respaldo de los ensayos de laboratorio se precisa cada vez más. La resistencia, aunque aún baja, en cepas de *S. suis* a las fluoroquinolonas y otros fármacos, así como la variedad de patrones de resistencia identificados, corroboran la emergencia de esta problemática, lo cual es de gran impacto para la salud animal y humana considerando el potencial zoonótico de *S. suis*. Según los resultados el compuesto sulfametoxazol/trimetoprimas fue útil para el control de las infecciones por ambas especies, mientras los betaláctamicos fueron efectivos contra *S. suis* y las quinolonas para *P. multocida*.

Una vez dilucidado el perfil de susceptibilidad de las cepas de *S. suis* y *P. multocida*, se realizó el estudio de otras formas de resistencia definidas como "resistencia transitoria" o tolerancia fenotípica, que consisten en la producción de biopelículas o de células persistentes. Ninguna de las cepas de *P.multocida* mostró adhesividad o

formación de biopelícula en la prueba *in vitro* y en las condiciones empleadas, incluso posterior a la incubación durante 72 horas en presencia de 5% de dióxido de carbono, lo cual corrobora que *P. multocida* no es considerada un fuerte formador de biopelículas *in vitro* (Martin Sager., 2015). Aunque existen algunos informes contradictorios para cepas aisladas de diferentes hospederos, que muestran un incremento de la adherencia por el empleo de otras superficies como las perlas de bentonita, parece que la naturaleza química de los polisacáridos capsulares que forman las cepas del serotipo A interfiere en el contacto de las células con las superficies.

Sólo una cepa de *S. suis* fue clasificada como fuerte adherente (SsNTF), otra cepa como moderadamente adherente (SsNTQ), mientras que las cepas SsNTV y SsNTY fueron débilmente adherentes, el resto de las cepas fueron no adherentes. Un rasgo común entre las cepas adherentes es que fueron no tipificables, es decir no corresponden a ninguno de los serotipos previamente identificados. Los resultados concuerdan con otros autores que de manera similar encontraron cepas no tipificables productores de biopelículas (Bonifait y col., 2008). La capacidad de formar biopelículas no es necesaria para la virulencia, pero contribuye a la colonización a largo plazo, a la transmisión e incrementa las dificultades para erradicar estas infecciones (Huaijie y col., 2013). En algunas especies del género *Streptococcus* la presencia de la capsula impide la formación de biopelículas (Bonifait y col., 2008).

La penicilina es el fármaco de elección para el tratamiento de infecciones por *Streptococcus* spp. a pesar de su uso intensivo (Grenier y col., 2009). Una vez demostrada la capacidad de formar biopelículas por cepas no tipificadas de *S. suis*, se realizó la evaluación de la acción antimicrobiana de la penicilina, comparando su efectividad sobre células cultivadas en forma planctónica y en forma sésil o como biopelículas. Se encontró que la concentración mínima efectiva de Penicilina para reducir el 50% del crecimiento planctónico de *S. suis* fue $2 \mu\text{gml}^{-1}$; sin embargo, la concentración necesaria para reducir su contraparte sésil, es decir en forma de biopelículas fue superior $32 \mu\text{gml}^{-1}$ mientras, la MCI para reducir el 90% de las células planctónicas fue $128 \mu\text{gml}^{-1}$ y $500 \mu\text{gml}^{-1}$ para las células sésiles (Figura 2).

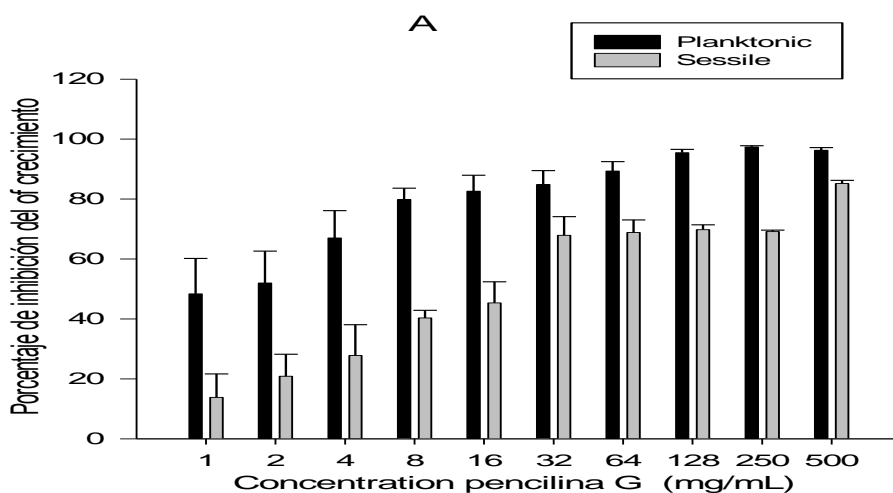


Figura 2: Efecto de Penicilina G (A) en células planctónicas y sésiles de *S. suis* después de 24 horas de contacto. Las barras de error representan la desviación estándar.

Se han notificado limitaciones significativas a la penetración de las biopelículas para los antibióticos beta-lactámicos, que actúan en la superficie de la bacteria debido a la impermeabilidad de su arquitectura estable. Las bacterias dentro de una biopelícula se multiplican muy lentamente y por lo tanto son mucho menos susceptibles a la muerte antimicrobiana dependiente del crecimiento (Mackay y col., 2000; Marchese y col., 2003). Por lo tanto, la necesidad de tratamientos de disolución de biopelícula más eficaces se hace imprescindible. Una de las formas es mejorar la actividad antimicrobiana combinando antibióticos con otros compuestos como NAC. La MIC de NAC para reducir el 90% de las células planctónicas fue de 2 mgml^{-1} , curiosamente, la MCI de penicilina en presencia de 8 mgml^{-1} de NAC se redujo de $500 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ a $128 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ para la inhibición de las bacterias sésiles y a $1 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ para la inhibición de las células planctónicas (Figura 3 C). Por lo tanto, las combinación de penicilina y NAC ejerció una inhibición sinérgica tanto a las formas planctónicas como sésiles.

La formación de biopelículas *in vitro* por las cepas de *S. suis* ocurrió antes de 4 horas. Los efectos de los agentes antibacterianos probados en el desarrollo de biopelículas establecidas se muestran en la Figura 3. Entre las concentraciones de Penicilina probadas, $250 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ y $500 \text{ } \mu\text{gml}^{-1}$ mostraron la mayor actividad de reducción de la biopelícula preformada, permitiendo sólo los siguientes porcentajes de formación $47,16 \pm 5,54\%$; $P < 0,05$ y $48,14 \pm 8,64\%$; $P < 0,05$, respectivamente. N-acetilcisteína (16 mgml^{-1}) redujo el desarrollo de la biopelícula aproximadamente a $60,16 \pm 2,33\%$ ($P < 0,05$) en comparación con el grupo control durante las primeras 4 horas (Figura 3 A y B). Sin embargo, la combinación de penicilina y NAC mostró un mayor efecto disruptivo sobre las biopelículas preformadas y redujo el desarrollo aproximadamente a $80,84 \pm 18,73\%$ ($P < 0,05$) con respecto al control después de 4 horas (Figura 3c). Ninguno de los tratamientos inhibió el desarrollo de la biopelícula en más del 50% con respecto al grupo no tratado después de 8 o 24 horas.

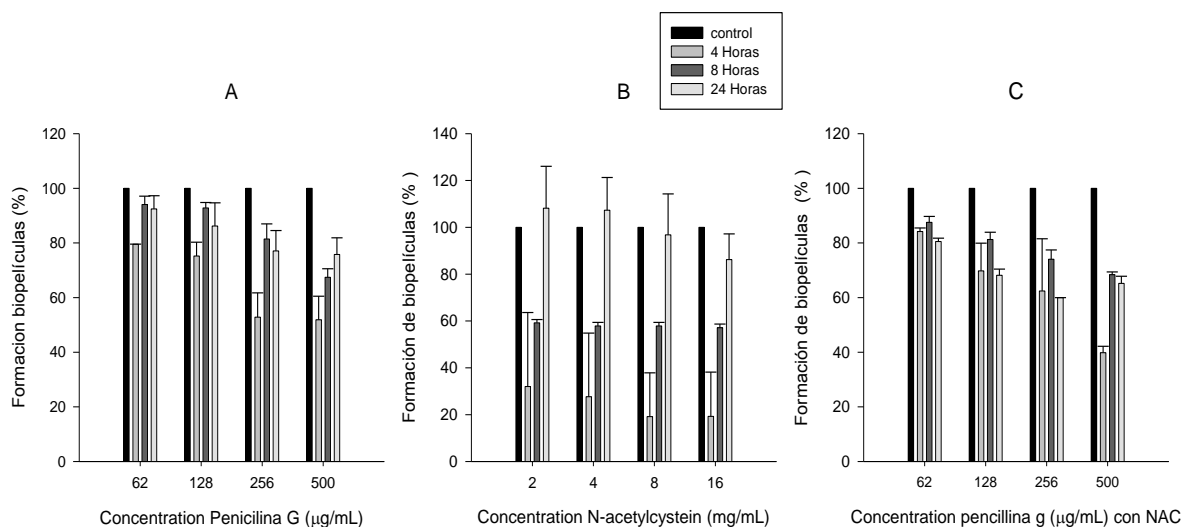


Figura 3: Tratamiento de biopelículas preformadas de *S. suis* después de 4, 8 y 24 horas con Penicilina G (A), N-acetilcisteína (B) y la combinación de Penicilina G con N-acetilcisteína (C). Los resultados se expresan como porcentajes en comparación con las mediciones de biopelículas no tratados formados en paralelo, que se consideraron 100%, diferencia significativa en comparación con el grupo de control ($P < 0,05$)

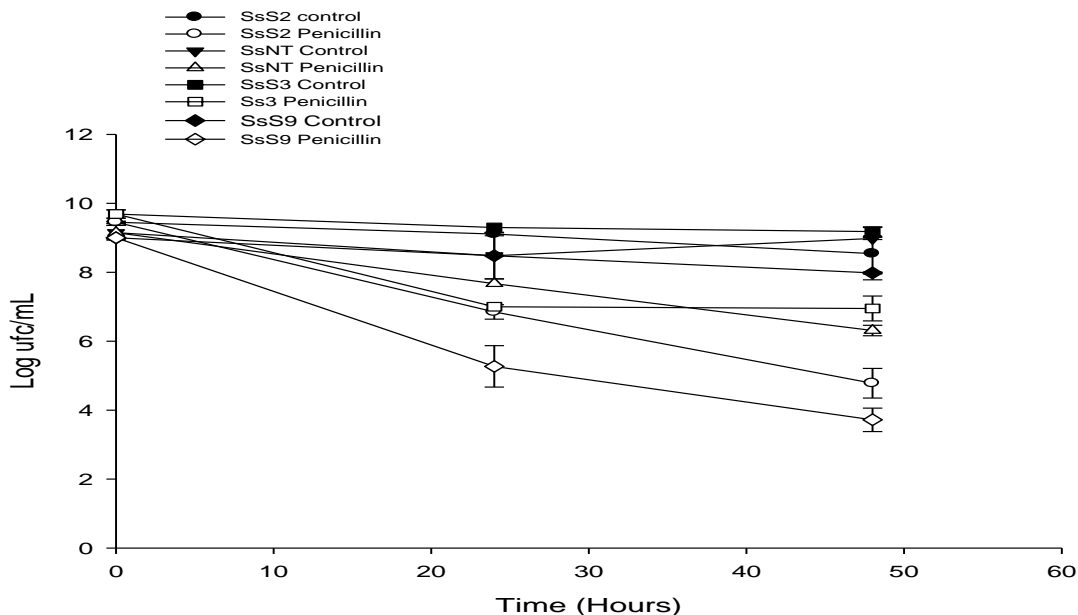
La formación de biopelículas se divide en tres etapas: temprana, intermedia y madura. Durante la primera etapa, las bacterias siguen siendo susceptibles a los antibióticos y la profilaxis antibiótica es crítica para el éxito del tratamiento (Merle et al., 2012). Algunos estudios muestran que, cuando se utiliza un agente antimicrobiano para la disrupción de la matriz exopolisacárida, se puede facilitar la penetración de otros antimicrobianos en la biopelícula preformada (Hajdu y col., 2009). Los resultados de este estudio mostraron que Penicilina y NAC alteraron las biopelículas preformadas hasta en un 50% y 38% de las placas cuando se usaron por separado a las concentraciones 500mg/ml y 16 mg/ml, respectivamente. Sin embargo, la aplicación de ambos compuestos mezclados sólo permitió el desarrollo de biopelícula hasta un 20% a las 4 horas. NAC es un antioxidante que contiene un grupo sulfhidrilo y un agente mucolítico que se utiliza en el tratamiento de la bronquitis (Marchese y col., 2003; Aslam y col., 2007). Estudios previos demostraron que NAC podría disminuir la formación de biopelículas por una variedad de bacterias inhibe la adherencia bacteriana y reduce la producción de la matriz de polisacárido extracelular, al tiempo que promueve la disrupción de biopelícula a maduras y reduce la viabilidad celular sésil (Aslam y col., 2007).

Otra de las expresiones de tolerancia fenotípica que pueden mostrar las bacterias es la producción de células persistentes, las cuales sobreviven al tratamiento antimicrobiano, aun cuando las cepas se confirmaron sensibles por las pruebas convencionales, ya sea por agar difusión con discos o por MCI. Aunque diferentes autores han sugerido que todas las especies de bacterias tienen la capacidad potencial para formar células persistentes (Keren I y col., 2004; Elie y col., 2016), es recomendable realizar estudios específicos sobre el comportamiento de las especies y sus cepas, porque las bases moleculares que explican los eventos de persistencia celular en bacterias no son totalmente conocidos.

Las curvas de letalidad constituyen el modelo experimental para la detección de células persistentes, para la realización de las mismas es prioridad conocer la MCI de los antibióticos (Balaban y col., 2004; Keren y col., 2004). En este sentido se definieron los siguientes valores para *S.suis* penicilina ($1 \mu\text{gm}^{-1}$) y Enrofloxacin ($2 \mu\text{gmL}^{-1}$), mientras para *P. multocida* fueron Ampicilina ($2 \mu\text{gmL}^{-1}$) y Enrofloxacin ($4 \mu\text{gmL}^{-1}$), que coinciden con los criterios del Comité Europeo sobre la Prueba de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST).

Los antibióticos seleccionados (betalactámicos y quinolonas) para el aislamiento de células tolerantes y persistentes a los fármacos, son bactericidas y actúan sobre estructuras dianas bacterianas que participan en la síntesis de la pared y la replicación celular (Bassetti y col., 2013). El recuento de UFC no aumentó después del desafío con altas concentraciones de ambos antibióticos y las cepas de ambos patógenos mostraron una cinética de muerte bifásica durante el experimento, típica de la formación de células persistentes. Las células, aproximadamente (10^9CFUml^{-1}) de *S. suis* disminuyeron hasta una concentración equivalente a 10^7CFUml^{-1} , alcanzando una meseta o una disminución lenta de las células supervivientes hasta 10^4CFU/ml^{-1} Figura 4 a-b, similar para las cepas de *P. multocida* Figura 5 a-b. Ambas especies *S. suis* y *P. multocida* revelaron células tolerantes para ambos antibióticos, aunque hubo ligeras diferencias, lo cual es consistente con los resultados de varios autores que encontraron que el grado de persistencia entre las cepas fue diferente (Wiuff y col., 2005; Hofsteenge y col., 2013; Barth y col., 2013).

A



B

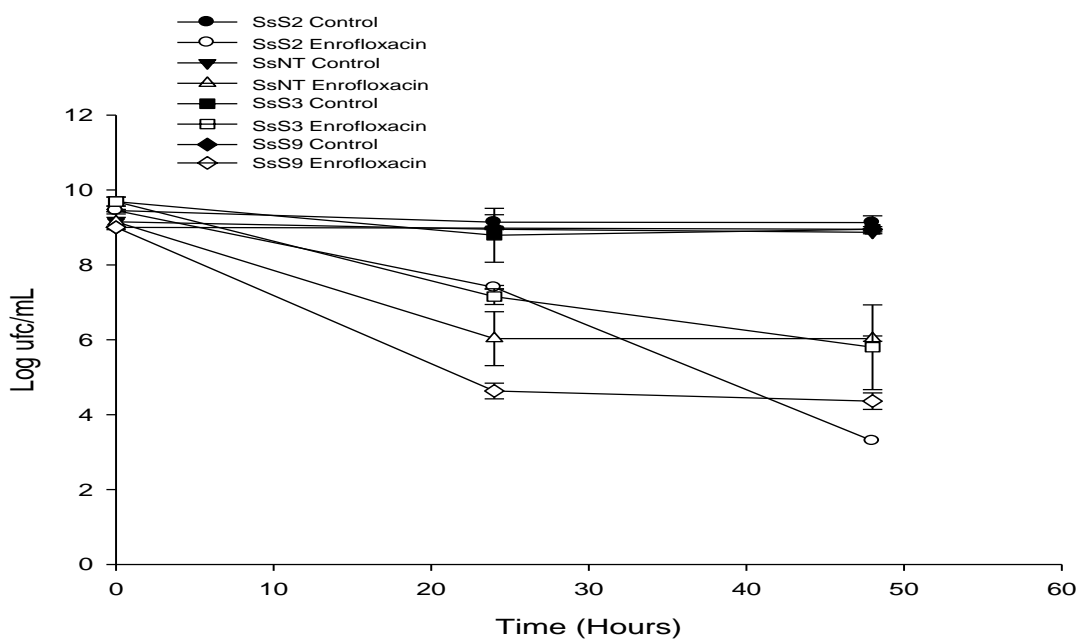
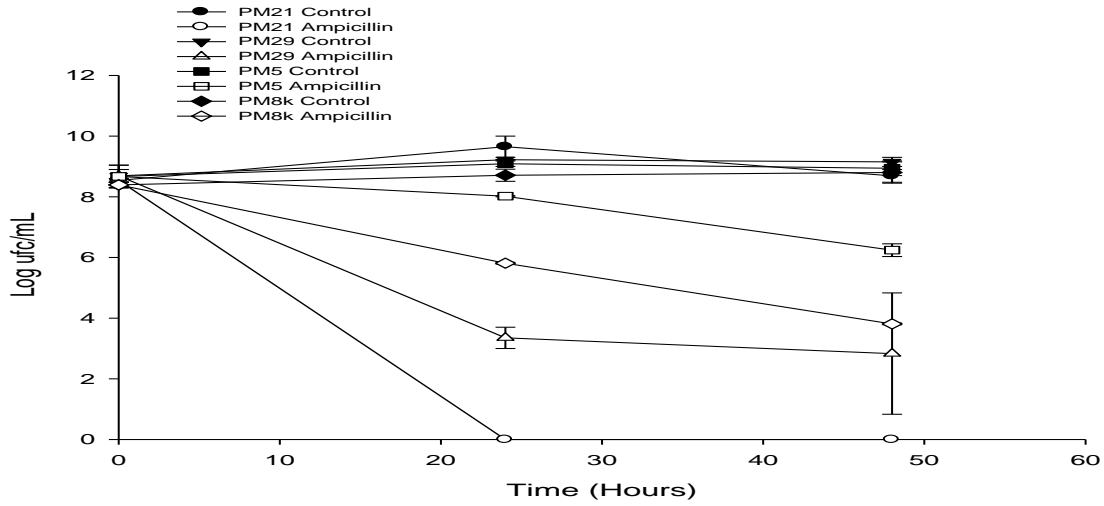


Figura 4: Curvas de letalidad de *Streptococcus suis*. Cultivos en fase estacionaria de cada una de las cuatro cepas de *S.suis* (Ss serotipo 2, Ss non-tipificable, Ss serotype 3 and Ss serotipo 9) se trataron con A) Penicilina 100xMCI y B) Enrofloxacina 100xMCI. Un cultivo de cada cepa al cual no se le adicionó antibiótico se utilizó como control- Los experimentos se realizaron con dos réplicas biológicas, las barras de error indican la desviación estándar

A



B

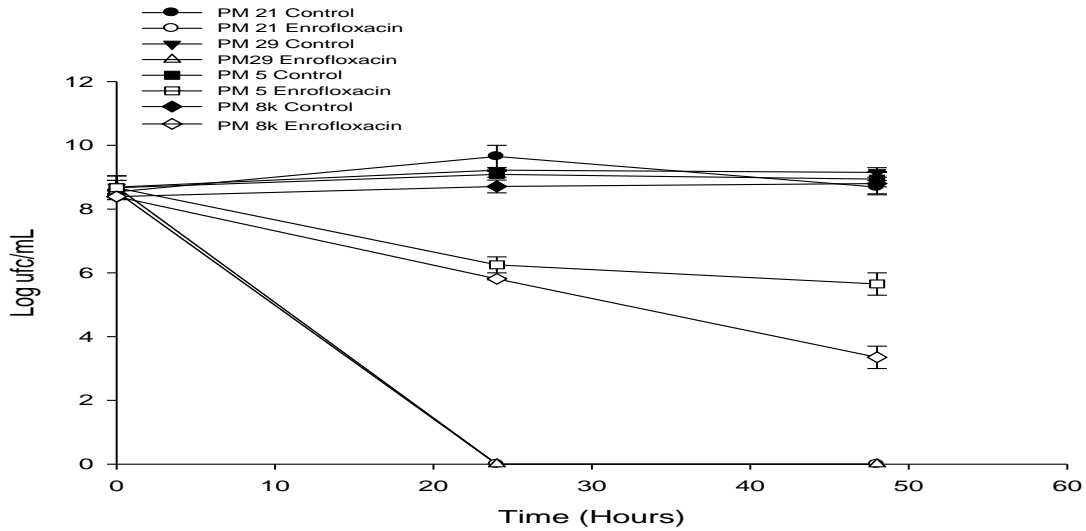


Figura 5: Curvas de letalidad de *Pasteurella multocida*. Cultivos en fase estacionaria de cada una de las cuatro cepas de *P. multocida* (PM5, PM21, PM29 and PM8K) se trataron con A) Ampicillin 100xMCI y B) Enrofloxacin 100xMCI. Un cultivo de cada cepa al cual no se le adicionó antibiótico se utilizó como control. Los experimentos se realizaron con dos réplicas biológicas, las barras de error indican la desviación estándar.

La cinética de las curvas de muerte fue muy similar para las cepas restantes, aunque difirió ligeramente en el nivel de células supervivientes, probablemente como consecuencia de la edad del inóculo. El comportamiento heterogéneo que mostraron las cepas en lo que respecta a la formación de células persistentes puede tener diferentes explicaciones. Los cultivos bacterianos que son genéticamente homogéneos pueden generar subpoblaciones con diferentes propiedades fisiológicas, aún cuando las concentraciones de cultivos se ajustaron previamente. Cuando estas bacterias en fase estacionaria se diluyen en medio fresco: algunas células comienzan a crecer inmediatamente y otras más tarde (Luidalepp y col., 2011), encontraron que la edad de los inóculos tiene efecto sobre la frecuencia de la formación de células persistentes.

Con el objetivo de definir si la resistencia observada por las cepas no es debido a la adquisición de elementos genéticos, se realizó el ensayo de heredabilidad, para lo cual se seleccionaron dos cepas (SsS3 y PM5). Las células supervivientes de ambas cepas que mostraron altos niveles de persistencia bajo el efecto de ambos antibióticos se transfirieron a un medio de cultivo fresco y se incubaron hasta alcanzar una concentración celular aproximada a 1×10^8 ufc mL⁻¹, y fueron tratadas de manera similar durante dos ciclos consecutivos con betaláctamicos. Se obtuvo la curva que aparece en la figura 6 y corrobora la naturaleza no heredable de la resistencia fenotípica observada. Si la resistencia, fuera debido a una alteración genética el patrón de la curva habría sido diferente y en cada ciclo la población no habría disminuido, sino se habría incrementado por tratarse de células fenotípicamente resistentes.

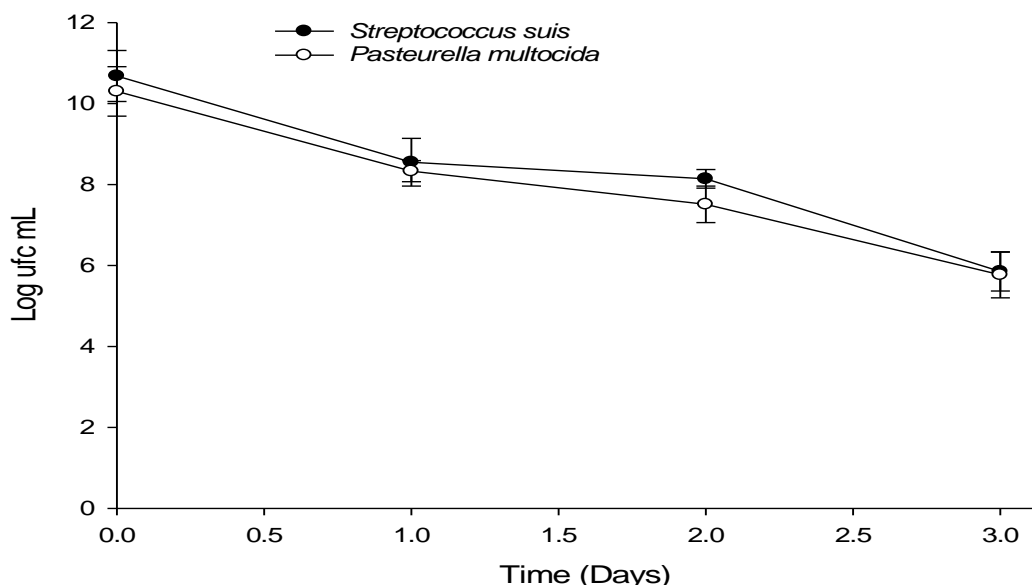


Figura 6: Curvas de muerte dependientes del tiempo de *S.suis* (círculos negros) y *P.multocida* (círculos blancos). Los experimentos se realizaron con dos réplicas biológicas y las barras indican la desviación estándar. Dos aislados persistentes (SsNT and PM5) que sobrevivieron a un tratamiento por 24 horas con $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of Penicilina and Ampicilina respectivamente, fueron expuestos a tres tratamientos en similares condiciones.

El mecanismo de la formación de células persistentes no se conoce bien y el estado metabólico de estas células es muy debatido. El principal modelo que explica la base genética de la formación de células persistentes, consiste en un sistema toxina-antitoxina (TA), que induce un estado de latencia (Lewis K. 2008) y permite a las células sobrevivir a los efectos de Antibióticos. Los sistemas de TA generalmente consisten en una toxina estable (proteína) que interrumpe un proceso celular esencial (por ejemplo, la traducción a través de la degradación del ARNm) y una antitoxina lábil (ya sea ARN o una proteína) que evita la toxicidad (Schuster y col., 2013). Otro modelo es la expresión de alarmona guanosina tetrafosfato (ppGpp) que también reduce directamente la replicación del ADN y la síntesis de proteínas (Dalebroux y col., 2012 y Thomas K y col., 2013).

En la actualidad numerosas investigaciones se orientan a la erradicación de células persistentes (Van den Bergh y col., 2017), una de las metodologías propuesta es conocida como ensayo de potenciación de la actividad de aminoglucósidos mediante el empleo de metabolitos carbonados, que penetran a la célula metabólicamente inactivas generando una fuerza motriz de protones, lo cual favorece una actividad metabólica mínima y hace a la célula bacteriana susceptible a la acción de los aminoglucósidos. En este trabajo como se muestra en la figura 7 todos los metabolitos carbonados en combinación con el aminoglucosido gentamicina permitieron disminuir la población de células persistentes con respecto al grupo control, aunque la erradicación total se logró con arginina y glicerol.

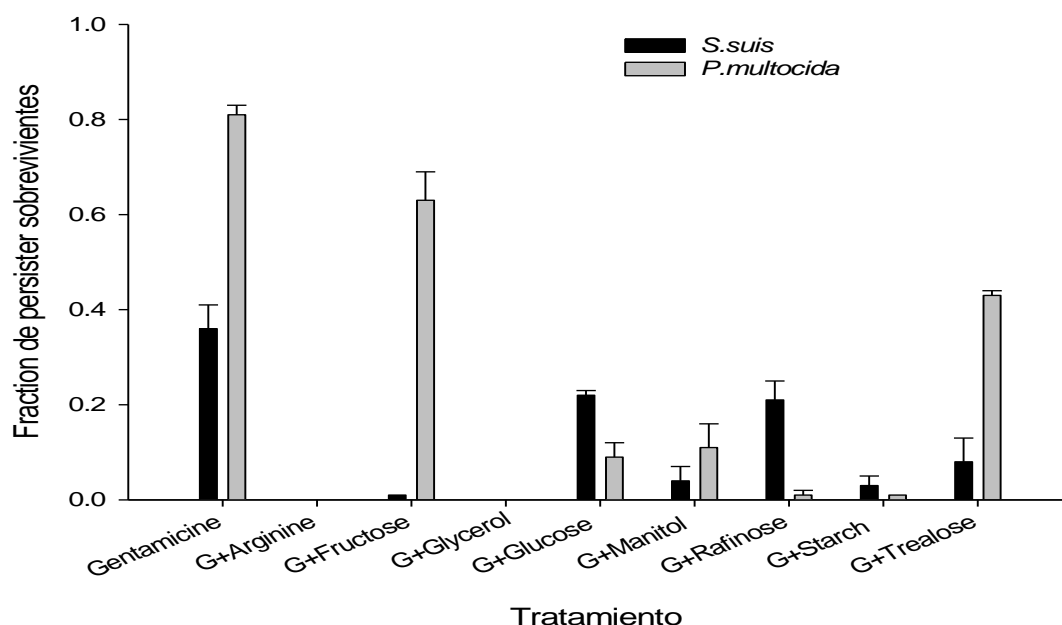


Figura 7: Ensayo de potenciación con aminoglucósidos para células persistentes. Cultivos en fase estacionaria se trataron con antibiótico β -lactámicos por 5 horas, las células se incubaron en el medio mínimo M9 con Gentamicina (G) y diferentes fuentes de carbono (Arginina, Fructosa, Glicerol, Glucosa, Manitol, Rafinosa, Almidón, Trealosa), las células persistentes tratadas solamente con gentamicina (100 μ g/ml) se utilizaron como control. La fracción de células sobrevivientes se determinó mediante conteo de UFC. Las barras indican la desviación estándar de las medias.

La persistencia de bacterias que pueden producir infecciones recalcitrantes requiere atención; este estudio se ha centrado en revelar la formación de células persistentes en cepas de *S. suis* y *P. multocida*. En el caso *S. suis* ya había sido informado de su capacidad para tolerar antibióticos a través de la formación de biopelículas y células persistentes (Willenborg y col., 2014), sin embargo en nuestro país no se había realizado un estudio similar. Para *P. multocida*, si bien se considera que todas las bacterias tienen esta capacidad, hasta el conocimiento de los autores antes de este estudio, la formación de células persistentes por esta especie no ha sido informada.

El tratamiento con antibióticos debido a infecciones por *S. suis* en cerdos rara vez tiene éxito, probablemente debido a la pobre penetración de antibióticos en los tejidos amigdalinos porcinos, que actúan como una fuente de infección. Ambas especies *S. suis* y *P. multocida* formaron células persistentes frente antibióticos, β -lactámicos y quinolonas. La manifestación de estos fenotipos de resistencia transitoria no asociada a cambios genéticos puede explicar fracasos terapéuticos y recurrencia en infecciones respiratorias, que suelen presentarse en forma subclínica, reduciendo la capacidad pulmonar y la eficiencia en la ganancia en peso.

El tratamiento combinado de la gentamicina con metabolitos carbonados (arginina y glicerol), *in vitro* permitió la erradicación de las células persistentes formadas por ambos patógenos. En la actualidad ante el incremento y propagación de mecanismos de resistencia en las bacterias, se convoca además de la búsqueda de nuevas alternativas, revisar los protocolos actuales terapéuticos y aprovechar las combinaciones de agentes antimicrobianos.

4.3.2 Determinación de la presencia y estructura poblacional de la bacteria zoonótica *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) en la crianza porcina.

De un total de 285 muestras tomadas de cerdos resultaron portadores nasales de SARM un 7,7% (95%, Coeficiente de Intervalo 4,61-10,81%). Mediante el análisis de la PFGE se identificaron tres grupos principales de SARM (I, II y III). Todos los aislamientos de SARM en el (grupo I) contenían las propiedades genéticas específicas del clon epidémico USA300 (Mediavilla y col., 2012; O. Leiva Peláez y col., 2015; Nimmo., 2007). Los clones de este grupo pertenecen a la ST8, excepto una cepa que correspondió a la nueva ST173, que difiere de las demás por una variante del alelo *yqiL*, y se depositó en la base de datos (<https://pubmlst.org/saureus/>). Este grupo también presentó el siguiente perfil SCC *mecl* Va, *dru* dt9g, y los marcadores de virulencia PVL, ACME I. Aislados de SARM, USA300LPV+ en humanos están fuertemente relacionados con infecciones en piel y neumonías (O. Leiva Peláez *et al.*, 2015; Lina *et al.*, 1999; Nimmo., 2007). Además de compartir el mismo perfil de PFGE, los aislados de SARM en este grupo contenían los mismos factores de virulencia que la cepa control USA300 aislada en humanos. Por otra parte estas pertenecían al tipo *spa* t024 y contenían los genes que codifican para las enterotoxinas *sek* y *seq* (Figura 8). Los aislados de este grupo fueron resistentes a β -lactámicos (*mecA*, *blaZ*), macrólidos [*msrA*, *mph*(C)], aminoglucósidos [*aph* (3')-III] y fluoroquinolonas [GrlA(S80-Y) y GyrA (S84-L)] (Tabla 7). Este perfil de resistencia ya

había sido descrito anteriormente en SARM clone USA300 aislado en humanos (O. Leiva Peláez y col., 2015).

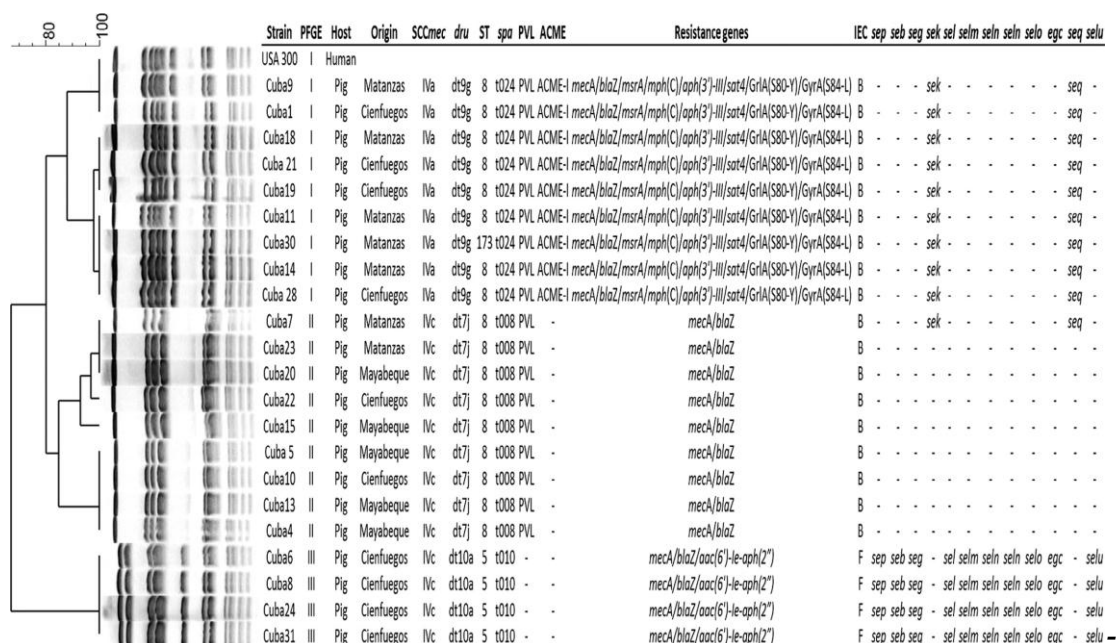


Figura 8: Dendrograma de la macrorestricción con la enzima SmaI y patrones de electroforesis en campo pulsado (PFGE). Características genéticas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aislados de cerdos de matadero procedentes de tres provincias de la region occidental de Cuba. El dendrograma se generó usando el programa BioNumerics software v.7.6 (AppliedMaths, Sint-Martens-Latem, Belgium). La definición de grupos se fundamentó en un valor de corte de 80% de similaridad PFGE grupos (I, II y III) [Coeficiente de Dice, representado por UPGMA (del inglés unweightedpair-groupmethodwitharithmetic mean), 1.5% optimización y 1% tolerancia]. SCCmec, staphylococcal casete cromosómico mec; dru, unidades repetidas directas [dt9g (5a-4a-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e), dt7j (5a-3c-5b-3a-2g-3b-4e) y dt10a (5a-2d-4a-0-2d-5b-3a-2g-3b-4e)]; ST, secuencia tipo (nueva secuencia tipo ST173 tiene un simple cambio en el alelo yqiL 3-3-1-1-4-4-6); spa, *Staphylococcus* gen de la proteína A ; PVL, leucocidina de Pantón–Valentine; ACME I, elemento para el catabolismo de la arginina I (positivo por la amplificación por PCR de los genes *arc* y *opp3*). Genes de Resistencia y su función: *mecA*, proteína de unión a la penicilina PBP2a; *blaZ*, β -lactamasa; *msrA*, bomba de eflujo para macrolidos–streptograminas B, *mph(C)*, macrolidofosfotransferasa; *aph(3')-III*, aminoglicosidofosfotransferasa confiere resistencia a neomicina y kanamicina; *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, bifuncionalaminoglicosidoacetiltransferasa y fosfotransferasa para la resistencia a gentamicina, tobramicina and kanamicina; *sat4*, streptotricina acetil transferasa; GrlA(S80-Y), DNA topoisomerasa IV con una sustitución de una serina por una tirosina en la región que determina la resistencia a las quinolonas (QRDR) en la posición 80; GyrA(S84-L), DNA girasa A con una sustitución de serina por leucina en QRDR en la posición 84; *sak*, staphyloquinasa; *chp*, proteína inhibidora de la quimiotaxis (CHIPS); *scn*, complemento inhibidor staphylococcal; grupo de evasión de la inmunidad innata (IEC) B, *sak+*, *chp+*, *scn+*; IEC F, *sak+*, *chp+*, *scn+*, *sep+*. Enterotoxina: *sep* [=sea(N315)], enterotoxina P (=enterotoxina A alelo de N315); *seb*, enterotoxina B; *seg*, enterotoxina G; *sek*, enterotoxina K; *sel*, enterotoxina L; *selm*, enterotoxina similar al gen/ proteína M; *seln*, enterotoxina similar al gen/proteína N; *selo*, enterotoxina similar al gen/protein O; *egc*, gen del grupo de enterotoxinas; *seq*, enterotoxina Q; *selu*, enterotoxina similar al gen/protein U.

Los clones PFGE (grupo II) presentaron características relacionadas al clon USA300-LV (ST8, *spa* t008, SCC*meclVc*, *dru* dt7j, PVL + y ACME-) el cual se encuentra diseminado en países de Latinoamérica (Mediavilla y col., 2012; Nimmo., 2007) y esta variante no había sido reportada en Cuba hasta el momento (O. Leiva Peláez y col., 2015). Los clones de este grupo fueron resistentes solamente a los antibióticos β -lactámicos (*mecA*, *blaZ*), y una única cepa (denominada Cuba7) contenía los genes para las enterotoxinas *seq* y *sek*, se conoce que el hecho de estar presente o no en las cepas USA300-VL no limita su capacidad de causar infecciones en humanos (Nimmo., 2007). El tercer grupo PFGE (grupo III) contiene clones pertenecientes a la ST5, *spa* t010, SCC*meclVc*, *dru* dt10a y no presentaron genes para los factores de virulencia PVL y ACME, pero contienen los genes para las enterotoxinas *sea* (N315), *seb*, *sel*, *selm*, *seln*, *selo*, *egc* y *selu* (Figura 8) y fueron resistentes a β -lactamas (*mecA*, *blaZ*), así como a los aminoglucósidos gentamicina y kanamicina [*aac*(6') - *le-aph* (2'') - *la*] (Tabla 1). La presencia de ST5-SCC*meclVc*, que portan la leucocidina PVL, se ha asociado con infecciones en pacientes pediátricos en América Latina, pero no en Cuba hasta el momento (Mediavilla y col., 2012; O. Leiva Peláez et al., 2015).

Los cerdos de manera general portan SARM pertenecientes al linaje ST398 (Lewis y col., 2008). La presencia de SARM perteneciente al linaje ST8 (clon USA300) en cerdos como portadores ha sido reportada en muy escasas ocasiones y con un limitado número de aislados. Este fue el caso de un cerdo de crianza de traspatio en Perú y puntualmente en algunos cerdos procedentes de Connecticut, Estados Unidos (Arriola y col., 2011; Osadebe y col., 2012). En este último trabajo los autores plantean la posibilidad de una antropozoonosis y alertan sobre la necesidad de tomar medidas para evitar la transmisión y diseminación de SARM entre los animales y el hombre.

En este estudio se pudo confirmar que todas las cepas de SARM identificadas en las muestras tomadas de cerdos de la región occidental de Cuba pertenecen a alguno de los grupos de clasificación según la presencia de genes que intervienen en la evasión de la respuesta inmune innata (IEC), descrito específicamente en cepas de origen humano, lo cual es una caracterización de las cepas de *S. aureus* basadas en sus perfiles de toxinas, estas a su vez se han asociado con una incidencia extremadamente alta en infecciones clínicas en humanos (Van Wamel y col., 2006).

Las cepas USA300 y USA300-LV pertenecen al grupo IEC B, que se caracteriza por la presencia de estafilokinasa (SAK), proteínas inhibidoras de la quimiotaxis (CHIPS) e inhibidores del complemento estafilocócico (SCN). Las cepas ST5 pertenecen al grupo IEC F que además portan la Enterotoxina A, *sea* (N315) (= *sep*) y sólo fueron detectados en cerdos procedentes de Cienfuegos.

El origen de SARM en las poblaciones de cerdos en Cuba se desconoce, la presencia del linaje USA300 no estuvo relacionada con cerdos de una región específica, debido a que el clon epidémico USA300 se encontró tanto en Cienfuegos como en Matanzas, mientras la variante USA300-LV se encontró diseminado en las tres regiones (Figura 9). Aún cuando los clones pertenecientes a USA300-LV y ST5 no han sido reportados hasta ahora en humanos en Cuba, su presencia en la cría de cerdos no es probable que esté directamente asociada con el comercio internacional de estos animales, pues no se han producido importaciones de cerdos al país desde América Latina.

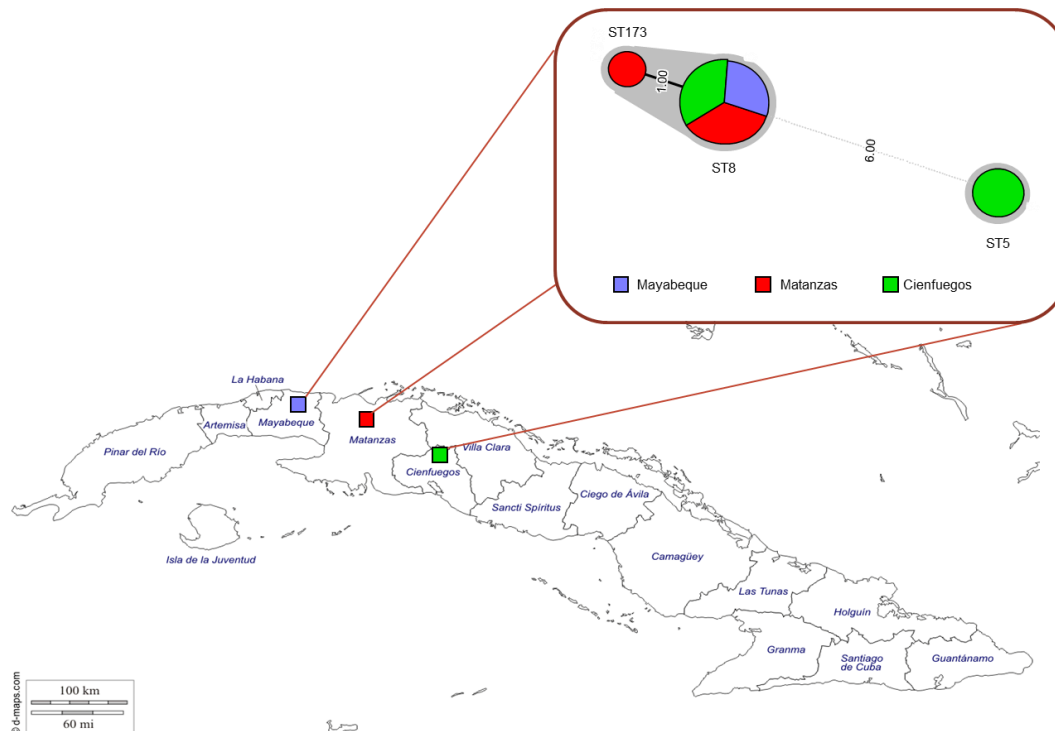


Figura. 9. Distribución geográfica de los linajes de SARM en cerdos procedentes de tres provincias de la región occidental de Cuba y representación en un árbol (minimalspanningtree, MST) generado a partir del perfil de alelos obtenidos en la MLST.

En general, este estudio reveló que los cerdos de las tres provincias cubanas estudiadas actúan como reservorios insospechados de cepas de SARM epidémicas, incluidas las del linaje USA300, que también han sido identificadas como las principales causas de infecciones por SARM en humanos en esta región (O. Leiva Peláez y col., 2015). Los cerdos generalmente portan SARM pertenecientes a la ST398 LPV-, sin embargo se pudo revelar la presencia insospechada de clones epidémicos en esta especie animal. Esto significa un cambio en la epidemiología de este microorganismo. A partir de este trabajo se pudo profundizar en las bases genéticas de los aislados de SARM de cerdos en Cuba. Esta información permite conocer la relación que existe entre los aislados cubanos y otros en cualquier parte del mundo, aportando datos sobre la epidemiología molecular del patógeno estudiado que permiten su comparación a nivel global.

4.3.3 Identificación de cepas de la bacteria comensal *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido.

Aislamiento e identificación de bacterias gran negativas

De un total de 200 muestras colectadas en las instalaciones porcinas ubicadas en el municipio de Matanzas, se logró la recuperación de 41 (20,5%) aislados de bacterias gran negativas, correspondientes a la familia *Enterobacteriaceae* que fueron resistentes a la concentración de 2 µg/mL de cefotaxima, Tabla 8. Acorde a las características culturales, morfológicas, y las pruebas bioquímicas se identificaron los siguientes géneros y especies: *Escherichia coli* (36), *Serratia marcescens* (2), *Enterobacter cloacae* (2) y *Enterobacter sakazakii* (1).

Tabla 8: Distribución de aislados de *Enterobacterias* viables en presencia de 2 µg/ml de cefotaxima (C3G) según el sitio de aislamiento la unidad de procedencia.

Instalación porcina	Hisopado de animales	Operarios	Agua	Comederos y tetinas	Ambiente superficies	Instrumentos de trabajo	Total
Granja A	8/10	2/3	1/3	9/20	2/16	-/-	22/52
Granja B	0/12	0/8	0/3	0/16	1/13	-/-	1/52
Granja C	1/10	0/4	1/2	0/4	0/2	-/-	2/22
Matadero 1	3/10	1/7	0/2	0/2	4/13	1/6	9/40
Matadero 2	3/10	0/6	1/2	0/2	2/9	1/5	7/34
Total	15/52	3/28	3/12	9/44	9/53	2/11	41/200

Un aspecto de interés resulta la concentración de cefalosporina que se adiciona al medio de cultivo para la selección de cepas resistentes a estos antibióticos. García y col., 2010 plantean que para identificar bacterias productoras de BLEE a partir de hospederos portadores se pueden utilizar los medios suplementados con cefotaxima o ceftazidima a una concentración de 1 µg/ml. Sin embargo otros estudios publicados refieren concentraciones de cefotaxima que oscilan entre 0,5 y 4 µg/ml, pero si se utiliza una concentración demasiado alta, entonces disminuye la sensibilidad en la detección, de manera general se sugiere para la elección del medio y del agente de selección, tener en cuenta la situación epidemiológica de la unidad o centro donde se lleve a cabo el estudio (Calvo y col., 2011). Teniendo en cuenta que en Cuba no existen antecedentes del uso de este medio para la identificación de bacterias positivas para BLEE se utilizó una concentración promedio equivalente a 2 µg/ml de cefotaxima, por encima de la MCI (1 µg/ml) establecida por el CLSI, 2016.

E.coli fue la especie más frecuente encontrada entre las cepas resistentes a cefotaxima en este trabajo. *E. coli* es la enterobacteria resistente a betalactámicos que se aísla con más frecuencia en los últimos años, en humanos y en los animales

de granja, especialmente en pollos y cerdos, también en diversos alimentos. Es una bacteria comensal en los seres humanos y los animales, se encuentra de forma común presente en el medio ambiente y se considera un indicador de la contaminación fecal en los alimentos y el agua. *E. coli* es además la principal causa de infección del tracto urinario (ITU) tanto en pacientes hospitalizados como en las infecciones de la comunidad, donde se aísla en un porcentaje aún mayor Bélanger y col, 2011.

Por la prueba tamiz un total de 17 cepas mostraron halos iguales o inferiores a 17, 22 y 29mm para ceftazidima, ceftriaxona y cefotaxima respectivamente, tres cefalosporinas de tercera generación (C3G), estas cepas, fueron resistentes al aztreonam y cefepime con halos menores de 17 y 18 mm, mientras mostraron sensibilidad con halos superiores a 14 mm a ceftioxitin (Figura 10 A y B).

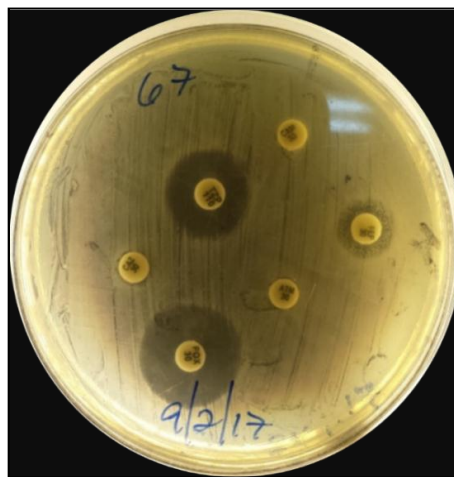


Figura 10: Detección de BLEE mediante prueba tamiz con discos cefalosporinas de tercera generación (CAZ, CXM), TZB betalactámico mas inhibidor tazobactan, cafamicinaFOX (ceftioxitin), cefalosporina de cuarta generación cefepime (FEM) y aztreonam (AZM). Datos: originales investigación en el laboratorio bacteriología censa. Perfil de resistencia, obsérvese la resistencia a todas las C3G, exceptuando el disco de FOX (ceftioxitin)

La resistencia de las Enterobacterias a β -lactámicos puede ser debido a varios mecanismos, la expresión de BLEE, la modificación de la permeabilidad por proteínas de membrana externa (porinas) debido a pérdida o deficiencias, que impiden la entrada de los antibióticos a la célula bacteriana, las bombas de eflujo y la producción de β -lactamasas de tipo AmpC. Cuando se aísla una cepa Gram negativa para la cual antibióticos β -láctámicos muestran una MCI elevada o una disminución en el diámetro del halo de inhibición para C3G con respecto a lo esperado para cepas sensibles, es prioridad discriminar entre la expresión de BLEE o los mecanismos descritos anteriormente (Cano y col., 2007; Navarro y col., 2002, Trupia y col., 2005).

El empleo de discos “indicadores” en la prueba tamiz reveló características específicas de las BLEE y permitió descartar otros mecanismos de resistencia. Las cefamicinas (cefoxitina, FOX) no son hidrolizadas por las BLEE, por lo que las cepas BLEE+ deben ser sensibles a este compuesto, sin embargo si existen deficiencias en las proteínas porinas de la membrana celular, la cefoxitina no puede penetrar y la cepa en tal caso se manifiesta resistente, en este trabajo las cepas, que mostraron resistencia a FOX, no fueron consideradas como posibles productoras de BLEE, aunque es posible que en esas cepas estuvieran presentes ambos mecanismos. El uso de la cefalosporina de cuarta generación (cefepime), permitió descartar la presencia de β -lactamasas no inducibles denominadas AmpC por cuanto este antibiótico no es hidrolizado por AmpC inducibles, mientras lo es por las BLEE. Es necesario resaltar que la identificación de AmpC es de importancia al estar contenidas en elementos transmisibles que contribuyen a su propagación, pero requieren de metodologías específicas para su identificación (Truppia y col., 2005; Calvo J y col., 2011; Lili y col., 2015) y no fueron consideradas en este trabajo.

Un total de 17 aislados mostraron la sensibilidad de las β -lactamasas frente a inhibidores, específicamente (amoxicilina/ácido clavulánico), el cual induce a la aparición de halos fantasmas o a la ampliación del halo de inhibición para las cefalosporinas en la zona cercana al disco que contiene esta mezcla, debido al efecto inhibitorio de este último compuesto sobre las BLEE (Figura 11).

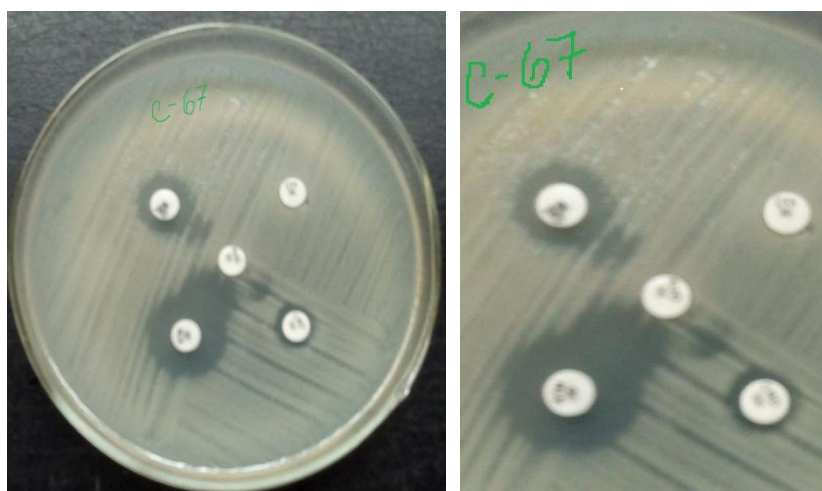
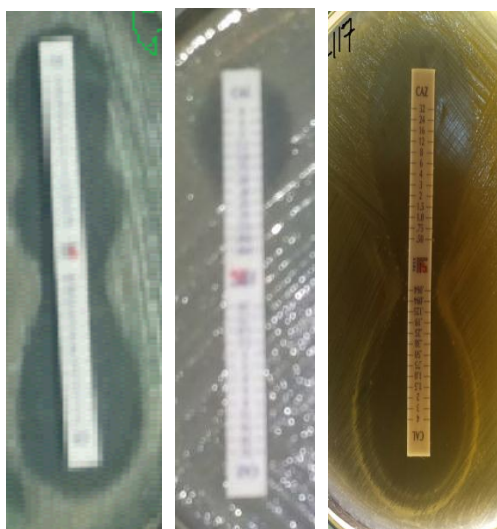


Figura 11: Cepa productora de BLEE (*E. coli*) sinergia positiva, se observa sinergia entre las cefalosporinas y el ácido clavulánico utilizando 2- C3G (ceftazidima (30 μ g); cefotaxima (30 μ g)) y 1 -C4G (cefepime (30 μ g)) y la combinación de amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 μ g).

La prueba de sinergia mediante el ensayo Epsilon test con el antibiótico ceftazidima confirmó la producción de BLEE en 15/17 cepas previamente positivas por las pruebas de tamizaje y de sinergia descritas anteriormente, la proporción a partir de los valores de CMI con y sin inhibidor resultó ≥ 8 para estas cepas. Sin embargo, 2/17 cepas no presentaron el patrón fenotípico para BLEE esperado para esta prueba, es posible que las enzimas producidas por estas cepas no presenten actividad sobre este compuesto. Figura.12



a) Positiva

b) Negativa

Figura 12: Prueba de E-test de ceftazidima (CAZ) más ácido clavulánico en un A) aislado productor de BLEE y B) Aislado no productor de BLEE.

Se describe que las BLEE del grupo CTX-M hidrolizan mejor la cefotaxima (CTX) y la ceftriaxona (CRO) que la ceftazidima (CAZ) y su inhibición es incluso mayor por tazobactam que por ácido clavulánico (Bradford 2001; Jacoby 2005). Por tal motivo sería conveniente la utilización de tiras E-test de otras cefalosporinas como cefotaxima o incluso cefepime como indica el fabricante para descartar aquellos aislados que presenten otras enzimas o la combinación de estas. Aunque también ha sido descrito que estas enzimas presentan una relación entre estructura y función y algunos cambios en la secuencia favorecen la hidrólisis sobre ceftazidima. Por citar ejemplo, los aminoácidos en posición 240 y 267 juegan un papel importante en la evolución de estas betalactamasas. Las enzimas CTX-M-15, CTX-M-27, CTX-M-16, derivan de CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 respectivamente, por sustitución de Gly-240→Asp presentando una potente acción frente a ceftazidima. La betalactamasa CTX-M-19 deriva de CTX-M-18 por sustitución de Pro-267→Ser lo que le proporciona mayor actividad frente a ceftazidima. (Poirel y col., 2002; Cano y col., 2007).

Las BLEEs son uno de los mecanismos de resistencia más difíciles de detectar en los laboratorios de Microbiología clínica, en función de los métodos fenotípicos. La selección depende de las condiciones del laboratorio, pues tanto el método tamiz y las pruebas de sinergia, son de fácil realización e interpretación y no requiere disponer de una infraestructura costosa. En general, la presencia de mecanismos mixtos de resistencia a antibióticos β -lactámicos (BLEE y/o AmpC) dificultan en gran medida las técnicas de confirmación fenotípica a nivel de clase. Por lo que, para

obtener resultados confirmatorios con mayor rapidez, se aconseja la utilización de técnicas moleculares, específicamente (PCR) (Trupia y col., 2005; Treviño y col., 2009). En la figura 4 se observan los productos de amplificación por PCR correspondientes al fragmento de 1049 pb del gen *bla*_{CTX-M}.

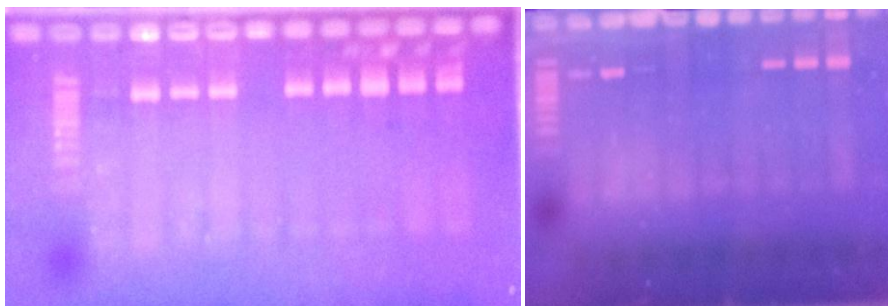


Figura 13: Electroforesis en gel de agarosa al 2 % con Bromuro de Etidium mostrando los resultados de la amplificación obtenidos mediante la PCR simple para la confirmación de cepas productoras de BLEE. 1 control negativo cepa *E.coli* ATCC, línea 2 y 14 marcador de peso molecular (100pb) línea 3-21 aislados del estudio, – línea 22 control negativo.

Un total de 16 aislados fueron confirmados para la producción de BLEE por PCR. Una de las cepas que no fue positiva por la prueba de E-test–cefazidima, amplificó un fragmento correspondiente al tamaño esperado para el gen CTX-M, lo cual corrobora la producción de BLEE en esta cepa y confirma que las β -lactamasas expresadas por las mismas tienen baja afinidad por el antibiótico ceftazidima.

El gen *bla*_{TEM} se detectó en 4/16 y el gen *bla*_{CTX-M} 16/16, mientras el gen *bla*_{SHV} no se detectó. Las cepas positivas para el gen *bla*_{TEM}, también lo fueron para *bla*_{CTX-M}. La ausencia del gen *bla*_{SHV}, coincide con los informes de Lili Gao., 2015 en el estudio de *E.coli* procedente de cerdos. Mientras la detección simultánea en una misma cepa de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{CTX-M} coincide con otros estudios (Liao y col., 2015; Von Salviati y col., 2015). Los aislados de la granja A presentaron mayor diversidad enzimática seguido de los procedentes del Matadero 1, siendo el fragmento del gen *bla*_{CTX-M} encontrado con mayor frecuencia en hisopados rectales de cerdos y en ambiente.

La prueba de susceptibilidad para otras familias de antibióticos ciprofloxacina, tetraciclinas, gentamicina y azitromicina reveló que 4/17 aislados BLEE+ fueron resistentes a estas familias de fármacos, 3 aislados de hisopados rectales y un aislamiento realizado de la superficie de un pasamanos en la granja A. Con frecuencia se utilizan antibióticos como tetraciclinas, quinolonas y macrólidos en medicina veterinaria, los genes de resistencia a estas familias pueden localizarse en los mismos elementos móviles que transportan genes para las BLEE, y de esta manera ocurre la co-selección de los genes de resistencia a β -láctamicos a pesar de que los β -láctamicos tienen un uso restringido en la crianza animal (Bonnet y col., 2004).

El porcentaje de resistencia más elevado se encontró frente a la tetraciclina el cual es uno de los antibióticos que con mayor frecuencia se emplea en las explotaciones porcinas (Yang y col., 2014). El peligro de transmisión de estos plásmidos a

humanos es un problema de salud mayor cuando se combina la producción de BLEE con resistencia a quinolonas debido a las limitadas opciones para la administración de antibióticos orales, requiriendo entonces del ingreso hospitalario del paciente (Schmithausen y col., 2015).

Los resultados obtenidos evidencian que las instalaciones estudiadas son reservorios de genes BLEE. En cuanto al tipo de BLEE, se detectaron mayoritariamente BLEEs del tipo CTX-M y en menor medida BLEEs del tipo TEM. Estos resultados coinciden con la situación epidemiológica que se describe en la actualidad para las enzimas BLEE. La epidemiología y evolución de las bacterias productoras de las enzimas BLEE ha sido un proceso muy dinámico, en cuanto a la especie bacteriana y el tipo de β -lactamasa. En un principio el género *Klebsiella* en pacientes hospitalizados, fue detectado con mayor frecuencia para la producción de BLEE derivadas de TEM y SHV. En los últimos 10 años se incrementa la prevalencia, ahora de *E. coli* BLEE+, en portadores fecales tanto en pacientes hospitalizados y se extiende a pacientes de la comunidad, y además las BLEE más frecuentes son actualmente del tipo CTX-M (42). Existen varios estudios publicados en diferentes países de Europa y Asia sobre la detección de BLEE, en cepas de *E. coli* fundamentalmente del grupo CTX-M, en animales sanos destinados al consumo humano, y en menor medida en animales de compañía, e incluso en especies salvajes (Livermore y col., 2016; Schmithausen y col., 2015; Liao y col., 2015).

El hallazgo de cepas productoras de BLEE a partir de muestras de hisopados rectales, manos de operarios, ambientes e instrumentos de trabajo (Tabla 9), sugiere la posible diseminación de estas cepas desde el excremento de los cerdos al ambiente circundante. Un aspecto relevante en las granjas de cerdos es el hacinamiento en el que con frecuencia se crían estos animales, lo cual propicia enormemente la dispersión y diseminación de estas bacterias. El stress a que en determinado momento se exponen, la temperatura ambiental, los vectores, además de un uso no prudente de antimicrobianos, pueden favorecer esta situación (38). La evidencia de la transferencia de cepas BLEE+ de animales a humanos por contacto cercano parece posible, pero las evidencias aún son escasas, aun así existen varios estudios que con herramientas de tipificación han podido mostrar similitud entre cepas resistentes de origen humano y animal (Torres y col., 2007; Moodley y col 2009 Josef y col., 2013; Huijbers y col., 2014).

Tabla 9: Distribución de cepas productoras de BLEE según el sitio de aislamiento en cada instalación

Instalación porcina	Hisopado de animales	Operarios	Agua	Comederos y tetinas	Ambiente superficies	Instrumentos de trabajo	Total
Granja A	8	1	0	2	1	0	10/52
Granja B	0	0	0	0	0	0	0/52
Granja C	0	0	0	0	0	0	0/22
Matadero 1	1	1	0	0	1	2	5/40
Matadero 2	0	0	0	0	0	0	0/34
Total	9/52	2/28	0/12	2/44	2/53	2/11	17/200

Las bacterias contenidas en reservorios fónites, dispositivos de uso común o superficies ambientales, son subestimadas en su posible papel de patógenos, en cuanto a su capacidad de portar genes de resistencia y su capacidad de transmisión (Hota, 2004). Las enterobacterias requieren de humedad para su sobrevivencias en superficies inanimadas. Estas bacterias juegan un papel importante en la diseminación de la resistencia sobre todo porque muchas especies sobreviven por meses sobre superficies inanimadas (Kramer y col., 2006; Von Salviati y col., 2015) y porque las manos colonizadas del personal también pueden diseminar estas bacterias, luego del contacto con superficies contaminadas (Bhalla y col., 2004). Esto nos hace reflexionar sobre la importancia de conocer la epidemiología de estas bacterias para plantear estrategias encaminadas a disminuir y controlar su presencia. Las medidas de higiene y manejo son herramientas necesarias para establecer un equilibrio en las áreas donde se encuentran animales en cría intensiva, una apropiada limpieza y desinfección de las superficies y sobre todo el lavado de manos, después del contacto con reservorios potencialmente contaminados.

La posibilidad de que la cadena alimentaria sea un vehículo importante de transferencia de genes de resistencia al hombre ha sido planteada por distintos autores, en tal sentido se ha sugerido un origen alimentario a la presencia de cepas de *E. coli* portadoras de BLEE en la microbiota intestinal de humanos, y un posible origen animal a las cepas multirresistentes de *E. coli* implicadas en infecciones urinarias en clínica humana (Torres y col., 2004; Liao y col., 2015; Von Salviati y col., 2015). La presencia de β -lactamasas en las cepas analizadas enfatiza la necesidad de profundizar en las características moleculares relacionadas con este mecanismo de resistencia, confirmar su posible propagación mediante los ensayos de conjugación entre bacterias, determinar las secuencias de los genes CTX-M y poder establecer posibles orígenes, así como identificar la presencia de genes de virulencia, considerando su potencial riesgo para humanos.

Este trabajo evidenció la diseminación de cepas de *E.coli* BLEE+ en ámbitos no clínicos, existiendo reservorios de dichos microorganismos en la microbiota intestinal en los animales, que pueden ser un vehículo importante para su transferencia al hombre y a otros animales. Es necesario profundizar en el estudio de los factores que pueden estar contribuyendo a la diseminación global de *E.coli* BLEEs+, es posible que el uso de los antibióticos pueden estar propiciando este fenómeno lo que será clave para poder controlar este grave problema que tanta repercusión tiene en salud humana y animal.

Este es, en nuestro país, el primer estudio sobre resistencia en bacterias asociadas a la crianza porcina, esclarece aspectos que explican los posibles fracasos terapéuticos para el control de bacterias patógenas y revela la presencia de bacterias multirresistentes en la crianza porcina, que constituyen un riesgo en la cadena de elaboración de alimentos. Los datos presentados en este trabajo podrían servir de base junto a otros estudios, para promover el desarrollo de un programa de monitoreo de la resistencia bacteriana en medicina veterinaria. La información obtenida es de valor para orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar la diseminación de estas bacterias zoonóticas y su transmisión entre el hombre y los animales.

4.4. Conclusiones generales

1. Las cepas de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* que participan en el complejo respiratorio porcino fueron resistentes *in vitro* a tetraciclina y espectinomina y sensibles a antibióticos β -lactámicos y quinolonas, sin embargo expresaron otras formas de resistencia como la formación de biopelículas y de células persistentes que contribuyen a tolerar estos antibióticos, lo cual explica fracasos terapéuticos y las recidivas de las infecciones que ellas causan.
2. Las estrategias de uso combinado de agentes antimicrobianos *in vitro* demostraron resultados favorables en la destrucción de biopelículas de *S. suis*, con el uso de Penicilina y N-acetyl cisteína, y de las células persistentes de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* mediante la combinación gentamicina y arginina.
3. Se determinó por primera vez la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en cerdos sacrificados en matadero con destino al consumo humano. Se estableció la composición de los clones que conforman estas cepas y se comprobó la presencia del clon pandémico USA300-ST8.
4. El hallazgo de cepas de *E.coli* productoras de BLEE a partir de muestras de hisopados rectales, manos de operarios, superficies e instrumentos de trabajo, sugiere que estas instalaciones son reservorios de estas cepas y facilitan su diseminación desde el excremento de los cerdos al ambiente circundante.
5. Se detectaron mayoritariamente cepas de *E.coli* productoras de BLEEs del tipo CTX-M y en menor medida del tipo TEM, acorde a la situación epidemiológica actual para las enzimas BLEE.

Referencias

1. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard, third ed., vol. CLSI document M31–A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.2016.
2. Aarestrup FM, Duran CO, Burch DC. Antimicrobial resistance in swine production. Animal Health Reviews. 2008; 9(2):135-48.
3. Vilda Figueroa. El instituto de investigaciones porcinas, su aporte a la porcicultura cubana y los nuevos desafíos para el futuro Revista Computadorizada de Producción Porcina Vol: 1 No: 1 Septiembre 1994
4. Huaijie H, Wenjia H, Peng L, Qingyu L, Xiaotao Z, Hua J, Yanzi W, Xin Z, Yuling Z, Jianchun Land. 2013. Effect of licochalcone A on growth and properties of *Streptococcus suis*. PLoS One 8(7)..
5. Zhijie Liu, Han Zheng, Marcelo Gottschalk, Xuemei Ba, Ruiting Lan, Shaobo Ji, Haican Liu, Jianguo Xu. Development of Multiplex PCR Assays for the Identification of the 33 Serotypes of *Streptococcus suis* PLOS ONE 2013; 8(8).
6. 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.
7. Gang Zhou, Qing-Shan Shi, Xiao-Mo Huang and Xiao-Bao Xie The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents Int. J. Mol. Sci. 2015; 16:21711-21733

8. Bram Van den Bergh, Maarten Fauvart, Jan Michiels Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters FEMS Microbiol Rev.2017; 41 (3): 219-251.
9. Aslam S, B.W Trautner, V. Ramanathan and R.O. Darouiche. 2007. Combination of tigecycline and N-acetylcysteine reduces biofilm-embedded bacteria on vascular catheters. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51: 1556–1558
10. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* .2011; 473: 216 –220.
11. Grenier D., L. Grignon and M. Gottschalk. 2009. Characterisation of biofilm formation by a *Streptococcus suis* meningitis isolate. *Vet. J.* 179: 292–295.
12. Jörg Willenborg, Daniela Willms, Ralph Bertram, Ralph Goethe and Peter Valentin-Weigand Characterization of multi-drug tolerant persister cells in *Streptococcus suis* BMC Microbiology. 2014; 14:120.
13. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Curr Opin Microbiol* 2012;15:588–95.
14. 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.
15. 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.
16. Leiva Pelaez O, Stojanov M, Zayas Tamayo AM, Barreras Garcia G, Gonzalez Aleman M, Martinez Ceballos L, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 4 Cuban hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015;81:1–3.
17. Florence Crombé, M. Angeles Argudín, WannesVanderhaeghen, Katleen Hermans, Freddy Haesebrouck and Patrick Butaye. Transmission dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs *Frontiers in Microbiology Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy* 2013 Volume 4Article57.
18. Wettstein Rosenkranz K, Rothenanger E, Brodard I, Collaud A, Overesch G, Bigler B, et al. Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among Swiss veterinary health care providers: detection of livestock- and healthcare-associated clones. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2014;156:317–25.
19. Lili G., Yeke T., Xiaodan Z., Jiaqing H., Zengmin M., Liangmeng W., and Tongjie C. (2015). Emissions of *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum β -Lactamase Resistance from Pig Farm to the Surrounding Environment *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 4203-4213; doi: 10.3390/ijerph120404203
20. Escudero Jose Antonio, Alvaro San Millan, Ana Catalan, Adela G. de la Campa, Estefania Rivero, Gema Lopez, Lucas Dominguez, Miguel Angel Moreno and Bruno Gonzalez-Zorn First Characterization of Fluoroquinolone Resistance in *Streptococcus suis* *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, Feb. 2007, p. 777–782
21. Chunping Zhang, Zhongqiu Zhang, Li Song, Xuezheng Fan, Fang Wen, Shixin Xu and Yibao Ning Antimicrobial Resistance Profile and Genotypic Characteristics of *Streptococcus suis* Capsular Type 2 Isolated from Clinical Carrier Sows and

Diseased Pigs in China BioMed Research International Volume 2015, Article ID 284303, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/284303>

22. European Committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoints table for interpretation of MICs and zone diameters version 6.0.2016. <http://www.eucast.org>)
23. Marois, C.; Le Devendec, L.; Gottschalk, M.; Kobisch, M.. Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. Can J Vet Res. 2004 ; 71(1): 14–22.
24. Andrews JM. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother 48:5–16.
25. Mackay M.L., K. Milne and I.M. Gould. 2000. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 15(2): 125–129.
26. Staats JJ, Feder I, Okwumabua O, Chengappa MM. *Streptococcus suis*: past and present. Vet Res Commun. 1997;2:381-407.
27. Smith HE, Damman M, Van der Velde F, Wagenaar J, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, Smits MA. Identification and characterization of the cps locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. Infect Immun. 1999;67:1750-1756.
28. Townsend K, Boyce M, Chung JD, Chung AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. J Clin Microbiol. 2001;39:924-929.
29. Wei Z, Li R, Zhang A, He H, Hua Y, Xia J, *et al.* Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. Vet Microbiol. 2009;137(1-2):196-201.
30. Wisselink HJ, Veldman KT, Van Den Eede C, Salmon LSA, Mevius DJ. Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. Vet Microbiol 2006;113:73-82.
31. Fittipaldi N, Xu J, Lacouture S, Tharavichitkul P, Osaki M, Sekizaki T, *et al.* Lineage and virulence of *Streptococcus suis* serotype 2 isolates from North America. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2239-44.
32. Messier S, Lacouture S, Gottschalk M. Distribution of *Streptococcus suis* capsulartypes from 2001 to 2007. Can Vet J. 2008. 49(5):461-2.
33. Tang X, Zhanqin Z, Junyong H, Bin W, Xuwang C, Qigai H, Huanchun C. Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. J Clin Microbiol. 2009;47(4):951-958.
34. Huaijie H., H. Wenjia, L. Peng, L. Qingyu, Z. Xiaotao, J. Hua, W. Yanzi, Z. Xin, Z. Yuling, L. Jianchun and others. 2013. Effect of licochalcone A on growth and properties of *Streptococcus suis*. *PLoS One* 8(7): e67728.
35. Bonifait L., M. Gottschalk and D. Grenier. 2010. Cell surface characteristics of nontypeable isolates of *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 311(2): 160–166.
36. Merle E., H.C. Olson, W.M. Douglas, A.G. Buret and R. Ronald. 2012. Read biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Can. J. Vet. Res.* 66:86–92.

37. Hajdu S., A. Lassnigg, W. Graninger, A.M. Hirschl and E. Prestler. 2009. Effects of vancomycin, daptomycin, fosfomycin, tigecyclin and ceftriaxone on *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Orthop Res.* 27: 1361–1365
38. Marchese A., M. Bozzolasco, L. Gualco, E.A. Debbia, G.C. Schito and A.M. Schito. 2003. Effect of fosfomycin alone and in combination with N-acetylcysteine on *E. coli* biofilms. *Int. J. Antimicrob Agents.* 22: 95–100.
39. Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2004; 186(24):8172–8180.
40. Elie J, Van den Bergh MB, Verstraeten N, Michiels J. Molecular mechanisms and clinical implications of bacterial persistence. *Drug Resistance Updates.* 2016.
41. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. 2004. *Science* 305(5690):1622–1625.
42. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett.* 2004; 230:13–18.
43. Bassetti M, Merelli M, Temperoni Ch and Astilean A. New antibiotics for bad bugs: where are we?. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2013; 12:22.
44. Wiuff C, Zappala RM, Regoes RR, Garner KN, Baquero F, Levin BR. Phenotypic tolerance: antibiotic enrichment of noninherited resistance in bacterial populations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:1483–1494.
45. Hofsteenge N, Nimwegen V, Silander E. Quantitative analysis of persister fractions suggests different mechanisms of formation among environmental isolates of *E. coli*. *BMC Microbiol.* 2013; 13(25).
46. Barth VC, Rodriguez BÁ, Bonatto GD, Gallo SW, Pagnussatti VE, Ferreira CA, Oliveira S. Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2013; 8
47. Luidalepp H, Joers A, Kaldalu N, Tenson T. Age of inoculum strongly influences persister frequency and can mask effects of mutations implicated in altered persistence. *J Bacteriol.* 2011; 193(14): 3598–3605.
48. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 322:107–131.
49. Schuster CF, Bertram R. Toxin-antitoxin systems are ubiquitous and versatile modulators of prokaryotic cell fate. *FEMS Microbiol. Lett.* 2013; 340:73–85.
50. Dalebroux ZD, Swanson MS. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat. Rev. Microbiol.* 2012; 10:203–212.
51. Thomas K, Wood AB, Stephen J, Knabel C, Brian W. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy Applied and Environmental Microbiology. 2013; 79: 23: 7116–7121.
52. Van den Bergh B, Fauvar M, Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. *FEMS Microbiol Rev.* 2017; 41 (3): 219-251.
53. Gorwitz RJ. A review of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin and soft tissue infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2008; 27: 1-7.
54. Mediavilla JR, Chen L, Mathema B, Kreiswirth BN. Global epidemiology of community-associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) *Curr Opin Microbiol* 2012; 15:588–95.

55. Leiva Peláez O, Stojanov M, Zayas Tamayo AM, Barreras García G, González Aleman M, Martínez Ceballos L, *et al.* Molecular epidemiology methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from 4 Cuban hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 81:1–3.
56. Lewis HC, Mølbak K, Reese C, Aarestrup FM, Selchau M, Sørum M, *et al.* Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(9):1383–1389. [[PMC free article](#)][[PubMed](#)].
57. Arriola CS, Guere ME, Larsen J, Skov RL, Gilman RH, *et al.* Presence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Pigs in Peru. *PLoS ONE.* 2011; 6(12): e28529.
58. Osadebe L. U, Hanson B, Smith T. C. and Heimer R. Prevalence and Characteristics of *Staphylococcus aureus* in Connecticut Swine and Swine Farmers. *Zoonoses and PublicHealth.* 2012.
59. Cría de cerdos [internet] Ecured; 2017 [consultado 2017 Agosto 18]. Disponible en: https://www.ecured.cu/index.php?title=Cría_de_Cerdos&oldid=2266325
60. Wardyn S, Forshey B, Farina S, Kates A, Nair R, Quick M (*et al*) Swine farming is a risk factor for infection with and high prevalence of carriage of multidrug resistant *Staphylococcus aureus*. [internet] 2015 Julio [Consultado: 2015 Noviembre 4]; (64). Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org>.
61. Wettstein Rosenkranz K, Rothenanger E, Brodard I, Collaud A, Overesch G, Bigler B, *et al.* Nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among Swiss veterinary health care providers: detection of livestock- and healthcare-associated clones. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2014; 156:317–25.
62. Van Wamel WJ, Rooijackers SH, Ruyken M, van Kessel KP, van Strijp JA. The innate immune modulators staphylococcal complement inhibitor and chemotaxisinhibitory protein of *Staphylococcus aureus* are located on β -hemolysin-converting bacteriophages. *J Bacteriol* 2006; 188:1310–15.
63. Larsen AR, Goering R, Stegger M, Lindsay JA, Gould KA, Hinds J, *et al.* Two distinct clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) with the same USA300 pulsed-field gel electrophoresis profile: a potential pitfall for identification of USA300 community-associated MRSA. *J Clin Microbiol* 2009;47:3765–8.
64. Lina G, Piemont Y, Godail-Gamot F *et al.* Involvement of Pantón–Valentine leukocidin-producing *Staphylococcus aureus* in primary skin infections and pneumonia. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1128–32.
65. Diep B, Stone G, Basuino L., *et al.* The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2008; 197: 1523–30.
66. Kondo Y, Ito T, Ma X X., *etal.* Combination of multiplex PCRs for staphylococcal cassette chromosome mec type assignment: rapid identification system for mec, ccr, and major differences in junkyard regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 264–74.
67. Nimmo GR: USA300 abroad: global spread of a virulent strain of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007, 13: 222-225.
68. López-Pueyo MJ F, Gaite B, Amaya-Villar R y Garnacho-Montero J. Puesta al día en medicina intensiva: el enfermo crítico con infección grave

- Multirresistencia antibiótica en unidades de cuidados críticos. *Med Intensiva*. 2011; 35(1):41—53.
69. Nguyen TN, Nguyen V C, Thwaites G and Carrique-Mas J. Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review *Antibiotics*. 2016; 5(37).
 70. Gang Zhou, Qing-Shan Shi, Xiao-Mo Huang and Xiao-Bao Xie. The Three Bacterial Lines of Defense against Antimicrobial Agents *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16: 21711-21733.
 71. Lopatkin AJ, Tatyana A S and Lingchong Y. Dissecting the effects of antibiotics on horizontal gene transfer: Analysis suggests a critical role of selection dynamics *Bioessays* 38: 1283–1292, 2016 WILEY Periodicals, Inc.
 72. Frances M, Ellis R J and Raymond B. Ecological and genetic determinants of plasmid distribution in *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology*. 2016; 18(11): 4230–4239
 73. Madigan MT, Martinko JM., Dunlap PV and Clark DP. Brock: Biología de los microorganismos (12th ed.). Madrid (España): Pearson.<http://cienciaybiologia.com/microbiologia/familia-enterobacteriaceae>.2009
 74. Nguyen TN, Nguyen V C, Thwaites G and Carrique-Mas J. Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review *Antibiotics*. 2016; 5(37).
 75. Levy S, Fritz Gerald G and Macone A. Changes in intestinal flora of farm personnel after introduction of a tetracycline-supplemented feed on a farm. *N Engl J Med*. 1976; 295: 583-8.
 76. Chen G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L and Yua Z. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry? *Frontiers in Microbiology*. 2014; 5 (217).
 77. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*. 2008; 8: 159–166
 78. Verraes C , Van Boxtael S, Meervenne EV, Van Coillie E, Butaye P, Catry B, De Schaetzen M, Van Huffel X, Imberechts H, Dierick K, Daube G, Saegerman C, De Block J, Dewulf J and HermanL. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013; 10: 2643-2669
 79. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol*. 2007; 121:197-214.
 80. García ML, Hendriksen RS, Fraile L and Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2014; 170: 1–2.
 81. Bou AG, Chaves SF, Palomo OA, Iglesias OJ. Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes Nro. 55 de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica Recomendaciones de la Sociedad Española de Procedimientos en Microbiología Clínica. 2015; SEIMC.
 82. Villegas M, Guzman B, Sifuentes O, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). 2011. Brazil. *Braz J Infect Dis*; 15(1): 34-39.

83. Schmithausen RM, Schulze-Geisthoevel SV, Stemmer F, El-Jade M, Reif M, Hack S, et al. (2015) Analysis of Transmission of MRSA and ESBL among Pigs and Farm Personnel. PLoS ONE 10 (9): e0138173. doi:10.1371/journal.pone.0138173
84. Quiñones D, Valverde A, Rodríguez-Baños M, Kobayashi N, Zayaz A, Abreu M, Cantón R and RDel Campo R. High Clonal Diversity in a Non-Outbreak Situation of Clinical ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the First National Surveillance Program in Cuba. Microbial Drug Resistance. 2013.
85. OIE Código Sanitario para los Animales Terrestres .Capítulo 6.7.- Armonización de los programas nacionales de vigilancia y seguimiento de la resistencia a los agentes antimicrobianos. 2016.
86. Khan F, Rizvi M, Shukla I, Malik A. A novel approach for identification of members of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples. Biology and Medicine. 2011; 3 (2) Special Issue: 313-319.
87. Villegas M, Guzman B, Sifuentes O, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). 2011. Brazil. Braz J Infect Dis; 15(1): 34-39.
88. Briñas L. Caracterización genética de beta-lactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* de origen animal, humano y alimentario. Tesis Doctoral, Universidad de La Rioja. 2005.
89. Costa D, Poeta P, Sáenz Y, Vinué L, Rojo-Bezares B, Jouini A, et al. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum β -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. J Antimicrob Chemother.2006; 59:1311-2
90. InfoStat (2002). *InfoStat versión 1.1*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
91. García ML, Hendriksen RS, Fraile L and Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. Veterinary Microbiology. 2014(170); 1–9.
92. Calvo J, Cantón R, Fernández F, Beatriz M, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos.2011: ISBN-978-84-615-1530-1
93. Navarro F., Miró E., Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. 2010. Enferm Infecc Microbiol Clin.; 28(9): 638-645. Disponible en: <http://www.external.elsevier.es/espacioformacion/eimc/temas/m2t2.pdf> [Acceso: 24 de Marzo 2016].
94. Trupia LA, Mollerach A, di Conza JA Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2005: 23(9): 525-528.
95. Thomson KS. Controversies about extended-espectrum and AmpC beta-lactamases. Emerg. Infect. Dis. 2017: 333-336.
96. Bradford PA. (2001).Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev.14:933-951.
97. Jacoby G., Muñoz S. (2005). The new β -lactamases. N Engl J Med; 352:380-391.

98. Poirel L, Naas T, Thomas I, Karim A, Bingen E, Nordmann P. CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamase That Hydrolyzes Ceftazidime through a Single Amino Acid Substitution in the Omega Loop Antimicrobial agents and chemotherapy. 200; 45(12): 3355–3361.
99. Cano EM, Domínguez AM, Ezpeleta BC, Martínez ML, Padilla OB. Ramírez de Arellano E. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. Recomendaciones de la Sociedad Española de Procedimientos en Microbiología Clínica. 2007; (SEIMC). ISBN-978-84-611-9636-4.
100. Treviño M, Martínez-Lamas L, Romero-Jung P, Varón C, Moldes L, et al. Comparación entre las pruebas para la detección de betalactamasas de espectro extendido de los sistemas Vitek2 y Phoenix Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009.
101. Trupia LA, Mollerach A, di Conza JA. Comparación de tres métodos microbiológicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias aisladas en Santa Fe (Argentina). Enfermedades infecciosas y microbiología clínica. 2005; 23(9): 525-528.
102. Von Salviati C, Laube H, Guerra B, Roesler U, Anika Friese A. Emission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas. Veterinary Microbiology 175 (2015) 77–84
103. Liao X-P, Xia J, Yang L, Li L, Sun J, Liu Y-H and Jiang H-X. Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. Front. Microbiol. 2015; 6:1136. doi: 10.3389/fmicb.2015.01136
104. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48(1):1-14.
105. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ (2005). Mechanisms of Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent Developments. Inter. J Antimicrob Agents; 25(5):358-73.
106. Yang H, Chen S, While D, Zhao S, McDermantt P, Walker R, Merig J. Characterization of multiple- antimicrobial- resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chicken and swine in China. Journal of Clinical Microbiology; 2014; 42(8):3483-3489.
107. Livermore DM, and Woodford N. The beta-lactamase threat in enterobacteriaceae, pseudomonas and acinetobacter. Trends in Microbiology. 2006; 14(9): 413-420.
108. Torres C y Zarazaga M. BLEE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2007; 25 Supl. 2:29-37

V. Acreditación de los resultados

La **originalidad e impacto científico** de este trabajo están dados por la siguiente contribución al conocimiento:

3. Por primera vez en Cuba se determinan mecanismos de resistencia en especies de bacterias patógenas, zoonóticas y comensales asociadas a la crianza porcina, lo cual es una contribución local a las acciones globales para la contención de la RAM.
4. Se confirma el diagnóstico según estándares internacionales de dos especies patógenas para el cerdo *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis*.
5. Se identifican cepas de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* resistentes *in vitro* a tetraciclina y espectinomicina, y se revela que aún cuando son susceptibles a otros antibióticos como β -lactámicos y quinolonas, llegan a expresar otras formas de resistencia como la formación de biopelículas y de células persistentes que contribuyen a recidivas de las infecciones que ellas causan
6. Las estrategias de uso combinado de agentes antimicrobianos *in vitro* demostraron resultados favorables en la destrucción de biopelículas de *S.suis*, con el uso de Penicilina y N-acetyl cisteína, y de las células persistentes de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis* mediante la combinación gentamicina y arginina.
7. Se determina por primera vez la presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en cerdos sacrificados en matadero con destino al consumo humano. Se estableció la composición de los clones que conforman estas cepas y se comprobó la presencia del clon pandémico USA300-ST8.
8. Se evidencia la presencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (*E.coli* BLEE) en escenarios productivos porcinos localizados en Matanzas.
9. La información obtenida es de valor para orientar medidas de prevención y control dirigidas a evitar la diseminación de estas bacterias zoonóticas y su transmisión entre el hombre y los animales.

Publicaciones

1. MRSA USA 300, USA300-IV and ST5-IV in pigs Cuba. **International Journal of Antimicrobial Agent.**2017 Factor de impacto: **4.307**.
2. Antimicrobial activity of Penicillin G and N-Acetylcystein on planktonic and sessile cells of *Streptococcus suis*. **Polish Journal of Microbiology**, 2016, vol. 65, no 1, 105–109. Factor de impacto: **0,993**.
3. Actualización en el diagnóstico laboratorial de *Pasteurella multocida* y *Streptococcus suis*. **Albeitar** **192**. www.albeitar.grupoasis.com/bibliografias/diagnosticolaboratorial192.doc
4. Serotyping of porcine *Streptococcus suis* recovered from diseased pigs in the western region of Cuba. *Rev. Salud Anim.* vol. 36 no. 3 (2014): 196-200 short.
5. Molecular typing of *Streptococcus suis* from pigs in Cuba. **Biotechnología Aplicada**, 2013; vol.30, no.1.

6. Antimicrobial resistance and genes associated to the host-microbe interaction of *Pasteurella multocida* isolates from swine in western Cuba. **Rev. Salud Anim.** vol. 34 no. 3 (2012).
7. Estudio de la sensibilidad *in vitro* frente a diferentes antimicrobianos en cepas de *S. suis* asociados a neumonía porcina **Rev. Salud Anim.** vol. 34 no. 1 (2012): 57-62.
8. Evaluation of simplified DNA extraction methods for *Streptococcus suis* typing. **Rev. Salud Anim.** vol. 35 no. 1 (2013): 59-63.
9. Detección de resistencia transitoria en cepas de *Streptococcus suis* y *Pasteurella multocida* **Rev. Salud Anim.** 2017 Vol. 39, No. 2
10. Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) en enterobacterias aisladas de instalaciones porcinas en la provincia de Matanzas, Cuba. **Rev. Salud Anim.** 2017 Aceptada

Eventos:

- **MEDLAB 2016, Berna Suiza.**

MRSA CLONE USA 300 IN PIGS FROM CUBA. M BAEZ¹, A COLLAUD¹, I ESPINOSA², V PERRETE¹.¹Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty, University of Bern Länggass-Strasse 122, CH-3012 Bern, Switzerland, ²National Centre for Animal and Plant Health (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, PC 32700, Cuba.

- **Porcinocultura, 2017, Cuba**

MRSA USA300, USA300-LV and ST5 in pigs from Cuba. M Baez^{1,2}, A Collaud¹, I Espinosa², V Perreten¹. ¹National Centre for Animal and Plant Health (CENSA), San José de las Lajas, Mayabeque, PC 32700, Cuba. ²Institute of Veterinary Bacteriology, Vetsuisse Faculty, University of Bern Länggass-Strasse 122, CH-3012 Bern, Switzerland.

- **IV *Neisseria* Vaccines 2013 I Workshop on Meningitis and Septicaemia**
Knowledge on the epidemiology of the *Streptococcus suis* swine infection in Cuba. Ivette Espinosa, Michel Áreas, María Irian Percedol, Evelyn Lobol, Siomara Martínez, Marcelo Gottschalk

Tesis de grado: Formación de células persistentes por aislados de *Streptococcus suis* de origen porcino y estrategias para su erradicación *in vitro*. Facultad de Biología, universidad de la Habana, curso 2016-2017.