

Universidad Nacional

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Escuela de Ciencias Biológicas

Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología

Informe Escrito Final

**Aislamiento, identificación y determinación de bacterias procedentes de
alimentos para consumo humano asociadas con resistencia antibiótica
mediante el uso de marcadores moleculares**

**Tesis de grado presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciatura en Biología con Énfasis en Biotecnología**

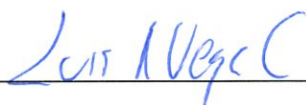
Esleyder Lobo Fernández

**Campus Omar Dengo
Heredia, 2023**

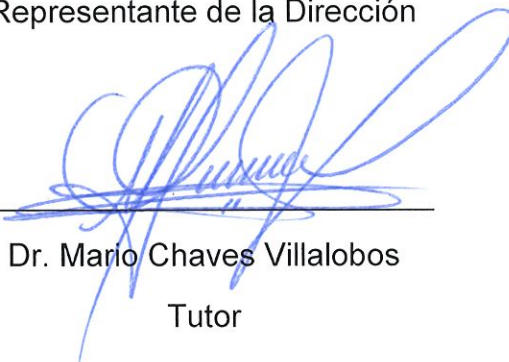
Este trabajo de graduación fue Aprobada por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biotecnología.



Licda. Carolina Marín Vindas
Representante, Decano, quién preside



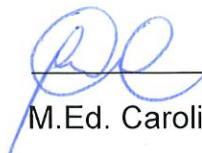
M.Sc. Luis Vega Corrales
Representante de la Dirección



Dr. Mario Chaves Villalobos
Tutor



MPM. Abad Rodríguez Rodríguez
Asesor



M.Ed. Carolina Sancho Blanco
Asesora

Resumen

La resistencia a antibióticos es un problema cada día más común, no solo en hospitales, sino incluso en los alimentos para consumo humano. En este trabajo los objetivos fueron: (1) Aislar bacterias patógenas en diferentes tipos de alimentos para consumo humano mediante procedimientos convencionales de laboratorio, (2) Identificar las bacterias patógenas obtenidas, mediante métodos complementarios de análisis morfológico típico y una prueba bioquímica automatizada y (3) Detectar marcadores moleculares de resistencia a los antibióticos Tetraciclina y Ampicilina en las bacterias patógenas mediante el uso de la técnica de PCR tiempo final. Para ello, se aislaron 40 bacterias de matrices de alimentos y de distintos sitios de procedencia. Se identificaron a través del Vitek II System: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus cecorum* y *Listeria welshimeri*. Una vez aisladas, se realizó, en primera instancia, la prueba PCR con cebador universal 16S en muestras y control, donde una vez amplificado, se realizó la PCR con los marcadores moleculares de resistencia a los antibióticos Ampicilina y Tetraciclina, siendo los cebadores TEM, TetA, TetB y TetC en donde hubo amplificación conforme del control y de algunas muestras, mientras que, no se obtuvieron resultados conformes en OXA, SHV y TetD. Esta amplificación del gen de resistencia en muestras de alimentos confirma que en estas matrices se pueden aislar bacterias resistentes a los antibióticos, lo cual forma parte de una problemática a nivel mundial, debido a la gran diversidad de mecanismos que utilizan para generar la resistencia y el daño que causan en la salud humana, principalmente. Mayores estudios pueden contribuir a detectar resistencia a otros antibióticos y a establecer mayores controles por parte de las industrias, agricultores, supermercados, mataderos, entre otros.

Agradecimiento

A mi familia cercana, en especial a mis padres por todo lo brindado cada día de mi vida para ayudar a formar quién soy ahora. A mi pareja que nunca ha dejado de impulsarme para llegar a este momento y ha sido vital en este proceso. A mis amigos que me han apoyado en todo momento. A mi tutor por el esfuerzo realizado para poder llegar a completar esta investigación. A la Universidad Nacional, que, a través de sus profesores de mucha calidad y conocimiento, me han formado y ayudado a ser un excelente profesional de mi área. A

Dios porque sé que me bendice de muchas maneras a pesar de tantas dificultades.

Finalmente, mención y agradecimiento enorme y muy especial para mis asesores Abad Rodríguez y Carolina Sancho, quienes han dedicado tiempo y esfuerzo para llegar a este momento tan importante y quienes me han brindado toda su ayuda, conocimiento y experiencia para que esto sea posible. Gracias de corazón a toda aquella persona que de una u otra manera haya formado parte de este logro.

Dedicatoria

Esta tesis de licenciatura está dedicada a:

A mis padres Isaac Lobo Arias y Wiatt Marielly Fernández Castro, quienes son los pilares en mi vida y me han hecho llegar a este momento con todo su esfuerzo, tanto económico como con los valores que me han inculcado para luchar siempre por mis metas y por ser parte de la persona que soy hoy. Ellos merecen todos y cada uno de los logros que tenga en la vida, porque son las personas que han dado absolutamente todo por verme ser el profesional que soy.

Índice

Miembros del Tribunal	I
Resumen.....	II
Agradecimiento.....	III
Dedicatoria	IV
Índice.....	V
Índice de cuadros	VI
Índice de figuras	VII
Índice de Anexos	VIII
Abreviaturas o acrónimos.....	IX
1. Introducción	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Justificación	5
1.3. Planteamiento del problema a investigar	6
1.4. Objetivos	7
1.4.1. Objetivo general	7
1.4.2. Objetivos específicos	7
2. Marco Teórico.....	7
3. Marco Metodológico.....	18
4. Resultados.....	24
5. Discusión	38
6. Conclusiones	46
7. Recomendaciones	47
8. Referencias	48
9. Anexos	63

Índice de cuadros

Cuadro 1	37
----------------	----

Índice de figuras

Figura 1.....	255
Figura 2.....	255
Figura 3.....	266
Figura 4.....	277
Figura 5.....	298
Figura 6.....	299
Figura 7.....	30
Figura 8.....	311
Figura 9.....	322
Figura 10.....	344
Figura 11.....	355
Figura 12.....	366

Índice de Anexos

Anexo 1.	63
Anexo 2.	64
Anexo 3.	65
Anexo 4.	66
Anexo 5.	67

Abreviaturas o acrónimos

UNA	Universidad Nacional de Costa Rica
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
TBE	Tris, borato y EDTA
MPM	Marcador de peso molecular
CCSS	Caja Costarricense del Seguro Social
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal
AyA	Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados
INS	Instituto Nacional de Seguros
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
INCIENSA	Instituto Nacional de Investigaciones en Nutrición y Salud
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control
BLEE	Beta-lactamasas de espectro extendido
RFLP	Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción
VNTRs	Número variable de repeticiones en tándem
MAAP	Iniciadores de PCR múltiples arbitrarios
ISSR	Intersecuencias simples repetidas
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

1. Introducción

Alimentos de consumo humano, como frutas, hortalizas, vegetales y carnes mal manipulados son fuentes para el crecimiento y desarrollo de una gran diversidad de bacterias, entre ellas las conocidas como patógenas, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas* spp., entre otras (López, León, Jiménez, & Chaidez, 2009). Esa gran variedad de microorganismos patógenos en los alimentos, son capaces de provocar una afectación en la salud humana (López, León, Jiménez, & Chaidez, 2009). Esto genera que, en muchas ocasiones, las personas se automediquen o reciban un tratamiento con antibióticos y fármacos, el cual no finalizan (Vanegas et al., 2009). Además, es común que tanto en la producción animal como vegetal, se recurra al uso indiscriminado de antibióticos para mejorar el rendimiento en la producción, lo cual provoca que muchas de las bacterias mencionadas, sean expuestas innecesariamente a ellos y puedan generar una resistencia antimicrobiana, siendo esto, una de las mayores problemáticas en el área de la medicina (Vanegas et al., 2009).

1.1. Antecedentes

Con el auge de los antibióticos a mediados del siglo XX, estos comienzan a tener un uso a nivel clínico y terapéutico de una manera indiscriminada. Su uso continuado de forma incorrecta comienza a generar un incremento en la resistencia de los microorganismos (Oliveira et al., 2006; Puig, Espino, & Leyva, 2011). Los antibióticos son usados en el tratamiento de animales enfermos, sin embargo, también pueden ser empleados como promotores del crecimiento en cerdos y aves de corral, sin ningún tipo de control. Es por ello que a finales de la década de los 60's surgen las primeras regulaciones en cuanto al uso indiscriminado de los antibióticos, ya que es cuando se conoce la transferencia horizontal de genes de resistencia desde el ambiente al humano (Puig et al., 2011).

La transferencia horizontal de genes ha sido comprobada en numerosos estudios, al presentar altas homologías genéticas en enzimas que se encuentran en enterobacterias tanto de humanos como de animales (Angulo, Nunnery, & Bair, 2004).

Además, se ha determinado que la diseminación y transferencia de los genes de resistencia a antibióticos a través de distintos géneros y especies de bacterias ocurre por medio de los alimentos contaminados. Por ejemplo, *Salmonella* spp. ha sido aislada en distintos alimentos para consumo humano (principalmente de cerdos y aves de granja), que generan brotes de salmonelosis en los pacientes de hospitales que han consumido estos alimentos y donde dicho microorganismo resistente ha sido encontrado (Rodríguez et al., 2007).

Lo anterior es de gran importancia, ya que se han presentado datos realmente preocupantes de hasta un 100% de resistencia en algunos de los antibióticos más comúnmente usados, como lo son la tetraciclina, ampicilina, doxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, sulfas, sulfametoxazol/trimetoprima y ceftazidima, donde la resistencia a varios de estos hace que se genere una multirresistencia, como ocurre con las cepas derivadas de la *Salmonella* (como *S. typhimurium* y *S. enteritidis*) (Malik, Olsen, Kumar, & Goyal, 2003; Chen et al., 2004; Gebreyes, Thakur, Davies, Funk, & Altier, 2004; Cabrera et al., 2006; Puig Peña et al., 2011).

El mismo caso ocurre con *E. coli*, microorganismo de la biota de intestinos humanos y animales de sangre caliente y que en estudios han encontrado que puede ser capaz de generar diversos patrones de resistencia a antimicrobianos como la ampicilina, sulfametoxazol/trimetoprima, ciprofloxacina, tetraciclina, estreptomicina, rifampicina y oxitetraciclina, luego de que fueron usados como aditivos para la promoción de crecimiento en animales y el combate a enfermedades (Bergman, Nyberg, Huovinen, Paakkari, & Hakanen, 2009; Tabatabaei & Nasirian, 2003; Zahraei Salehi & Farashi Bonab, 2006).

Un mecanismo de adquisición de resistencia, según investigaciones realizadas, es mediante las mutaciones genéticas en bacterias deficientes en el sistema de reparación de ADN (llamadas hipermutadoras) (Alós, 2015), como ocurre en *Salmonella* spp., en la cual se comprobó este fenómeno en el gen *gyrA* de la enzima ADN girasa, mientras que para *E. coli*, se pudo ver en la región del promotor *AmpC* (Kieun et al., 2008; Kojima et al., 2005). Además, otro mecanismo de adquisición de resistencia que se ha podido encontrar, es en una investigación donde se obtuvieron resultados positivos para la composición de los lipopolisacáridos y su enlace con ciertos iones, lo cual permite que haya una modificación de la membrana y se genere una resistencia intrínseca a ciertos antimicrobianos. También, como parte de más mecanismos de resistencia, algunos microorganismos como *P. aeruginosa* y *E. coli* han adquirido plásmidos o transposones que contienen genes de resistencia de otras

bacterias, los cuales activan bombas de expulsión activa (eflujo) para eliminar componentes antibióticos (Cabrera, Gómez, & Zúñiga, 2007).

Por otra parte, se han identificado bacterias con resistencia mediada por plásmidos en pacientes de hospitales, los cuales eran procedentes de sitios en donde había granjas de crecimiento de cerdos, en los cuales utilizaban estreptomicina, “nourseothricin” y “apramycin”. Posterior al consumo de los cerdos, que contenían genes de resistencia a dichos antimicrobianos, estos también fueron encontrados de manera posterior, en la microbiota del ser humano (Maynard et al., 2004).

Desde el año 1984, se ha reportado en todo el mundo, la producción de enzimas β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) por parte de algunas bacterias patógenas, principalmente registradas en *Salmonella* spp., y enterobacterias como *E. coli*, transferidas como ya se ha mencionado, por el consumo de alimentos contaminados (García, Astocondor, & Banda, 2012). La producción se da porque los genes que codifican dichas enzimas (como la CTX-M, TEM y SHV) suelen encontrarse en un mismo plásmido con otros genes de resistencia. Esto ha generado un gran problema, debido a la baja efectividad al hidrolizar componentes antibióticos como las cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos y quinolonas (Torres & Zarazaga, 2007; García, Astocondor, & Banda, 2012; Colquechagua, Sevilla, & Gonzales, 2015; Marrero-Moreno et al., 2017).

La identificación de bacterias con genes de resistencia en alimentos para consumo humano, requiere el uso de técnicas que permitan su detección rápida y eficaz, es por esto que una de las técnicas más utilizadas son los marcadores moleculares específicos de resistencia antimicrobiana, los cuales, mediante la PCR en tiempo real permitan identificar, cuantificar, vigilar y controlar aquellos microorganismos más susceptibles para así prevenir las enfermedades producidas por estos (Rojas-Herrera & González-Flores, 2006). Gracias a la sensibilidad, efectividad y a su valiosa respuesta cuantitativa, la técnica es empleada en numerosos estudios, como el de Walsh et al., (2011), quienes utilizaron diversos iniciadores o cebadores para poder localizar genes de resistencia de interés en agricultura, obteniendo resultados rentables y confiables gracias a la cuantificación simultánea de genes de resistencia a antibióticos en matrices de muestras ambientales complejas. De la misma manera, Ushida et al., (2010) y Schwartz, Kohnen, Jansen, y Obst, (2003), detalladamente explican y dan crédito a la importancia de este método, obteniendo resultados fiables y

relevantes, tanto en análisis de hielo, aguas residuales y agua potable en diversos tipos de bacterias.

Al ser un problema de índole global, en países como Costa Rica y en general en América Central y el Caribe, estudios de la División de Infraestructura Rural y Agroindustrias de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, indican que no hay una gran diferencia con respecto a otros países en vías de desarrollo o desarrollados, donde las infecciones por el consumo de alimentos contaminados con las bacterias patógenas ya mencionadas ocurre muy a menudo, generando infecciones y enfermedades comunes gastrointestinales, pero también graves, llevando incluso hasta la muerte (Kopper, Calderón, Schneider, Domínguez, & Gutiérrez, 2009).

En Costa Rica, un estudio realizado entre los años 1995 y 1999 en el Hospital San Juan de Dios, demuestra que diversos microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterobacter cloacae* y *Klebsiella pneumoniae*, presentaron nula, leve, intermedia y alta resistencia a los principales antibióticos penicilina G, ampicilina, cefalexina, cefalotina, sulfa-trimetoprin, eritromicina, tetraciclina, oxacilina, metronidazol, clindamicina, ciprofloxacina, cefotaxima, ceftazidima, vancomicina e imipenem utilizados por la Caja Costarricense de Seguro Social (CCSS) y por especialistas (Boza-Cordero & Barrantes-Valverde, 2001). Recientemente, otros estudios en el país indican aislamientos de bacterias patógenas con alta resistencia a diversos antibióticos, junto a biocidas y metales pesados (Barrantes et al., 2014; Chacón-Jiménez & Rojas-Jiménez, 2020).

Una limitante en el estudio de la resistencia a antibióticos en Costa Rica es el escaso registro de datos sobre las enfermedades de transmisión alimentaria, y por tanto, estos no reflejan la realidad nacional; sin embargo, diversas investigaciones realizadas demuestran la gran variedad de alimentos que pueden ser vehículo de transmisión de muchas enfermedades junto a patógenos que también presentaban los genes de resistencia, como en el caso de *Salmonella* spp., aisladas de alimentos de origen animal (porcino, aviar, bovino) y vegetal (pimienta en grano importada) (Bolaños et al., 2014; SENASA, 2017). Es por eso que se han tratado de implementar políticas y estrategias de seguridad, vigilancia, prevención y control en este tema, mediante el Plan Nacional de Salud para Costa Rica 2010-2021; no solo por la

gran importancia en el área de la salud pública, sino porque tiene alta relevancia en el tema socioeconómico de cualquier país (Kopper et al., 2009; Ministerio de Salud, 2011).

A nivel mundial, las muertes por cepas patógenas resistentes a los antibióticos fueron de 7.7 millones de personas en el año 2019, correspondiente al 13.6% de todas las muertes globales y el 56.2% de todas las muertes relacionadas con septicemias de este mismo año, estando entre esa lista de patógenos, bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Gail, 2022). Además, se estima que podría aumentarse a 10 millones de muertes en los próximos años y dejar pérdidas económicas que superen los 100 billones de dólares para el año 2050 (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2021). También, la Organización Mundial de la Salud, indicó que en el año 2019, de los 32 antibióticos que estaban en fase clínica, solamente 6 eran considerados innovadores, lo cual fue dictaminado como un problema de escasez de antimicrobianos eficaces, encontrando además, que cepas resistentes de *Escherichia coli*, presentaban una resistencia entre el 8.4% y el 92.9% para antibióticos, y donde otras cepas como *Staphylococcus aureus*, aquellos pacientes enfermos con esta cepa resistente, tienen una probabilidad 64% mayor de morir que pacientes con otras infecciones, lo cual son considerados datos preocupantes (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021).

1.2. Justificación

Los antibióticos son utilizados para prevenir o tratar las infecciones bacterianas, sin embargo, el desarrollo de resistencia a estos fármacos ha aumentado por distintas razones, como lo son, la exposición prolongada y sucesiva a éstos, el tratamiento inadecuado, el uso indebido en las distintas industrias como fábricas o criaderos de animales con el fin de mejorar el rendimiento del producto y, por último, las deficiencias en cuanto a la prevención y control de infecciones (Cota-Rubio, Hurtado-Ayala, Pérez-Morales, & Alcántara-Jurado, 2014). Todo lo mencionado ha provocado que las bacterias muten en respuesta a esos fármacos, por presión selectiva, causando la aparición de bacterias fármaco-resistentes que generan infecciones difíciles de tratar (Cota-Rubio, Hurtado-Ayala, Pérez-Morales, & Alcántara-Jurado, 2014), generando incremento en los costos médicos, las instancias hospitalarias y la tasa de mortalidad (Quizhpe et al., 2014).

Por lo tanto, el identificar bacterias resistentes, así como los tipos de antibióticos que ya no son efectivos, permite tener una visión de la problemática y su alcance a nivel nacional y mundial para futuros tratamientos y cambios en el método de uso de estos medicamentos, así como el fortalecimiento en las medidas de higiene en las diferentes industrias, específicamente, las productoras de alimentos para consumo humano (Alós, 2015).

Es de suma importancia la realización de investigaciones para comprender cómo funcionan no solo los mecanismos de resistencia en cada microorganismo (Tafur & Villegas, 2008), sino también la posibilidad de rastrear el origen de la exposición, para poder tomar las medidas correctivas adecuadas (Cabrera et al., 2007).

Por ello, cuando se obtiene un microorganismo aislado que proviene de cualquier muestra de alimento o de pacientes de hospitales, y se determina que presenta resistencia a antibióticos utilizados comúnmente para el tratamiento de infecciones, se tiene que rastrear el lugar de procedencia, así como toda su línea de producción y manufactura (Embid, 2002). Esto es importante para conocer donde se puede estar dando una exposición al fármaco de manera no controlada o accidental, y así tomar medidas correctivas que eviten la generación de más bacterias resistentes o multirresistentes, además de prevenir su distribución a un mayor rango poblacional o geográfico (Embid, 2002).

De acuerdo con lo anterior, las bacterias patógenas son la principal causa de enfermedades por consumo de alimentos, las cuales pueden afectar seriamente la salud humana, siendo capaces de generar consecuencias fatales. Por lo anterior, el identificar y caracterizar cuáles bacterias son las más comunes o las causantes de problemas sanitarios en la manipulación de los alimentos es de gran importancia a nivel médico, socioeconómico y sanitario, no solo para los productores sino también para los consumidores (Rojas-Herrera & González-Flores, 2006), en especial aquellas bacterias provenientes de alimentos para consumo humano que presentan resistencia y multirresistencia a diversos antibióticos.

1.3. Planteamiento del problema a investigar

Debido a la actual problemática en el área de la medicina, industria alimenticia y animal por el uso indiscriminado de antibióticos, surge la pregunta: ¿Presentan las bacterias aisladas

de alimentos para consumo humano, marcadores moleculares de resistencia a los principales antibióticos?

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar las bacterias patógenas provenientes de alimentos para consumo humano que presentan resistencia a los antibióticos Tetraciclina y Ampicilina, mediante el uso de marcadores moleculares, como contribución al manejo de esta problemática de salud pública.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Aislar bacterias patógenas en diferentes tipos de alimentos para consumo humano mediante procedimientos convencionales de laboratorio.
2. Identificar las bacterias patógenas obtenidas, mediante métodos complementarios de análisis morfológico típico y una prueba bioquímica automatizada.
3. Detectar marcadores moleculares de resistencia a los antibióticos Tetraciclina y Ampicilina en las bacterias patógenas mediante el uso de la técnica de PCR tiempo final, como aporte al conocimiento de esta problemática de salud pública nacional.

2. Marco Teórico

Los denominados “alimentos para consumo humano” son aquellos que, de una u otra forma en su procesamiento, van a terminar siendo ingeridos por el ser humano, tales como carnes, productos pesqueros, hortalizas, frutas, lácteos crudos o procesados, azúcar, sal,

harinas, almidón, especias, conservantes, entre otros. Debido a su naturaleza, muchos productos deben ser conservados a corto o largo plazo, dependiendo de su período de consumo (Kopper et al., 2009). Todos los alimentos deben tener un mantenimiento de temperatura adecuada y acorde al producto, ya que eso va a permitir la prevención de contaminaciones bacterianas o al menos, la multiplicación de estas (Fernández Escudero, 2015; Kopper et al., 2009).

A nivel internacional existen diversas normativas que rigen elementos importantes en cuanto a la producción y manipulación que garantizan la inocuidad de los alimentos tal es el caso del “Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control” (APPCC), lo cual favorece a todos los sectores que necesitan ofrecer y tener productos de venta de la mejor calidad (Kopper et al., 2009)

Sin embargo, a pesar de todas las indicaciones y recomendaciones que existen para la correcta manipulación, preparación, procesamiento, almacenamiento, mantenimiento, transporte, distribución y exposición de los alimentos para consumo humano, estos llegan a contaminarse y generar problemas de salud en quien lo consume (Campuzano, Mejía, Madero, & Pabón, 2015; Kopper et al., 2009).

Es por ello que es importante darle la trazabilidad adecuada al problema, ya que con esto es que generalmente se termina llegando a la causa raíz, la cual es habitual que sea por el manejo incorrecto que se le da a los alimentos a nivel de las industrias productoras, aunque en algunos casos, ocurre en lugares de venta públicos, como restaurantes y comidas ofrecidas en la calle (Campuzano et al., 2015; Kopper et al., 2009).

Bacterias patógenas

Las bacterias patógenas son aquellos microorganismos que, por diferentes mecanismos de acción, llegan a causar una afectación directa o indirecta en el organismo humano, ya sea por la ingesta de algún alimento contaminado con un inóculo superior al umbral necesario y suficiente para causar una sintomatología clínica, o por alguna infección (Fernández, 2015).

Existen diferentes microorganismos capaces de causar lo anteriormente mencionado, como lo son las bacterias, entre las cuales encontramos a los dos grandes grupos: las bacterias Gram negativas y las Gram positivas, siendo ejemplos importantes del primer grupo *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., mientras que algunos ejemplos relevantes del segundo grupo son *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, entre otras (Soto, Pérez, & Estrada, 2016).

La bacteria *E. coli* es anaerobia facultativa que se moviliza por flagelos y habita en los intestinos de los animales de sangre caliente; es por eso por lo que es un indicador de contaminación por patógenos en alimentos como cárnicos, lácteos, pescados, mariscos, verduras y leguminosas, ya que se encuentra en gran cantidad en las heces de los humanos y también de los animales (Soto et al., 2016).

A pesar de que su hábitat natural es el intestino, existen varias cepas patogénicas de esta bacteria, como los representantes de la *E.coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* enteroagregativa, las cuales, pueden causar daño por sus diferentes propiedades de virulencia, serotipos O:H (tal es el caso de *E. coli* O157:H7), epidemiología y otro tipo de enfermedades, al producir toxinas como la shiga que provocan cuadros de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Puig et al., 2011; Schell, 2011; Soto et al., 2016).

La bacteria *E. coli* es también responsable de las infecciones más comunes del tracto urinario y la bacteriemia, de la meningitis neonatal e infecciones como la neumonía. Además, es uno de los principales representantes de la microbiota del intestino humano y animal, por lo que es muy usado como indicador de calidad en la seguridad alimentaria (Liebana et al., 2013; Puig et al., 2011).

Una bacteria patógena del grupo de las Gram positivas es la *L. monocytogenes*, la cual corresponde a un bacilo facultativo intracelular y que no forma esporas, capaz de sobrevivir en medios extremos, como bajos pH (hasta 4.4), baja actividad de agua y altas concentraciones de sal (hasta 14%), mientras que crece en un rango diverso de temperatura (1 a 45 °C), por lo cual, los alimentos que están en refrigeración son un hábitat ideal para este microorganismo (Schell, 2011; Soto et al., 2016). Además, *L. monocytogenes* es capaz de persistir y colonizar incluso por años las plantas de procesamiento de lácteos, productos

cárnicos y pesqueros, ya que forma biopelículas que se adhieren a una zona y los desinfectantes no son capaces de eliminar, lo cual genera que dichos alimentos se contaminen, sean consumidos y generen daños en la salud de las personas, tal como la listeriosis, que puede generar desde diarrea y fiebre, hasta abortos y septicemia o meningitis en recién nacidos con alta tasa de mortalidad, ya que tienen la capacidad de invadir fagocitos y a partir del hígado o bazo, pasar a zonas como la sangre y sistema nervioso central (Schell, 2011; Soto et al., 2016).

Otra de las más relevantes bacterias patógenas, como ya se mencionó anteriormente, es la *Salmonella* spp. (siendo *Salmonella* serotipos *Typhimurium* y *Enteritidis* de las más relevantes a nivel clínico), la cual es responsable de algunas enfermedades como la salmonelosis, que es una de las infecciones que más afectan al ser humano, formando parte de los brotes de toxoinfección alimentaria en el mundo, además de brotes por gastroenteritis (Puig et al., 2011; Schell, 2011; Soto et al., 2016). Esta bacteria puede resistir pH tan bajos como los del estómago, las sales biliares y el peristaltismo, ubicándose en el intestino delgado y generando una infección localizada en zonas como los ganglios linfáticos mesentéricos, evadiendo las defensas de organismo y transportándose por la sangre a otros sitios como el hígado, bazo y médula ósea para causar infecciones sistémicas (Schell, 2011; Soto et al., 2016). Como esta es una bacteria de difícil transmisión entre personas, es común asociarla a los alimentos como principal fuente de exposición, por lo que es posible encontrarla en huevos, productos avícolas mal preparados o contaminados, carne de cerdo y productos lácteos, pero también puede asociarse al consumo de agua contaminada o por contacto fecal-oral (Puig et al., 2011; Schell, 2011; Soto et al., 2016).

Por último, se encuentra la bacteria patógena *S. aureus*, la cual tiene una gran capacidad de colonización de piel y mucosa de humanos y animales, además de ser uno de los más importantes patógenos en cuanto a intoxicaciones alimentarias en diversos países, esto por las enterotoxinas estafilocócicas responsables de muchos de los brotes; también es un frecuente portador de genes de resistencia que comprometen por completo el tratamiento con los antimicrobianos, los cuales se mencionan más adelante (Hanson et al., 2011; Lozano et al., 2011).

Resistencia a antibióticos

A partir de la década del año 1950, con el auge de los antibióticos en todo el mundo, el uso de estos ha ido creciendo gradualmente en la salud humana y animal, además de la producción ganadera e industrial de alimentos (Balsalobre & Hernández-Godoy, 2004; Kinch, Haynesworth, Kinch, & Hoyer, 2014).

Lo anterior ha causado un aumento continuo de los casos de especies microbianas que por diferentes vías, en especial la cadena alimenticia, desarrollen mecanismos de evasión o formas de resistencia contra múltiples antibióticos, es decir, haya una ausencia de respuesta clínica, lo cual, aparte de ser peligroso para la salud por su consumo, es una gran problemática mundial a nivel clínico, ya que dificulta la terapia antibiótica contra las enfermedades, incrementa índices de morbilidad y mortalidad, prolonga la enfermedad, aumenta en gran magnitud los costos sanitarios y existe la posibilidad de que haya un incremento en la difusión a gran escala de los genes de la resistencia, esto debido al fracaso y el nulo efecto en el tratamiento, además de que las enfermedades causadas por cepas bacterianas resistentes, suelen ser más fuertes al comparar con las enfermedades generadas por cepas sensibles a los antibióticos (Kinch et al., 2014; Puig et al., 2011).

En muchas ocasiones, los antimicrobianos tienen que ser combinados o usados en un amplio espectro para poder lidiar con infecciones muy graves. Sin embargo, esto conlleva serias consecuencias negativas en el organismo, especialmente en el sistema gastrointestinal; al este albergar microbiota natural con funciones de importancia, tal como el metabolismo de azúcares. Este sistema, puede sufrir fuertes alteraciones en sus funciones al disminuir bacterias importantes en el metabolismo, lo cual facilita la aparición y multiplicación de organismos resistentes como *Clostridium difficile*, causando enfermedades como diarrea, daño del intestino grueso y colitis pseudomembranosa, además de otra gran gama de afectaciones, como puede ser las deficiencias polivitamínicas, dolores abdominales, irregularidad intestinal, flatulencia, una absorción incorrecta y depresión en las respuestas inmunitarias, junto a la posibilidad de contraer fuertes infecciones (Puig et al., 2011).

Antibióticos a los que las bacterias generan resistencia y su mecanismo

Las bacterias generan resistencia debido al uso indiscriminado de antibióticos en animales y humanos, el intercambio de elementos extracromosomales, transferencia horizontal de genes, elementos móviles del ADN, plásmidos con genes de resistencia, transducción utilizando virus o mecanismos bioquímicos de la célula, entre otros, que se detallan a continuación.

Los antibióticos destinados a tratamientos de infecciones en humanos son usados con motivos terapéuticos, profilácticos y como promotores del crecimiento, desarrollo y engorde en animales como cerdos y aves de corral en etapa juvenil. Por ejemplo, la tetraciclina y otros antimicrobianos como la penicilina, clindamicina, ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas, quinolonas, eritromicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico y cloranfenicol, son usados en pequeñas dosis en animales, lo cual fuerza a una presión selectiva de aquellas bacterias que puedan adaptar mejor la resistencia (Balsalobre & Hernández-Godoy, 2004; Mosquito, Ruiz, Bauer, & Ochoa, 2011; Puig et al., 2011).

El uso indiscriminado de antibióticos a largo plazo genera una disminución del efecto sobre bacterias patógenas, puesto que estas han logrado generar resistencia en el ambiente debido, por ejemplo, a un incompleto tratamiento del antibiótico. En muchos casos, las bacterias, ahora con el desarrollo de la resistencia, son transportadas en las heces, las cuales posteriormente pueden ser usadas como un sistema de fertilizantes de cultivos y suelos, o a partir de desechos cloacales no tratados, llegar a sitios con agua utilizada para el riego de la agricultura, infectando dichos productos y generando aún más la difusión de dichas bacterias (Puig et al., 2011; Zhang, Huang, Zhou, Buckley, & Wang, 2013).

La propagación o expansión de la resistencia a los antimicrobianos, ha sido posible por la gran versatilidad y adaptabilidad que tienen las bacterias, las cuales poseen la capacidad de poder intercambiar elementos extracromosomales del material genético con otros microorganismos presentes en el ambiente o cuerpo por medio de la transferencia horizontal de genes de resistencia (Arumugam et al., 2013; Lozano et al., 2011; Puig et al., 2011; Schwartz et al., 2003; Zhang et al., 2011).

También es posible que la difusión de bacterias resistentes ocurra por los elementos móviles del ADN que tienen el potencial de establecer asociaciones genéticas con un amplio espectro de otros géneros y especies bacterianas, siendo especialmente el lugar en donde

ocurre, el sistema del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Este sitio es extremadamente favorable para las bacterias de igual o distinto género porque poseen una mayor actividad metabólica, más aún si estos provienen de alimentos para consumo humano, agravando el problema ya existente por su alta amplificación y diseminación (Arumugam et al., 2013; Lozano et al., 2011; Puig et al., 2011; Schwartz et al., 2003; Zhang et al., 2011).

Cuando se da la transferencia horizontal de genes en las bacterias, el principal mecanismo que permite esto, es la conjugación (aunque también puede actuar la transducción, transformación y transposición) (Cabrera et al., 2007). La manera en que ocurre es porque las bacterias adquieren plásmidos con esos elementos de ADN extracromosómico, los cuales son incapaces de replicarse de una manera autónoma y por tanto, necesitan de un receptor para que los genes pueden codificar las proteínas y transferirlo de una bacteria a otra que no posee esos genes (Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Mosquito et al., 2011).

Una vez que la bacteria ha adquirido los plásmidos con los genes de resistencia, estos pueden diseminarse a otros elementos genéticos como los integrones (poseen regiones en donde se insertan dichos genes de resistencia) o transposones (estos últimos codifican una transposasa para poder transferirse entre los componentes del genoma bacteriano), e incluso al cromosoma de la bacteria, esto para obtener una mayor estabilidad. Por último, puede ocurrir que los plásmidos no conjugativos o movilizables, pueden aprovechar toda la maquinaria de los sí conjugativos y diseminarse a otros individuos de la misma o diferente especie (Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Mosquito et al., 2011).

Adicionalmente, los microorganismos pueden incluso valerse de otros medios, como los virus, para poder realizar la transferencia de genes resistentes por el mecanismo de transducción como las β -lactamasas, esto ocurre cuando un bacteriófago incorpora fragmentos del ADN de una bacteria que fue parasitada de manera previa e infecta una nueva bacteria que transfiere tanto los elementos genéticos del virus, como el ADN bacteriano, siendo esto algo realmente preocupante a nivel clínico (Martínez-Martínez & Calvo, 2010).

La resistencia puede también llegar a ser adquirida por los propios microorganismos a través de mecanismos bioquímicos en la célula, realizando una serie de modificaciones ya sea individuales o en conjunto para aumentar la resistencia cuando se ven atacadas. Por ejemplo, pueden cambiar la permeabilidad de sus membranas al reducir o modificar

estructuralmente las porinas y alterar los lipopolisacáridos (Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Mosquito et al., 2011; Puig et al., 2011).

Adicionalmente, existe un mecanismo de resistencia que realizan extracciones del compuesto antimicrobiano por el mecanismo del bombeo de corto espectro y multidroga (expulsión activa). También pueden generar una inhibición enzimática, una modificación, protección o hiperproducción en el blanco de ataque o diana (es decir, el antimicrobiano). Asimismo, logran una alteración en la composición y el contenido de las glicoproteínas de la pared bacteriana, e incluso, hasta el desarrollo de nuevas vías metabólicas (Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Mosquito et al., 2011; Puig et al., 2011).

Lo anterior es grave y preocupante, ya que esos mecanismos de evasión no solo van a provocar la resistencia a alguno de los antimicrobianos, sino que pueden dar un paso aún mayor, como lo es, la multirresistencia a más de uno de la gran variedad de antibióticos y fármacos existentes, los cuales en ocasiones no están relacionados a sus mecanismos de acción o resistencia y son de amplio espectro o de reciente introducción al mercado. Lo anterior ocurre porque las bacterias que ya son resistentes tienen una mayor probabilidad de adquirir nuevos genes que una bacteria que es sensible o menos resistente, lo cual también provoca que exista una mayor facilidad en la transferencia de estos genes (Martínez-Martínez & Calvo, 2010; Mosquito et al., 2011; Puig et al., 2011).

En el caso de los alimentos, la transferencia de genes de resistencia puede darse por transmisión al hombre de aquellos microorganismos que causan zoonosis, además de la selección de resistencia en bacterias comensales no patógenas y que transfieren esos genes a la microbiota del intestino, lo cual ha podido ser comprobado al encontrar enterococos resistentes al antibiótico vancomicina debido al uso de avoparcina, el cual es un fármaco para el engorde animal y que posee una estructura muy similar al glicopéptido del antibiótico (Puig et al., 2011). También, otra evidencia encontrada de dicha transferencia, es con la enzima acetilante de aminoglucósidos de enterobacterias en humanos, la cual tenía una alta homología genética con la misma enzima pero en enterobacterias de animales (Puig et al., 2011).

Además, las enterobacterias pueden reducir la permeabilidad de sus membranas y producir carbapenemasas para atacar e hidrolizar carbapenems y otros β -lactámicos (Papp-

Wallace, Endimiani, Taracila, & Bonomo, 2011), mientras que otras bacterias, como la *S. aureus*, posee una resistencia a la meticilina, ya que pueden tener presentes genes *mecA* o *mecC*, que logran codificar una proteína adicional la cual consigue unirse a la penicilina que tiene una baja afinidad por algunos antimicrobianos como los ya mencionados anteriormente, los β -lactámicos, siendo esto descubierto por primera vez en animales bovinos y luego siendo encontrado en pacientes de hospitales (García-Álvarez et al., 2011; Pantosti, 2012).

Organizaciones involucradas en la lucha contra la problemática mundial de resistencia antibiótica

Diversos entes como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Internacional de Epizootias (OIE), junto con otras instituciones regionales de cada país tienen clasificados aquellos antibióticos de crítica importancia y por ende, promueven directrices y reglamentos para el correcto, moderado y eficaz uso de estos y así pueda haber una reducción en los casos de resistencia a nivel regional y a nivel internacional, este último generado por el comercio internacional de animales y otros productos que se encontraban contaminados e infectados (WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR), 2012).

A nivel global, la Unión Europea eliminó el uso de antibióticos como las tetraciclinas y los β -lactámicos que son empleados a nivel clínico y también como promotores del crecimiento (Thomas, 2014). Mientras tanto, a nivel regional, un ejemplo es el Programa Nacional de Medicamentos en Cuba, que desde 1998, desarrolla estrategias en donde exista una prescripción médica de medicamentos acorde a lo diagnosticado, y que haya un uso racional de estos en el área clínica (Puig et al., 2011).

En el caso de Costa Rica, el Sistema de Salud está conformado por diversos entes como el Ministerio de Salud, la Caja Costarricense del Seguro Social, el Instituto Nacional de Seguros (INS), el Instituto Costarricense de Acueductos y Alcantarillados (AyA), el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el Instituto Nacional de Investigaciones en

Nutrición y Salud (INCIENSA), y Universidades estatales y privadas, las cuales participan en la Política Nacional de Salud que analiza este tipo de problemáticas que afectan el país y regiones de todo el mundo, supervisando todas las industrias productoras y de venta de alimentos y además, estableciendo regulaciones y normativas para la prevención de la diseminación de los genes de resistencia a los antibióticos en el área de la salud pública (Kopper et al., 2009).

Para el caso de los alimentos en específico, estas y otras organizaciones, pretenden controlar las producciones primarias de animales de consumo, fases de tratamiento y elaboración de alimentos como carne vacuna, porcina, aves, huevos, lácteos, pescado, hortalizas y frutas, estableciendo normas efectivas y claras en cuanto a la regulación de la seguridad alimentaria, además de un control de la resistencia antimicrobiana en alimentos, usando bacterias de parámetro de higiene e indicadores de calidad sanitaria como *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*, junto a otras indicadores de zoonosis (enfermedades transmitidas de manera directa o indirecta entre animales y humanos) y patogenicidad humana como *Campylobacter coli/jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, ya que la contaminación de dichos alimentos puede ocurrir en la manipulación directa entre los alimentos crudos o de manera indirecta, esto por medio de las manos, superficies y utensilios contagiados o infectados (Puig et al., 2011).

Marcadores moleculares y su papel en la detección de genes de resistencia

Los marcadores moleculares tienen una enorme importancia en la detección de genes de interés, por ejemplo, de resistencia y son parte fundamental para llevar a cabo una PCR. En términos generales, se refieren a cualquier molécula proteica, ARN o ADN con un tamaño y peso molecular conocido, que permite determinar la presencia de secuencia en el ADN, por ejemplo, el marcador universal 16S. Más específicamente, se componen de tres principales características: son aquellos que contienen una variabilidad y divergencia genética significativa a nivel de especie, además, poseen sitios conservados adyacentes los cuales permiten el diseño de iniciadores universales para su amplificación por PCR, y, por último,

tienen una longitud adecuada que permita la extracción y secuenciación de forma fácil, reproducible y precisa (Díaz, Ripoli, Peral-García, & Giovambattista, 2005; Azofeifa-Delgado, 2006; Valenzuela-González et al, 2015).

Algunos tipos de marcadores moleculares son las isoenzimas y los marcadores de ADN, estos últimos pueden no basarse en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como lo son el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y número variable de repeticiones en tándem (VNTRs), pero también puede basarse en la PCR, como lo son las técnicas que utilizan cebadores arbitrarios o semiarbitrarios, por ejemplo, iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), o la otra técnica llamada PCR con sitio “objetivo específico” como lo es las Inter secuencias simples repetidas (ISSR) (Azofeifa-Delgado, 2006).

Adicionalmente, es posible dirigir la PCR hacia la detección de fragmentos específicos de interés, mediante la selección y/o fabricación de cebadores dirigidos a esas regiones, los cuales, al diseñarse, debe tomarse en cuenta que los dímeros y horquillas no deberán tener un ΔG muy negativo (< -3.5 kcal/mol), además, no debe existir horquillas en el extremo 3', y, finalmente, las estructuras secundarias que resulten no deben tener un T_m mayor a la temperatura de alineamiento. Lo anterior, aplica para los genes de resistencia, donde se pueden diseñar o seleccionar cebadores específicos que permitan detectar el gen específico de resistencia, con una alta especificidad, cobertura y estabilidad (Giménez, 2015; De La Fuente et al, 2018).

Las técnicas moleculares son de gran importancia porque permiten detectar material genético, por ejemplo, el método de PCR tiempo final. Este es un procedimiento *in vitro* usado para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN mediante el uso de marcadores sintéticos que comienzan con su síntesis en longitudes variables y complementarios a la secuencia de nucleótidos de los extremos del ADN blanco. Después se da la hibridación en dirección opuesta del fragmento, mediante una serie de ciclos térmicos, en donde ocurre la desnaturalización del ADN, unión del cebador a la secuencia desnaturalizada, finalizando con la síntesis de la doble cadena a partir de la polimerasa. Así es como se obtiene un fragmento específico de ADN, lo cual convierte a esta técnica en un método confiable por su alta sensibilidad, especificidad y capacidad para procesar alta

cantidad de muestras (Rojas-Herrera & González-Flores, 2006; Azofeifa-Delgado, 2006; March-Rosselló, 2017).

Además, si se utiliza en específico la PCR tiempo real (qPCR), permite la cuantificación y que el tiempo de diagnóstico (en horas) se vea acortado, aunque requiere el uso de sondas marcadas, además, al mismo tiempo que ocurre la amplificación, se van a detectar los amplicones sintetizados. Este procedimiento, por lo tanto, va a permitir que se pueda obtener la identificación de varios agentes patógenos y también, generar los genes que confieren la resistencia a la gran gama de antibióticos ya mencionada en párrafos anteriores (March-Rosselló, 2017).

En el ambiente existen bacterias que no son posibles de cultivar, por lo que el uso de mecanismos moleculares permite una detección de genes específicos (como los antimicrobianos) a partir del ADN extraído. Mientras que la PCR convencional solo permite conocer la presencia o ausencia del gen en la muestra, la qPCR permite detectar cantidades relativas y entregar respuestas cuantitativas de la propagación de los genes de resistencia al medio ambiente, lo cual otorga la posibilidad de controlar continuamente los efectos del uso de dichos antibióticos a lo largo del tiempo en las bacterias y hasta poder comparar sitios o entornos de muestreo. En ambas metodologías, es posible encontrar valores muy altos de especificidad y sensibilidad incluso en concentraciones muy bajas de analito, lo que los hace métodos más confiables que otros más tradicionales o de menor costo, por ejemplo, en la detección de un patógeno en muestras obtenidas directamente de campo y en un período muy corto de tiempo, sin necesidad de otros procedimientos de cultivo y aislamiento que requieren repeticiones o gran número de análisis, lo que permite al usuario tener una capacidad de respuesta y acción mucho mejor ante cualquier situación de sospecha (Walsh et al, 2011; Leza-Leza et al, 2022).

3. Marco Metodológico

Se analizaron muestras de alimentos para consumo humano, entre las cuales estaban cárnicos, lácteos, frutas y vegetales. Las muestras fueron tomadas de distintos puntos en todo Costa Rica, en diferentes días y en lugares de industrias de alimentos como supermercados, distribuidoras, restaurantes, Foodservice, entre otros; y en diferentes estados; desde crudas,

cocinadas, congeladas, empacadas, entre otros. Cabe mencionar que la toma de las muestras fue realizada en los puntos de muestreo por personal del Laboratorio Suplilab S.A el cual cuenta con todas las capacitaciones para la manipulación de alimentos y utilizando procedimientos de muestreo internos del laboratorio, los cuales debido a la política de confidencialidad del Laboratorio SupliLab en cuanto a sus procedimientos de muestreo, estos no son detallados por completo en la investigación, debido a que la empresa solicita que no se revele la información. A su vez, el Laboratorio Suplilab S.A es un lugar de análisis microbiológicos de aguas y alimentos, dispositivos médicos y productos farmacéuticos con ensayos acreditados bajo la Norma INTE-ISO/IEC 17025:2017 otorgados por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA). Los sitios de muestreo fueron elegidos de acuerdo con las necesidades de los clientes de dicho laboratorio en las semanas de análisis, lo cual hizo que las muestras fueran distribuidas entre diversos sitios de toma conforme llegaron las solicitudes de los clientes, por lo que las muestras no se encuentran distribuidas homogéneamente entre los sitios de muestreo.

Posteriormente, las muestras fueron transportadas en hieleras con una temperatura inicial aproximada de 4°C, llegando hasta el laboratorio con una temperatura final aproximada de 5°C, donde luego se almacenaron en refrigeración (5 ± 1 °C) hasta su posterior montaje. Cada muestra fue procesada de manera individual.

Además, por la probabilidad de que las bacterias patógenas no estuvieran presentes en las muestras de alimentos, se realizó un muestreo diario por seis semanas en los distintos sitios de muestreo, hasta lograr la obtención de un total de al menos 30 cepas patógenas, siendo *E. coli*, *Salmonella* spp, *S. aureus* y *L. monocytogenes* las pretendidas para el estudio.

Se tabuló cada uno de alimentos para consumo humano muestreados, separados por su grupo perteneciente (cárnicos, lácteos, frutas y vegetales), lugar de su procedencia u origen, y el resultado para los aislamientos bacterianos, anotando tanto los resultados que dieron negativos para los aislamientos bacterianos, como aquellos que dieron positivo. Seguidamente, se diferenció en los resultados positivos, el número de aislamientos obtenidos e identificados para cada cepa patógena en análisis, y como último dato a registrar, aquellas cepas que presentaron amplificación de los marcadores de genes de resistencia empleados en el procedimiento.

Aislamiento de bacterias

Para el aislamiento de las bacterias patógenas, se utilizaron métodos normalizados, estandarizados y convencionales de laboratorio, los cuales, debido a la política de confidencialidad del Laboratorio SupliLab en cuanto a sus procedimientos de ensayo, estos no son detallados por completo en la investigación, debido a que la empresa solicita que no se revele la información. En el caso de *E. coli*, se hizo uso del método BAM (Bacteriological Analytical Manual) con algunas modificaciones (Feng, Weagent, & Grant, 2002), además del Método Oficial Internacional AOAC (OMA) con algunas modificaciones (Curiale et al., 1991; Gangar, Curiale, Lindberg, & Gambrel-Lenarz, 1999), donde básicamente se colocó los alimentos en caldo de dilución e inmediatamente se pasó a Petrifilm para coliformes y *E. coli*, incubando a 35 °C por 48 horas, y realizando la lectura posterior para observar si había o no crecimiento de la bacteria.

Con respecto a *S. aureus*, también se utilizó el método BAM (Bacteriological Analytical Manual) con algunas modificaciones (Bennett & Lancette, 2016; McMahon, Aleo, Schultz, Horter, & Lindberg, 2003), además del Método Oficial Internacional AOAC con algunas modificaciones. En resumen, se pusieron las muestras en caldo de enriquecimiento y luego se pasaron a Petrifilm para *S. aureus*, siendo luego incubado a 35 °C por 48 horas, para finalmente realizar la lectura y ver si había crecimiento típico de la bacteria en este medio.

Asimismo, para el aislamiento de *L. monocytogenes*, se usó el método BAM (Bacteriological Analytical Manual) con algunas modificaciones (Hitchins, Jinneman, & Chen, 2017), donde en un primer paso, se hizo un preenriquecimiento con caldo nutritivo de las muestras de alimentos para la recuperación de los microorganismos con una incubación de 24 horas a 30 °C. En un segundo paso, se realizó un enriquecimiento con otro caldo nutritivo. Después de la incubación de este por 24 horas a 30 °C, las muestras fueron analizadas por el procedimiento del VIDAS (Johnson & Mills, 2013) que establecía si había presencia o ausencia de la bacteria en análisis, y, por último, aquellas muestras que dieron positivo en el paso anterior, fueron pasadas a dos medios de agar selectivos (Oxford y PALCAM) por 48 horas a 35 °C para tener mayor seguridad y posibilidad de que corresponde a la bacteria deseada.

Por último, *Salmonella* spp. se aisló por el método BAM (Bacteriological Analytical Manual) con algunas modificaciones (Andrews, Wang, Jacobson, & Hammack, 2018). Siguiendo el procedimiento en general, las muestras de alimentos fueron colocadas en un medio de preenriquecimiento e incubadas por 24 horas a 35 °C, donde posteriormente se hizo un pase a dos medios de enriquecimiento selectivo y se incubaron por 24 horas a 42 °C. A las muestras positivas del medio de enriquecimiento se les hizo un rayado en dos medios de agar selectivos (Hecktoen y XLD) para comprobar que las bacterias tenían el crecimiento típico después de 24 horas a 35 °C, siendo finalmente, las pruebas bioquímicas y de antisuero las que dieron una mayor certeza de que el aislamiento es el esperado.

Identificación de bacterias

Una vez que se aislaron las bacterias patógenas, como método de confirmación de que corresponden a dichos microorganismos, estas fueron identificadas primeramente por el método morfológico típico de Tinción de Gram de acuerdo con López-Jácome et al., 2014 en un microscopio Marca Olympus en el lente óptico a 100X, esto para determinar si las bacterias eran Gram positivas (moradas) o negativas (rosadas), tal como corresponde para cada género bacteriano, y así confirmar que correspondían al posible microorganismo deseado. Una vez que se realizó la morfología típica, la bacteria fue identificada bioquímicamente por el sistema automatizado VITEK® 2 System (Pincus, 2010), el cual permitió determinar con un porcentaje mínimo de confianza aceptado de 86% y máximo de 100%, si correspondía a la bacteria patógena deseada para el estudio.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

Una vez que las bacterias patógenas se encontraban aisladas de las muestras e identificadas, se procedió a rayar nuevamente las cepas en Agar Trypticase Soya para obtener cultivos frescos. Posterior a esto, se realizó la extracción del ADN bacteriano por el método QIAGEN®, 2016 mericon DNA Bacteria Handbook con algunas modificaciones, siguiendo los pasos del protocolo “Purification of DNA from Food-borne Pathogens Using the mericon DNA Bacteria Kit”, con un protocolo diferenciado para la lisis celular de bacterias Gram negativas y para Gram positivas, con el cual finalmente se obtuvo un purificado de ADN

bacteriano. Se realizó la cuantificación del ADN para ambos grupos de bacterias, mediante espectrofotometría UV-visible de microvolúmenes en un equipo Nanodrop 2000 Thermo Scientific, siguiendo las recomendaciones y guía de uso del equipo. La pureza de los ácidos nucleicos se evaluó mediante las relaciones A260/A280 y A260/A230.

Se utilizaron como controles positivos, las cepas de *E. coli* M74B y *E. coli* M96A facilitadas por el Laboratorio de Bacteriología Medica de la Escuela de Medicina Veterinaria de la UNA, la cepa *E. coli* 175 facilitada por el Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Escuela de Ciencias Biológicas y un pellet de bacterias de agua del río pirro, las cuales fueron utilizadas como control de la integridad bacteriana, así como control para los genes de resistencia analizados (Anexo 1). La presencia de genes de resistencia en el pellet bacteriano del río Pirro fue confirmada mediante secuenciación Sanger.

Estas cepas se rayaron en Agar Tripticasa Soya, esto para poder recuperarlas debido a que se encontraban en conservación en glicerol. Posterior a esto, se realizó la extracción de ADN bacteriano por la misma metodología seguida anteriormente con las muestras, para bacterias Gram negativas, con el cual finalmente se obtuvo un purificado de ADN bacteriano. La cuantificación de ADN fue realizada de la misma manera que las muestras.

Posteriormente, se realizó un gel de electroforesis al 1% TBE 0,5X con un marcador de peso molecular (MPM) Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder 0,5 µg/µl, 50 µg e intercalante Thermo 6X DNA Loading Dye con Gel/Red (Mezcla intercalante y buffer de carga), donde finalmente, se visualizó la integridad del ADN utilizando un transiluminador de luz UV (ENDURO, Labnet).

Para evaluar la calidad de la extracción del ADN de cada una de las muestras y del control, así como la viabilidad de los extractos para análisis moleculares, se realizó una prueba PCR con el cebador universal 16S_ARNr (27F 5´ AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´ y 1492r 3´ GGTTACCTTGTTACGACTT 5´) para verificar que todas las muestras lo amplificaban, ya que, de no ser así, la muestra se descartaba para la investigación. Posteriormente a todas las muestras positivas por 16S ARNr se les evaluó la presencia de genes de resistencia a antibióticos.

Para determinar la presencia de los genes de resistencia, se utilizaron en total siete marcadores moleculares específicos para la detección de los antibióticos, cuatro de ellos dirigidos a regiones al antibiótico Tetraciclina (TetA según Waters et al., 1983; TetB según Sengeløv et al., 2003 y TetC según Sengeløv et al., 2003) y tres marcadores para el antibiótico Ampicilina (TEM según Olesen et al., 2004, Moodley & Guardabassi, 2009), esto para tener una mayor probabilidad de obtención del marcador de resistencia (Anexo 2). Tanto la prueba PCR con el marcador universal 16S ARNr como con los marcadores moleculares de genes de resistencia, fueron amplificadas mediante PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific). Las cantidades finales utilizadas para cada componente de la PCR a 1X fueron: 12.5 µL Master Mix, 0.8 µL del “cebador forward” y 0.8 µL del “cebador reverse” (Anexo 2), 9.9 µL de agua libre de nucleasas y 1 µL de ADN, para un volumen total final de 25 µL por reacción. El perfil térmico de cada PCR fue ajustado de acuerdo con cada marcador molecular utilizado (Anexo 3). Posteriormente, las muestras fueron visualizadas mediante una electroforesis en gel de agarosa 1.5% TBE 0,5X con un marcador de peso molecular (MPM) Gene Ruler 1 kb Plus DNA Ladder 0,5 µg/µl, 50 µg e intercalante Thermo 6X DNA Loading Dye con Gel/Red (Mezcla intercalante y buffer de carga), en búsqueda de aquellas muestras que amplificaran inicialmente el marcador molecular universal y posteriormente, el marcador molecular del gen de resistencia buscado.

Identificación de las amplificaciones obtenidas mediante secuenciación

La identidad de los amplicones obtenidos por PCR fue corroborada mediante secuenciación de Sanger en dos direcciones, utilizando un analizador genético ABI 3500 ubicado en el Laboratorio de Análisis Genómico de la Universidad Nacional (LAGEN), mediante la química BigDye Terminator™ V3.1 (Applied Biosystems). Inicialmente, los productos de PCR fueron purificados mediante una precipitación con etanol absoluto y acetato de sodio 3M. Posteriormente, las reacciones de PCR para la secuenciación fueron purificadas con BigDye XTerminator.Purification Kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante, con el fin de eliminar los terminadores no incorporados. Finalmente, las secuencias obtenidas se editaron en el programa Geneious v.R9 (Biomatters), y posteriormente comparadas con secuencias reportadas en la base de datos GenBank mediante un alineamiento en BLASTn (Altschul et al. 1990) disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)

Finalmente, con los resultados obtenidos y debido a la naturaleza descriptiva de estos, se realizó un análisis cualitativo de los datos, en donde se determinó la presencia o ausencia del gen de resistencia de cada marcador molecular utilizado para ambos antibióticos en cada cepa bacteriana, siendo además reportados aquellos resultados negativos, es decir, donde no hubo crecimiento de las bacterias patógenas deseadas o cuando en el aislamiento e identificación, no hubo correspondencia con el patógeno esperado. Estos datos fueron anotados en el programa Microsoft Office Excel 2016 y representados mediante gráficos y tablas con el mismo programa mencionado.

4. Resultados

Aislamiento de bacterias

Se analizaron un total de 900 muestras de alimentos para consumo humano desde el 13 de agosto al 18 de setiembre del 2018 (5 semanas).

En el aislamiento de bacterias mediante los medios de cultivo se obtuvo un total de 40 muestras (4.4% de las 900 muestras analizadas) que indicaron algún patógeno de forma presuntiva, (Anexo 4), siendo muchas de estas, correspondientes a un mismo tipo de alimento y/o a un mismo lugar (Anexo 5). Como se observa en la figura 1, el sitio con la mayor cantidad de aislamientos de bacterias patógenas fue el supermercado, mientras que los alimentos con mayor presencia de patógenos aislados fueron la carne de res, el pejibaye y el brócoli.

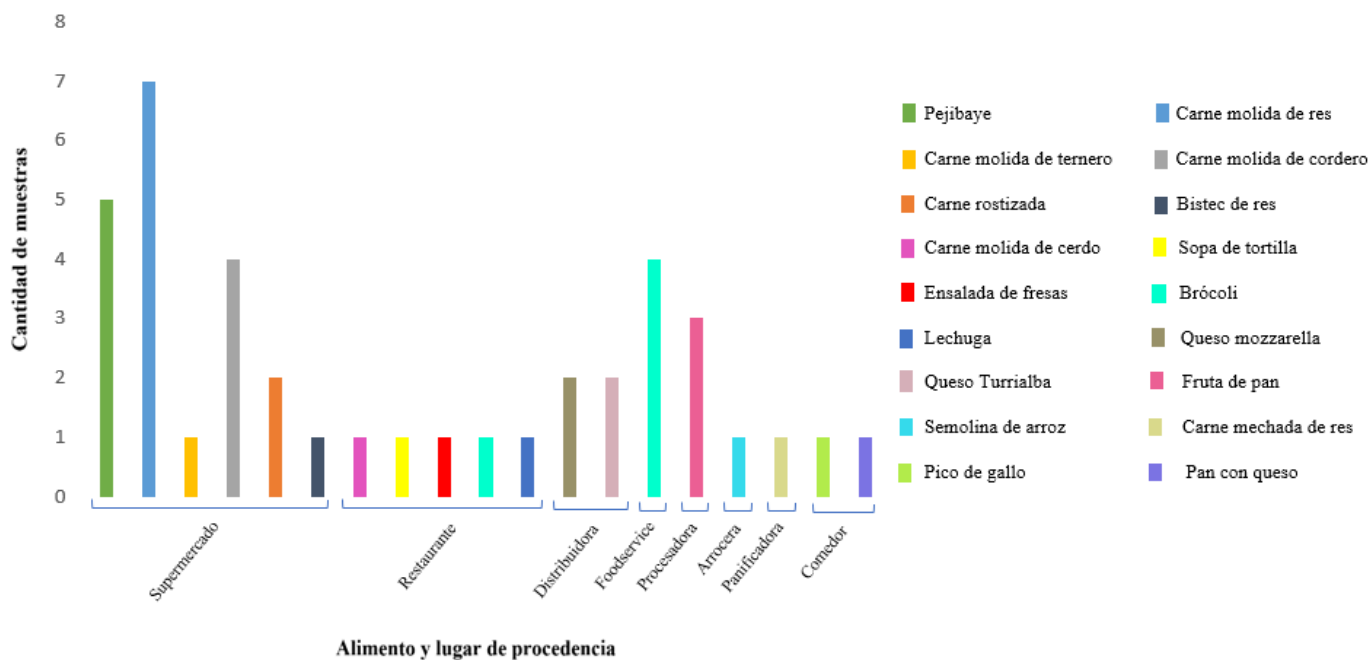


Figura 1. Alimentos analizados y su respectivo lugar de procedencia

Respecto a la Tinción de Gram se obtuvo 17 bacterias correspondientes a bacilos Gram positivos (BG+), 19 bacilos Gram negativos (BG-) y 4 cocos Gram positivos (CG+) (Figura 2), del total de los 40 aislamientos obtenidos.

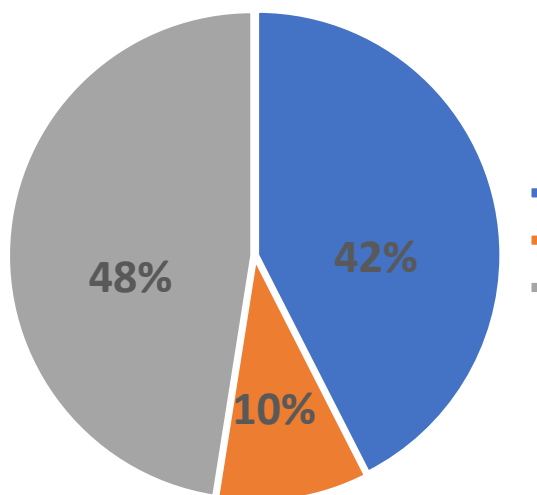


Figura 2. Resultados de la Tinción de Gram

En los resultados por Vitek 2® System, se encontró que, de las 40 muestras obtenidas, 14 (35%) bacterias correspondieron a *Listeria monocytogenes* (BG+), en 9 (22.5%) de estas se obtuvo el patógeno *Escherichia coli* (BG-), en 8 (20%) muestras se encontró la bacteria patógena *Salmonella* (BG-), mientras que hubo 2 (5%) aislamientos de *Staphylococcus aureus* (CG+). En el caso del primer y penúltimo microorganismo, se encontraron varios serotipos, ya que este equipo no puede distinguir al 100% entre uno u otro, por lo cual fue necesario elegir alguno de estos, siendo este el de mayor porcentaje (Figura 3).

Además, hubo 7 muestras (17.5%) que, en las pruebas presuntivas y la Tinción de Gram, se esperaban los microorganismos anteriores, sin embargo, al realizar la identificación bacteriana por Vitek 2® System, se encontró que no pertenecían a ninguno de esos (Figura 3). En todos los casos, el porcentaje de confianza de la identificación estuvo dentro del rango estipulado y aceptado según lo indica el Manual del Vitek, incluso para los microorganismos no esperados en el estudio (*L. welshimeri*, *E. cecorum* y *E. aerogenes*), pero que siguieron siendo considerados en la investigación.

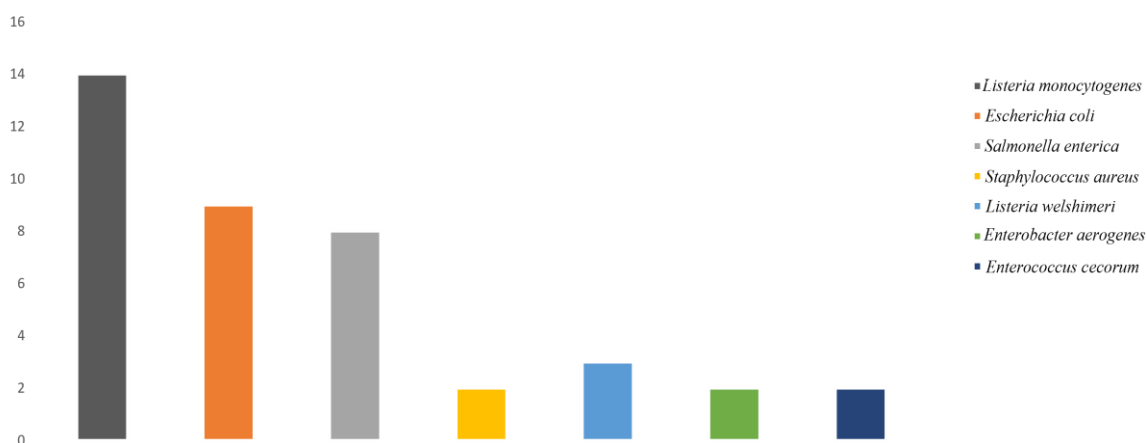


Figura 3. Cantidad de microorganismos identificados por Vitek 2® System

Además, se obtuvo una relación entre el producto o matriz con el sitio de procedencia. La carne molida (tanto de res, ternero, cerdo y cordero), el pejibaye y el brócoli son las muestras en la que más se encontró bacterias patógenas (12 muestras de carne molida en supermercado y 1 muestra en restaurante, mientras que 5 muestras de pejibaye en supermercado, finalmente encontrando 4 muestras de brócoli en Foodservice y 1 muestra en restaurante) (Anexo 5), siendo el supermercado el sitio de procedencia de donde mayormente se aislaron, representando estas tres matrices más del 50% de las muestras analizadas (Figura 4). Además, en relación con las otras matrices anteriormente mencionadas, el supermercado como sitio de procedencia representa el 50% del total de aislamiento, con un total de 20 muestras aisladas, seguido del Foodservice, la distribuidora, productora, restaurante, panificadora, comedor y arrocería en un menor porcentaje cada uno.

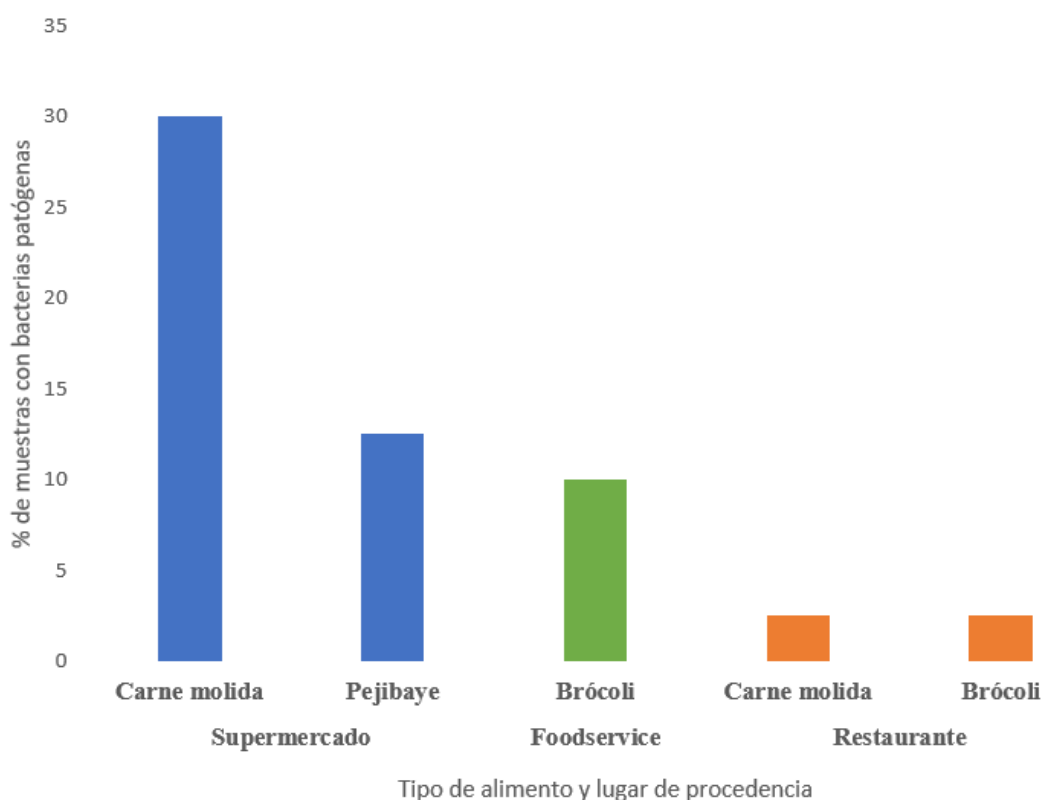


Figura 4. Porcentaje de aislamiento de las tres principales matrices de alimentos

También se encontró como *L. monocytogenes* fue el microorganismo más aislado y, además, el que más se aisló en una misma matriz de alimento, siendo encontrada en 6 muestras de carne molida de res y en 5 aislamientos de brócoli, seguido del patógeno *E. coli* aislado del pejibaye en 5 muestras.

Extracción de ADN y amplificación por PCR

Se realizó la extracción de ADN de un total de 21 muestras tipificadas como Gram positivas y 22 muestras Gram negativas (siendo eliminadas posteriormente 3 muestras en Gram negativas, como se explica para la Figura 8, quedando un total de 19 muestras Gram negativas). La concentración para las Gram positivas estuvo entre 14.7 y 96.7 ng/ μ L, mientras que en las Gram negativas la concentración estuvo entre 63.8 y 177 ng/ μ L. En cuanto a los valores de las relaciones A260/A280 y A260/A230, estas estuvieron entre 1.17 a 1.59 y 0.55 a 0.78 respectivamente, para Gram positivas, mientras que, en el caso de Gram negativas los valores de A260/A280 estuvieron entre 2.07 a 2.17 y entre 1.23 a 1.88 para A260/A230. Una vez realizada la electroforesis, se observaron bandas con alto peso molecular y sin degradación en la mayoría de los casos (Figura 5 y Figura 6). En el caso de la cepa control, esta tuvo una concentración de 179.8 ng/ μ L con una relación A260/A280 y A260/A230 de 2.13 y 1.62, respectivamente.

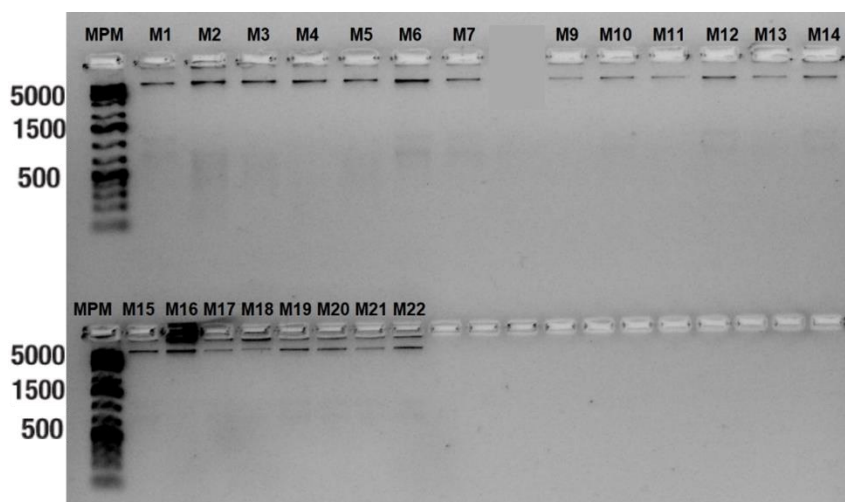


Figura 5. Extracción de ADN de bacterias Gram positivas. MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific), M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res.

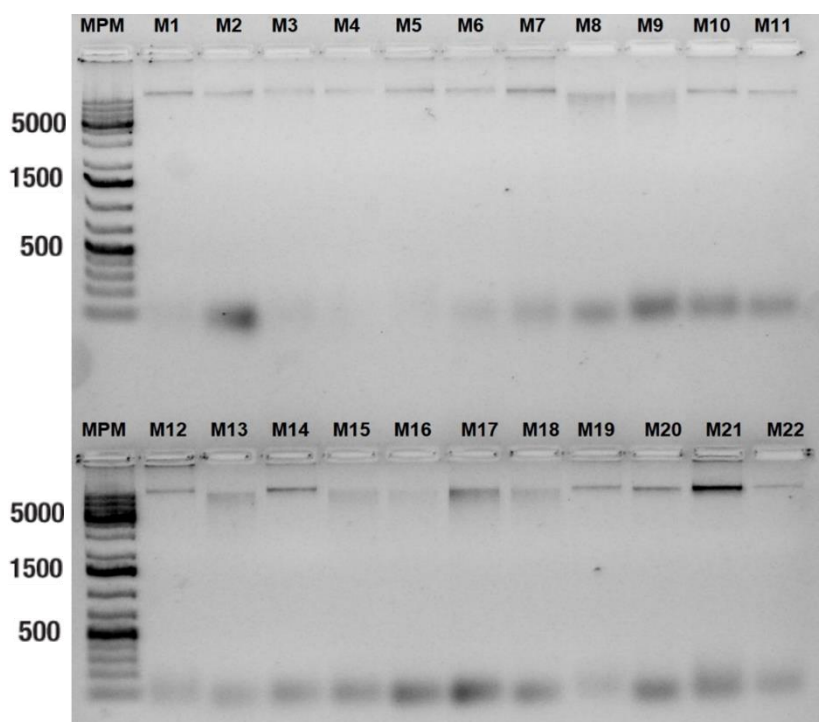


Figura 6. Extracción de ADN de bacterias Gram negativas. MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific), M1: *E. aerogenes* en fruta de pan, M2: *E. coli* en carne molida de cordero, M3: *E. aerogenes* en carne molida de res, M4: *Salmonella* spp en bistec solomo de res, M5: *Salmonella* spp en fruta de pan, M6: *S. entérica* spp *arizonae* en semolina de arroz, M7: *S. entérica* spp *arizonae* en ensalada de fresas, M8: *E. coli* en pejibaye, M9: *E. coli* en pico de gallo, M10: *E. coli* en queso mozzarella, M11: *E. coli* en carne mechada de res, M12: *E. coli* en fruta de pan, M13: *E. coli* en pejibaye, M14: *E. coli* en pejibaye,

M15: *E. coli* en pejibaye, M16: *E. coli* en pejibaye, M17: *E. coli* en pejibaye, M18: *E. coli* en pejibaye, M19: *S. entérica* spp *arizonae* en sopa de tortilla, M20: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M21: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M22: *S. entérica* spp *arizonae* en carne molida de cerdo.

En las anteriores imágenes (Figura 5 y Figura 6) de los geles de electroforesis, se puede observar que la intensidad de las bandas varía entre cada muestra, sin embargo, se observa poca degradación del ADN o nula, al carecer de “smears”, demostrando la integridad del ADN y su viabilidad para análisis moleculares posteriores.

Posteriormente, y a partir de los ADN obtenidos, la PCR utilizando el cebador universal 16S demostró la integridad de los ADNs extraídos al obtenerse una única banda específica para todas las 21 muestras de las bacterias Gram positivas (Figura 7) con un peso esperado de 1500 pb.

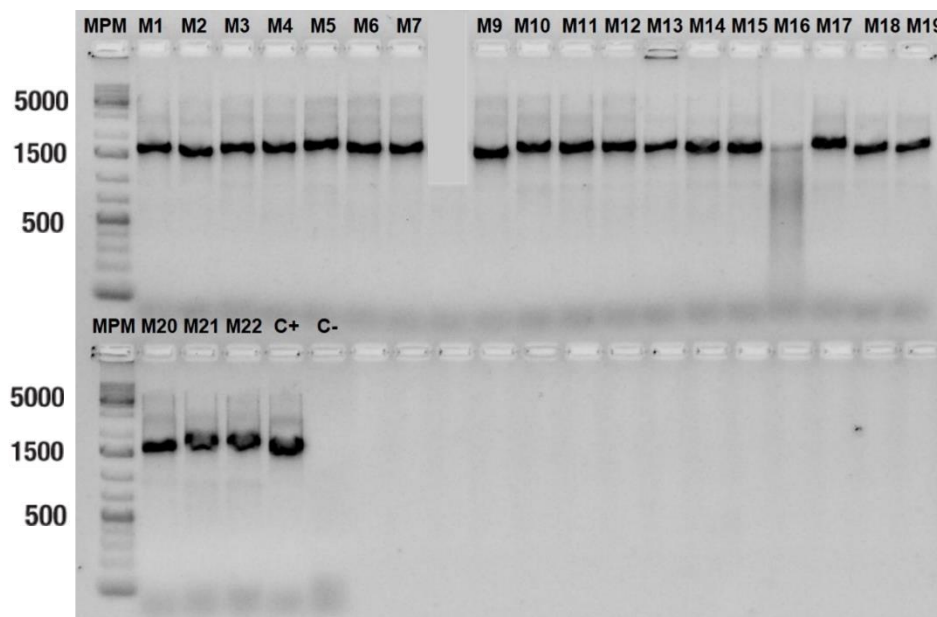


Figura 7. Amplificación del cebador universal 16S en ADN de bacterias Gram positivas. MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific), M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L.*

monocytogenes en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res, C+: Control positivo, C-: Control negativo.

Para el caso de las bacterias Gram negativas, al realizar la PCR con el cebador universal 16S se obtuvo 19 muestras positivas de las 22 en total un tamaño de 1500 pb, por lo cual, las muestras 2, 15 y 18 (no amplificadas) fueron eliminadas de la investigación (Figura 8).

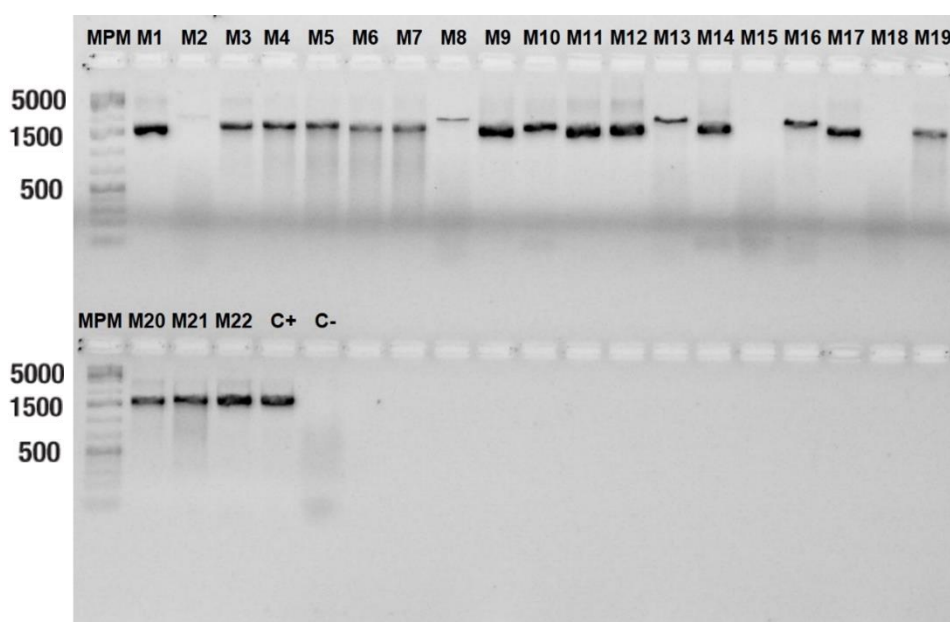


Figura 8. Amplificación del cebador universal 16S en ADN de bacterias Gram negativas. MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific), M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

Marcadores moleculares para la identificación de genes de resistencia

Una vez realizadas todas las PCR de las muestras con el marcador molecular 16S ARNr en donde fueron conformes, se realizaron PCR dirigidas a la detección de genes de resistencia en Ampicilina con cebadores TEM, OXA y SHV, mientras en Tetraciclina con cebadores TetA, TetB y TetC y TetD en ambos grupos de bacterias (Anexo 2), obteniéndose amplificación de los controles positivos y en muestras aisladas con los cebadores TEM, TetA, TetB y TetC (Figura 9-12); mientras que, para los cebadores OXA, SHV y TetD, no hubo amplificación por parte de las muestras ni de los distintos controles positivos utilizados, por lo cual no son tomados en cuenta en la investigación de resultados.

Se observa en la Figura 9A para bacterias Gram positivas, como la muestras 1, 2, 4, 5, 7, 9, 12-22 presentan una amplificación para TEM coincidiendo además con el tamaño de pares de bases para este marcador (964 pb) y siendo los controles conformes. Para el caso de las bacterias Gram negativas (Fig. 9B), no hubo amplificación alguna de ninguna muestra para este marcador molecular en específico de ampicilina, siendo el único marcador utilizado en la investigación (para Ampicilina) al tener una amplificación conforme del control positivo.

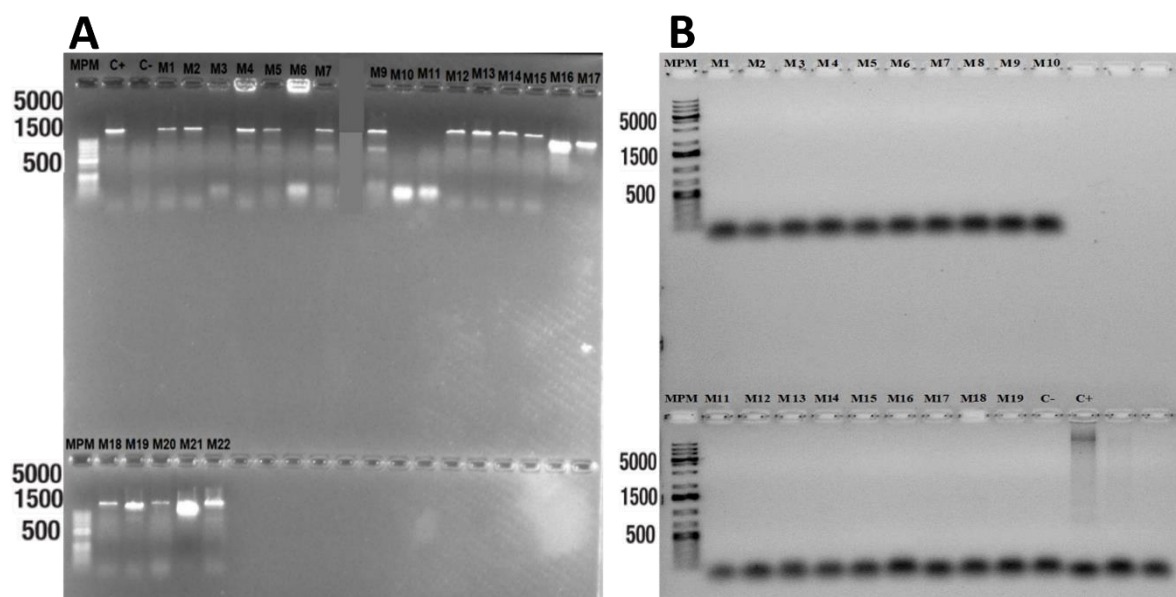


Figura 9. Cebador TEM en bacterias Gram positivas (A) y bacterias Gram negativas (B). MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific). Figura A M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso

Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res. Figura B

M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

En la Figura 10, se observa resultados positivos tanto para Gram positivas (Fig 10A) como para Gram negativas (Fig 10B), donde hay una amplificación conforme de las muestras 2, 9, 18 y muy leve de la muestra 3, para el caso de las bacterias Gram positivas, siendo además los controles conformes para el marcador molecular TetA del antibiótico Tetraciclina. Mientras tanto, las muestras 2 y 3 de bacterias Gram negativas presentan una amplificación del marcador, siendo también los controles conformes a lo esperado y de acuerdo con el tamaño de pares de bases para este marcador molecular (956 pb).

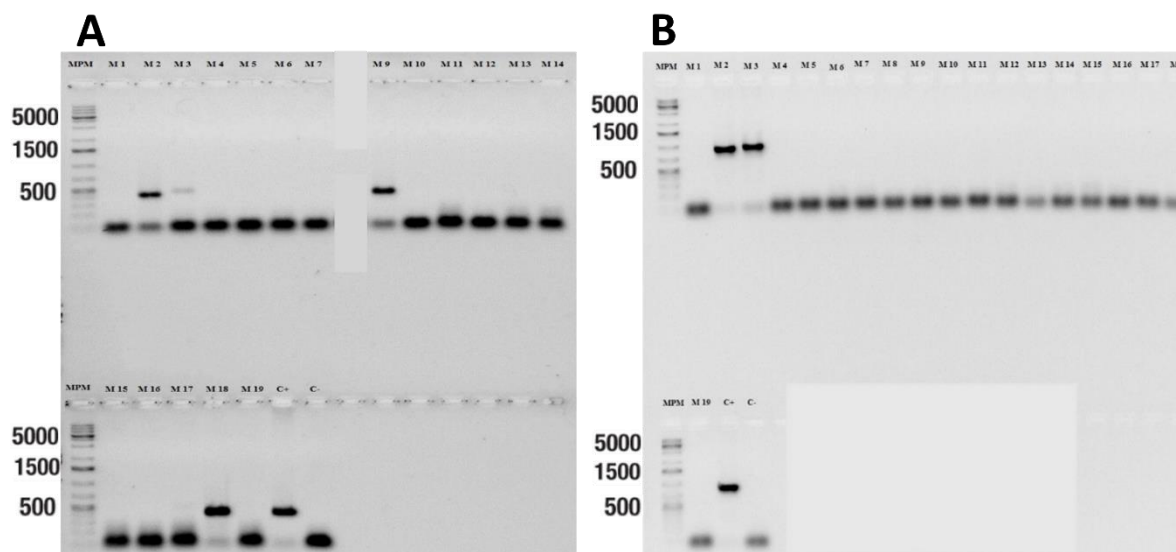


Figura 10. Cebador TetA en bacterias Gram positivas (A) y bacterias Gram negativas (B). MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific). Figura A M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res. Figura B M1: *E. aerogenes* en fruta de pan, M2: *E. coli* en carne molida de cordero, M3: *E. aerogenes* en carne molida de res, M4: *Salmonella* spp en bistec solomo de res, M5: *Salmonella* spp en fruta de pan, M6: *S. entérica* spp *arizonae* en semolina de arroz, M7: *S. entérica* spp *arizonae* en ensalada de fresas, M8: *E. coli* en pejibaye, M9: *E. coli* en pico de gallo, M10: *E. coli* en queso mozzarella, M11: *E. coli* en carne mechada de res, M12: *E. coli* en fruta de pan, M13: *E. coli* en pejibaye, M14: *E. coli* en pejibaye, M15: *E. coli* en pejibaye, M16: *E. coli* en pejibaye, M17: *E. coli* en pejibaye, M18: *E. coli* en pejibaye, M19: *S. entérica* spp *arizonae* en sopa de tortilla, M20: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M21: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M22: *S. entérica* spp *arizonae* en carne molida de cerdo. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

En la figura 11, se observa una amplificación únicamente de la muestra 16 en bacterias Gram positivas (Fig 11A), mientras que se observa la amplificación de la muestra 2, 9 y 18 en bacterias Gram negativas (Figura 11B), esto para un diferente marcador asociado a la

Tetraciclina, con los controles conformes y de acuerdo con lo esperado para el tamaño de pares de bases para este marcador molecular (414 pb).

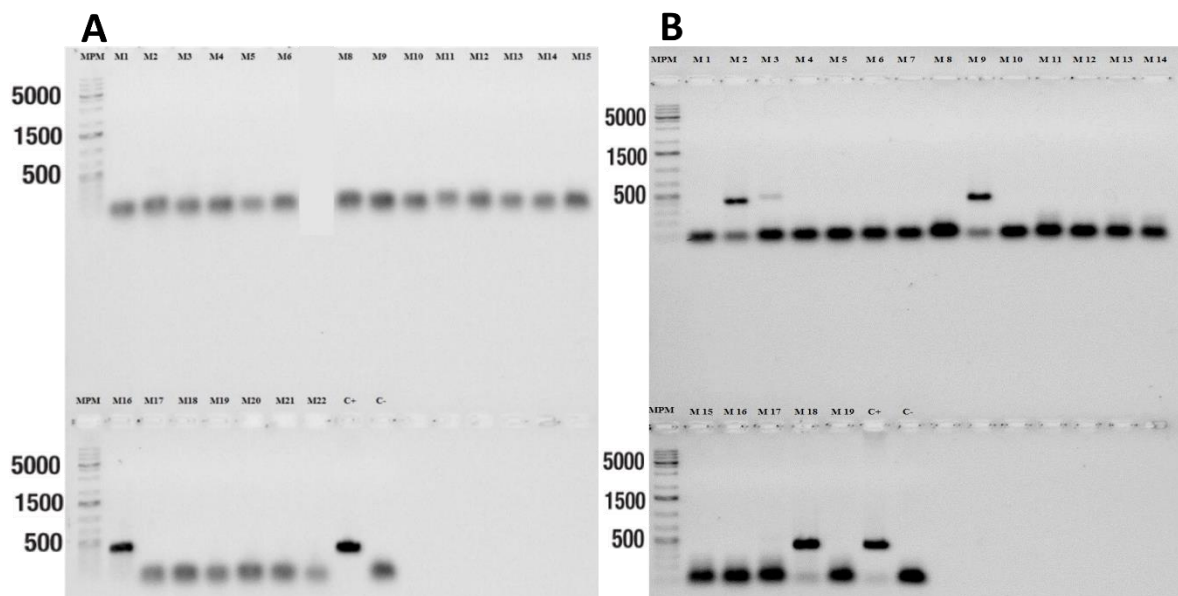


Figura 11. Cebador TetB en bacterias Gram positivas (A) y bacterias Gram negativas (B). MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific). Figura A M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res. Figura B M1: *E. aerogenes* en fruta de pan, M2: *E. coli* en carne molida de cordero, M3: *E. aerogenes* en carne molida de res, M4: *Salmonella* spp en bistec solomo de res, M5: *Salmonella* spp en fruta de pan, M6: *S. entérica* spp *arizonae* en semolina de arroz, M7: *S. entérica* spp *arizonae* en ensalada de fresas, M8: *E. coli* en pejibaye, M9: *E. coli* en pico de gallo, M10: *E. coli* en queso mozzarella, M11: *E. coli* en carne mechada de res, M12: *E. coli* en fruta de pan, M13: *E. coli* en pejibaye, M14: *E. coli* en pejibaye, M15: *E. coli* en pejibaye, M16: *E. coli* en pejibaye, M17: *E. coli* en pejibaye, M18: *E. coli* en pejibaye, M19: *S. entérica* spp *arizonae* en sopa de tortilla, M20: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M21: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M22: *S. entérica* spp *arizonae* en carne molida de cerdo. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

En la figura 12, se observan resultados conformes para los controles positivo y negativo, siendo el primero conforme al tamaño de pares de bases esperado para este marcador molecular de Tetraciclina (505 pb). En el caso de las muestras, se observa para ambos grupos de bacterias, una amplificación muy leve en comparación con los otros resultados y al control positivo, sin embargo, no se descarta que pueda haber trazas que requieran ser mejor aisladas para verificar la presencia de la resistencia al antibiótico.

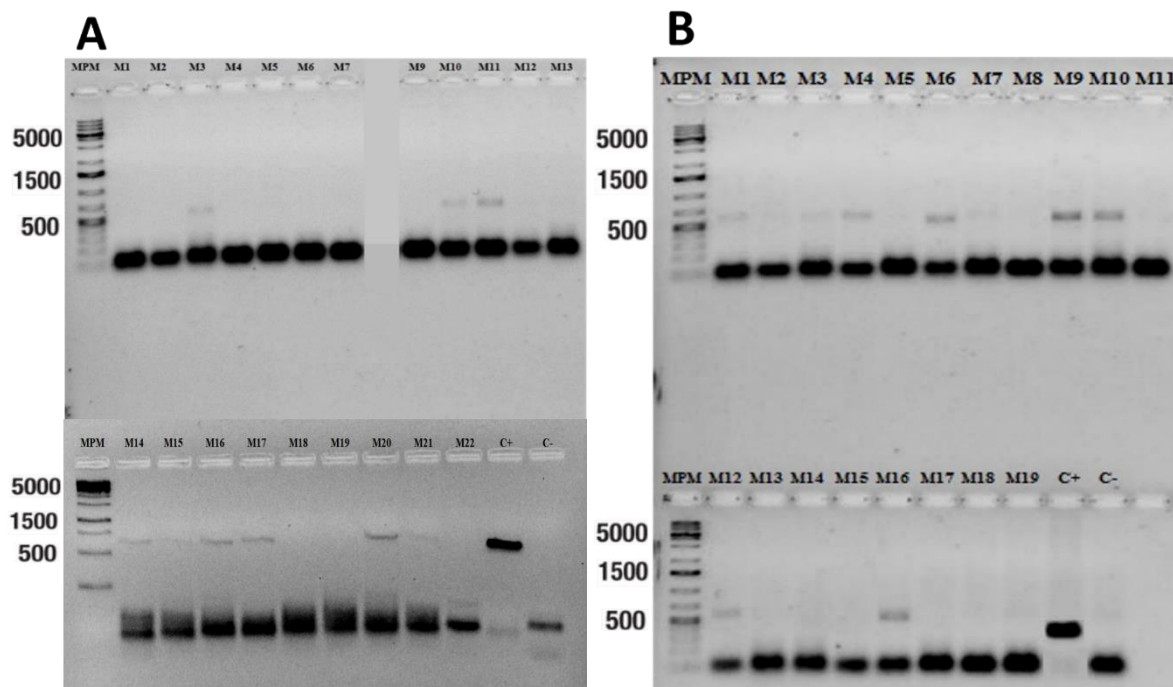


Figura 12. Cebador TetC en bacterias Gram positivas (A) y bacterias Gram negativas (B). MPM: Marcador de peso molecular de 1 Kb (ThermoFisher Scientific). Figura A M1: *S. aureus* en pan casero con queso, M2: *S. aureus* en lechuga americana, M3: *E. cecorum* en queso Turrialba, M4: *E. cecorum* en queso Turrialba, M5: *L. welshimeri* en carne molida de res, M6: *L. welshimeri* en carne molida de ternero, M7: *L. welshimeri* en carne molida de cordero, M9: *L. monocytogenes* en brócoli, M10: *L. monocytogenes* en brócoli, M11: *L. monocytogenes* en brócoli, M12: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M13: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M14: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M15: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M16: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M17: *L. monocytogenes* en carne rostizada, M18: *L. monocytogenes* en queso mozzarella, M19: *L. monocytogenes* en brócoli, M20: *L. monocytogenes* en carne molida de res, M21: *L. monocytogenes* en brócoli, M22: *L. monocytogenes* en carne molida de res. Figura B M1: *E. aerogenes* en fruta de pan, M2: *E. coli* en carne molida de cordero, M3: *E. aerogenes* en carne molida de res, M4: *Salmonella* spp en bistec solomo de res, M5: *Salmonella* spp en fruta de pan, M6: *S. entérica* spp *arizonae* en semolina de arroz, M7: *S. entérica* spp *arizonae* en ensalada de fresas, M8: *E. coli* en pejibaye, M9: *E. coli* en pico de gallo, M10: *E. coli* en queso mozzarella, M11: *E. coli* en carne mechada de res, M12:

E. coli en fruta de pan, M13: *E. coli* en pejibaye, M14: *E. coli* en pejibaye, M15: *E. coli* en pejibaye, M16: *E. coli* en pejibaye, M17: *E. coli* en pejibaye, M18: *E. coli* en pejibaye, M19: *S. entérica* spp *arizonae* en sopa de tortilla, M20: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M21: *S. entérica* spp *entérica* en carne molida de cordero, M22: *S. entérica* spp *arizonae* en carne molida de cerdo. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

En resumen, de acuerdo con la fuente, al código y al cebador, se obtuvo resistencia en todos los cebadores utilizados en al menos una muestra (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resistencia a antibióticos en muestras de alimento para consumo humano

Bacterias Gram negativas						Bacterias Gram positivas				
Fuente	Código de muestra	TEM	TetA	TetB	TetC	Código de muestra	TEM	TetA	TetB	TetC
Supermercado	M2	-	+	+	-	M5	+	+	-	-
	M3	-	+	+	+	M6	-	+	-	+
	M7	-	-	-	-	M7	+	-	-	-
	M12	-	-	-	+	M12	+	-	-	-
	M13	-	-	-	-	M13	+	-	-	-
	M14	-	-	-	-	M14	+	-	-	+
	M15	-	-	-	-	M15	+	-	-	+
	M17	-	-	-	-	M16	+	-	+	+
	M18	-	-	+	-	M17	+	+	-	+
						M20	+	-	-	+
						M22	+	-	-	-
% de aparición		0 %	22,2 %	33,3 %	22,2 %		90,9 %	27,3 %	9,09 %	54,5 %
Restaurante	M6	-	-	-	+	M2	+	-	-	-
	M16	-	-	-	+	M21	+	-	-	-
	M19	-	-	-	-					
	% de aparición	0 %	0 %	0 %	66,6 %		100 %	0 %	0 %	0 %
Distribuidora	M1	-	-	-	+	M3	-	-	-	-
	M4	-	-	-	+	M4	+	-	-	-
	M9	-	-	+	+	M18	+	+	-	-
	% de aparición	0 %	0 %	33,3 %	100 %		66,6 %	33,3 %	0 %	0 %
Procesadora	M11	-	-	-	-					
	% de aparición	0 %	0 %	0 %	0 %					

Arrocera	M5	-	-	-	-					
% de aparición		0 %	0 %	0 %	0 %					
Panificadora	M10	-	-	-	+					
% de aparición		0 %	0 %	0 %	0 %					
Comedor	M8	-	-	-	-	M1	+	-	-	-
% de aparición		0 %	0 %	0 %	0 %		100 %	0 %	0 %	0 %
Foodservice						M9	+	-	-	-
						M10	-	-	-	+
						M11	-	-	-	+
						M19	+	-	-	-
% de aparición							50 %	0 %	0 %	50 %

Identificación de las amplificaciones obtenidas mediante secuenciación

Se seleccionó una muestra amplificada para cada uno de los cebadores de resistencia analizados y se procedió a realizar la secuenciación en dos direcciones de esta. En el caso de la secuencia Tet(B) esta arrojó un 99.73% de identidad con una cepa reportada de *E. coli* conteniendo el gen Tet(B) (OM977025.1). En el caso de la secuencia Tet(M), esta presentó un porcentaje de identidad de un 74.06% y de 73.93% con cepas *E. coli* reportadas con resistencia a los beta-lactámicos blat-TEM (NG_061611.1, KT400656.1), mientras que para Tet(A) se obtuvo un porcentaje de 92.25% con secuencias reportadas (GQ343144.1). Finalmente, para Tet(C) esta mostró un porcentaje de identidad de un 97.42% con cepas constructos sintéticos de tetraciclina C reportados (MN370009.1).

5. Discusión

El porcentaje de bacterias patógenas con resistencia a los antibióticos en esta investigación y que fueron aisladas de alimentos procedentes mayormente de supermercados, tiene relación con que este sitio es de los lugares más visitados por las personas para buscar los productos de consumo para su alimentación diaria, por tanto, los vegetales, los lácteos y la carne

procedentes de la agricultura y los animales, tienden a llegar en una gran cantidad a estos sitios (Capita, Alonso-Calleja, 2013).

En el caso de la presencia de microorganismos resistentes en la matriz de carne, estudios como el de Mendel (2015), Jans et al. (2018) y Puig et al. (2020), son claros en afirmar que, para esta matriz, es muy común debido a que en el proceso de sacrificio pueden cometerse errores durante su tratamiento térmico y evisceración, además, la mala manipulación humana que conlleva a contaminación cruzada y, por tanto, a encontrarse diversidad de microorganismos que acarrear dicha resistencia, además de que es una matriz con una alta fuente de nutrientes que permite el crecimiento de patógenos (Rajaei et al, 2021).

La alta incidencia de bacterias como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* con genes de resistencia a Tetraciclina, por ejemplo, coincide con lo indicado por Verraes et al (2013), Jans et al (2018) y Puig et al. (2020), siendo la carne, los lácteos y los vegetales, los alimentos donde más comúnmente pueden ser encontrados, debido a que son parte de las principales fuentes de contaminación y de donde mayor frecuencia se aíslan los patógenos. Además, dentro de la familia *Enterobacteriaceae* se encuentran la *E. coli* y el género *Enterobacter* (por ejemplo, *Enterobacter aerogenes*), que pueden ser frecuentemente aisladas de alimentos como la carne, donde también es posible, según lo indican otros estudios, que sean resistentes a antibióticos como Ampicilina y Tetraciclina (Kilonzo-Nthenge et al, 2013; Capita et al., 2020).

La concentración de ADN que se obtuvo en la extracción mediante un kit comercial coincide con lo obtenido en el estudio de Suárez-Contreras & Yañez-Meneses (2018), donde la cantidad de ADN indicada por el equipo Nanodrop, fue suficiente para verificar el ADN y poder continuar con los siguientes ensayos para ambos grupos de bacterias. Además, en dicha investigación, coincide la relación A260/A280 obtenida, donde está por encima de 1.8 para Gram negativas y menor a 1.8 para Gram positivas, lo que indica una posible contaminación con proteínas para este último grupo. De la misma manera ocurre con la relación A260/A230, ya que reportan para Gram negativas y Gram positivas un valor promedio que no está en el rango de 2.0-2.2, con promedios muy similares entre cada grupo bacteriano, lo que indica una posible contaminación con carbohidratos o fenoles.

Los resultados no acordes a los valores esperados para una pureza en la extracción de ADN y sus relaciones A260/A280 y A260/A230, como ya se mencionó anteriormente, puede estar relacionado a contaminación por proteínas, fenoles u otros, pero también, situaciones como una muy baja concentración de ácidos nucleicos, pequeños cambios en el pH o en la precisión de la longitud de onda del equipo, afectan los resultados de la pureza (Matlock, 2015). Además, los geles de electroforesis de la extracción de ADN demuestran como dicha extracción a partir del cultivo puro de la cepa, permite obtener mejores resultados debido a la alta especificidad de la técnica (Poutou et al., 2005).

La amplificación del marcador molecular universal 16S en la mayoría de las muestras de Gram positivas y Gram negativas, concuerda con lo esperado para este marcador, ya que es uno de los marcadores más utilizados en las pruebas de PCR al ser una molécula muy antigua y que está presente en todas las bacterias actuales en estructura y función (Rodicio & Mendoza, 2004). Además, el tamaño de amplificación obtenido en el cebador 16S, coincide con lo esperado y reportado en la literatura, siendo este de aproximadamente 1500 pb (Newsome et al., 2004). Finalmente, tal como lo indica la literatura, el tamaño del amplicón TEM (964 pb aproximadamente) coincide con lo esperado (Olesen et al., 2004; Moodley & Guardabassi, 2009). En el caso de TetA para bacterias Gram positivas, la amplificación es en un tamaño menor al tamaño esperado (956 pb) según la literatura (Waters et al., 1983). En el caso anterior, esto es un problema en la PCR, y puede deberse principalmente a la contaminación del ADN genómico en algún paso del proceso de la preparación de la PCR, ya sea en cebadores, buffers u otros reactivos; o debido al exceso de algún reactivo o condición de ciclo térmico inapropiado, por ejemplo, en la temperatura de annealing, o a mutaciones que ocasionan variaciones en los fragmentos esperados, productos de inserciones en los sitios a los que se dirige el cebador (Lorenz, 2012; Mubarak et al., 2020). En el caso de los cebadores TetA, TetB y TetC en Gram negativas, el tamaño de dichos cebadores concuerda con los con lo esperado en la literatura (Waters et al., 1983; Sengeløv et al., 2003) (Anexo 2), lo cual deja ver que es una PCR sin interferentes de alguna posible contaminación, así como la posible presencia de genes asociados a la resistencia a antibióticos.

La frecuencia de aparición de amplificaciones positivas utilizando cebadores dirigidos a TetA, TetB, TetC y TetD para el antibiótico Tetraciclina, se asemejan a lo reportado por

Jahantigh et al. (2020), donde TetD tuvo el porcentaje más bajo de frecuencia encontrada en los microorganismos, por debajo del 1%, siendo en este estudio no reportado debido a la no amplificación de la secuencia de TetD. Por otro lado, los restantes cebadores (TetA, TetB y TetC) si hubo amplificación de al menos una muestra en el tamaño de pares de bases correspondiente (964 pb para TEM, 956 pb para TetA, 414 pb para TetB y 505 pb para TetC), sin embargo, no se obtuvo la amplificación en el tamaño esperado para Gram positivas en TetA de 956 pb, esto puede deberse a que representan transcritos no documentados o que corresponden a isoformas o genes de corte y empalme no reconocidos que contribuyen a la reactividad cruzada de los cebadores, dando como resultado una amplificación o sustitución de los transcritos esperados, además, que se requiere una temperatura de “annealing” alta de al menos 60 °C, ya que esto reduce la amplificación no específica, pero que luego la secuenciación confirma que el cebador está dirigido a la región deseada, dando validez a los puntos anteriores y que son reportados por Spandidos et al. (2008). En el caso de los cebadores TEM, SHV y OXA para el antibiótico Ampicilina, concuerda con lo obtenido por Latifpour et al (2016), donde el cebador TEM fue ampliamente encontrado en los microorganismos, aunque no ocurre lo mismo con el cebador SHV, el cual en dicho estudio si pudo ser encontrado, a diferencia de esta investigación. La no amplificación de algunos de los cebadores, puede estar asociado a que el microorganismo no presenta dicho gen de resistencia al antibiótico o debido a alguna inhibición en la PCR, ya que incluso el control positivo utilizado no amplifica el cebador, siendo esta inhibición relacionada a la baja pureza del ADN por la contaminación con sustancias orgánicas, proteínas y otra amplia gama de componentes que pueden encontrarse en los alimentos o que pueden incluirse durante la PCR de manera accidental (Schrader et al., 2012).

La amplificación del marcador molecular para Tetraciclina en microorganismos Gram negativos y Gram positivos, está acorde con lo que otras investigaciones indican, donde se reportan altos porcentajes de resistencia para dicho antibiótico (Puig et al., 2011; Ruiz-Roldán et al., 2018). Además, en este estudio se demuestra una mayor resistencia con el antibiótico Tetraciclina, coincidiendo con diferentes estudios, que determinan a este antibiótico como uno de los que más resistencia desarrollan los microorganismos (Fierro-Amature, Osorio-Amortegui, Fandiño de Rubio, Rondón-Barragán, 2011; Orozco-Mera et al., 2019). Por su parte, lo encontrado en este estudio para la cepa *S. aureus* coincide con lo

que indica Mendel (2015), donde esta cepa es altamente resistente a específicamente estos dos antibióticos.

La alta resistencia de los géneros de *Listeria spp* (*L. monocytogenes* y *Listeria welshimeri*) al antibiótico Ampicilina y en un menor porcentaje al antibiótico Tetraciclina, coincide con el estudio de Rajaei et al (2021) para el caso del primer antibiótico, mientras que no fue lo esperado para el caso del segundo antibiótico, pero donde de igual manera, si hay aislamientos del patógeno con marcadores de resistencia, aunque no en el mismo porcentaje. Ese mismo estudio de Rajaei et al (2021) es claro en señalar la matriz de la carne como una fuente común de aislamiento de este patógeno, tal como ocurre en esta investigación, y además, señala los vegetales y lácteos como otras fuentes comunes, lo cual coincide con las tres matrices de alimentos de las cuales se aisló este patógeno en este estudio.

El hecho de que *L. monocytogenes* sea el más aislado de los alimentos, puede deberse a que tiene la capacidad de crecer en condiciones de refrigeración, por lo cual, hace que cualquier alimento para consumo humano sea susceptible a contaminarse con este microorganismo durante un inadecuado procesamiento, transporte, almacenamiento o manipulación del producto, en especial aquellos que sean crudos, lleven un tratamiento térmico equivocado o lleven un procesamiento que implique el uso de herramientas, superficies de contacto o ambientes en donde pueda ocurrir contaminación cruzada por malas prácticas de higiene, como por ejemplo, el proceso que lleva la carne para hacerla molida, donde existe todo un post-proceso y en donde hay toda una cadena de puntos en los cuales podría inocularse el patógeno en el alimento (Doğruer et al, 2015).

En esta investigación el ADN de algunas de las bacterias Gram positivas amplificó con el marcador molecular para el antibiótico Ampicilina (TEM), lo cual está acorde al estudio de Puig et al. (2020), donde cepas como *S. aureus* tienen genes de resistencia en alimentos como los lácteos. Sin embargo, caso contrario ocurre con las bacterias Gram negativas, en las cuales no hubo amplificación alguna del marcador molecular para Ampicilina, mientras que el estudio de Puig et al (2020), señala como *Salmonella* y *E. coli* son los microorganismos más comunes de este grupo con alta resistencia a dicho antibiótico, pero está claro que esto puede deberse a que existen múltiples marcadores moleculares para Ampicilina y que específicamente el único utilizado en esta investigación, no arrojó los resultados esperados.

La bacteria *E. cecorum* coincide con lo que indican otros estudios, donde es comúnmente aislada de alimentos para consumo humano, siendo posible encontrarla en los lácteos. Además, es una bacteria con alta capacidad de ser resistente a los antibióticos, tal como quedó demostrado en la amplificación del marcador para ampicilina (Jung et al, 2018; Dapkevicius et al, 2021).

Ahora bien, estos microorganismos encontrados en alimentos para consumo humano provienen de distintas fuentes y generan resistencia a través de diferentes mecanismos. Hay estudios como los de Puig et al. (2011), Mendel (2015), Ruiz-Roldán et al (2018) y Puig et al. (2019) que son claros en señalar que la mayoría de los microorganismos encontrados en los alimentos, se dan por factores como el uso de heces como fertilizante de cultivos, el uso de antibióticos como promotor de crecimiento o eficiencia alimenticia, una mala manipulación por parte de las personas, es decir, en condiciones no higiénicas de manos, superficies y utensilios, o debido al uso de medios contaminados, como el suelo y el agua, para el regadío de cultivos o para el lavado de los productos , por ejemplo, vegetales y frutas o condiciones higiénicas subóptimas, lo cual tiene relación con alimentos de áreas muy manipulables, como lo son los lácteos y carnes en supermercados. Todas estas situaciones mencionadas pueden filtrar al medio ambiente pequeñas dosis de antibióticos a las cuales se ven expuestas los microorganismos y así seleccionar bacterias con mutaciones de resistencia y promover la transferencia de genes de resistencia a antibióticos entre otros tipos de microorganismos, como los analizados en esta investigación (Marshall & Levy, 2011). Además, en algunos casos, estos patógenos son resistentes a desinfectantes que hace que no sean eliminados de superficies y los alimentos se contaminen al pasar por el área con el patógeno (Orozco-Mera, Caro-Hernandez, Quimbaya, 2019).

También, la investigación de Jans et al. (2018) y Puig et al. (2019), enumeran otras posibles razones por las cuales los microorganismos analizados en esta investigación presentan resistencia a los antibióticos en estudio. Por ejemplo, la resistencia encontrada a dichos antibióticos puede estar asociada a transferencia de genes de resistencia a antimicrobianos por contaminación cruzada por mala manipulación y también puede darse en la microbiota intestinal humana, donde microorganismos no patógenos, transfieren dichos

genes a otros microorganismos patógenos que se encuentran en el cuerpo durante una infección, esto por diferentes mecanismos como las bombas de eflujo y protección ribosomal.

Otros estudios son claros en indicar que, algunos alimentos, en especial los procedentes de la agricultura, se ven afectados por los agroquímicos, biocidas, metales pesados, preservantes de comidas, tratamientos térmicos, fungicidas, antimicrobianos, entre otros. Por ejemplo, está documentado que el uso inapropiado de los antimicrobianos, específicamente en los sistemas primarios de la producción en agricultura, potencian la resistencia de los microorganismos patógenos en los alimentos (Cahill, Desmarchelier, Fattori, Bruno, Cannavan, 2017), mientras que, el uso de fungicidas en plantaciones de fresa para eliminar el moho como en el estudio de Mendel (2015), puede ocasionar resistencia de otros microorganismos como fue encontrado en esta investigación.

En el caso de bacterias como *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* y *Salmonella*, se ha visto como de acuerdo con el metal pesado (Zinc o cobre) o el biocida utilizado (antisépticos o desinfectantes), o mediante la combinación de estos, estas bacterias han desarrollado resistencia. Por ejemplo, según algunos estudios, como los de Cabrera (2007), Patiño et al (2018), Chacón-Jiménez & Rojas-Jiménez (2020), biocidas como clorhexidina, amonio cuaternario, triclosán y otros, han visto disminuido su efecto bactericida por el desarrollo de resistencia microbiana debido a las mutaciones, transferencia horizontal de genes, bombas de eflujo, biofilms o adquisición de material genético en plásmido o transposones.

Sin embargo, a pesar de estos hechos, este tipo de sustancias, como los metales pesados y los biocidas mencionados anteriormente, son utilizadas de manera extensiva e indiscriminada en la agricultura e industrias de alimentos, mientras que los metales pesados en áreas con animales como aditivo alimenticio, siendo en el área animal, donde normalmente se utilizan antibióticos para el tratamiento de animales enfermos; lo cual, sino se realiza correctamente, permite que las bacterias ahora más resistentes, puedan establecer paralelamente mecanismos que a su vez, permitan desarrollar resistencia a antibióticos, generando una problemática de propagación, incluso global (Vallejo et al, 2020; Founou et al, 2021).

También, el mal uso de dichas sustancias genera una alta contaminación ambiental y como consecuencia, favorece el desarrollo de resistencia antibiótica por parte de los microorganismos a través de diversos mecanismos de resistencia, por ejemplo, mutaciones

de genes que codifican dianas, transferencia horizontal de genes, inactivación, reducción de la permeabilidad en la capa de la membrana celular y lipopolisacáridos, reducción de la actividad de los canales de porina, la sobreexpresión de bombas eflujo, degradación o modificación enzimática de los antibióticos por medio de la hidrolización del anillo beta-lactámico, además de la formación de biofilms que proveen una estructura perfecta para la transferencia de elementos genéticos (Cahill et al, 2017).

Además, dentro de los orígenes en los cuales más comúnmente se encuentran microorganismos resistentes, Founou et al (2021) indica que provienen principalmente del medio acuático, ya que se considera como uno de los principales reservorios de antimicrobianos resistentes, ya que son una ruta de entrada en la cadena alimentaria, al ser los diferentes cuerpos acuáticos existentes, utilizados para la agricultura (cultivos, vegetales, frutas), desarrollo de animales (acuicultura) y alimentación de animales (granjas de cerdos, reces, pollos).

Asimismo, Founou et al. (2016) y Feiyang et al. (2021), indican en sus estudios que alimentos como los analizados en esta investigación son reservorios de dichas bacterias resistentes a múltiples antibióticos, debido a los diferentes nichos ecológicos en donde se encuentra una alta diversidad de microorganismos que coexisten entre sí. Es por esto que, según lo indican dichas investigaciones, la resistencia antimicrobiana está asociada a dos principales vías: fenotipo preexistente en las poblaciones bacterianas naturales que transfiere los genes resistentes a las células de la progenie por transferencia vertical de genes, o por resistencia adquirida con intercambios genéticos dentro y entre diferentes bacterias por transferencia horizontal de genes o por elementos móviles como plásmidos, integrones, transposones, secuencias de inserción o elementos relacionados con fagos a través de la conjugación, transformación o transducción.

Otra potencial fuente, es en países donde se detectan bacterias resistentes a antibióticos provenientes de animales y carne animal y son grandes exportadores de carne y animales a otros países, lo que favorece la propagación de la resistencia antimicrobiana. Además, estudios también indican que los turistas adquieren las bacterias resistentes a antibióticos por su consumo en alimentos en otros países como China, India, Tailandia, Brasil, Malasia y Sudáfrica, y que, al regresar a su país de residencia, realiza una propagación de estos genes

o genera problemas en centros médicos al ser una bacteria resistente nueva para el área (Founou et al, 2016).

Finalmente, la identificación de las amplificaciones obtenidas mediante secuenciación, permiten corroborar que los cebadores están dirigidos a la región deseada, esto según se pudo confirmar mediante un alineamiento de las secuencias en la base de datos del NCBI, dando una mayor seguridad en los resultados obtenidos y en la confirmación en la obtención de microorganismos patógenos aislados de alimentos para consumo humano que presentan resistencia a los antibióticos Tetraciclina y Ampicilina. Además, hay una estrecha relación entre los genes de Tetraciclina analizados en esta investigación (TetA, TetB y TetC) y el gen TetR obtenido en la secuenciación, ya que según reportan autores como Møller et al (2016) y Jagdmann et al (2022), este funge como represor de los otros genes, en especial de TetA como regulador transcripcional, de acuerdo con la concentración de la Tetraciclina, habiendo una relación entre dicha exposición a la tetraciclina y la expresión de resistencia a la tetraciclina a través de la codificación de bombas de eflujo (Balassiano et al, 2007).

6. Conclusiones

Los resultados de esta investigación demuestran que patógenos como *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella* spp y *L. monocytogenes* son encontrados en diversos alimentos de consumo humano, aislados mediante mecanismos bioquímicos de identificación.

Además, se evidencia la presencia de genes de resistencia a los antibióticos Ampicilina y Tetraciclina en bacterias como *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria welshimeri*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus cecorum*, detectados a través de la prueba PCR mediante marcadores moleculares específicos dirigidos a TEM, TetA, TetB y TetC y corroborados mediante secuenciación Sanger.

Esta investigación arrojó que los supermercados es el sitio de donde se aislaron más patógenos de alimentos para consumo humano, lo cual puede estar relacionado a una mala manipulación de los productos, principalmente de carne molida y vegetales. Aunque en la

mayoría de los lugares existen fuertes protocolos de manipulación de alimentos, lavado y desinfección durante la preparación, almacenamiento y venta de alimentos, queda demostrado que esto no ha sido suficiente para disminuir la presencia de bacterias patógenas en los alimentos, los cuales, a través de mecanismos como transferencia horizontal de genes, adquieren resistencia a antibióticos.

7. Recomendaciones

Se recomienda ampliar los análisis hacia una mayor cantidad de matrices de alimentos, que permita obtener determinar la posible presencia de estos patógenos en otros alimentos para consumo humano, y con ello monitorear posibles fuentes de contagio, sitios comunes de contaminación y el riesgo potencial de una mala manipulación al consumir estos.

En cuanto a las técnicas de extracción, se recomienda una vez realizada la extracción de ADN, analizar siempre los valores de pureza asociados a los coeficientes de absorbancia A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} , y, en caso de que se requiera repetir la extracción, esto para evitar la no amplificación de algún cebador dirigido a las regiones en estudio (en este caso los genes de resistencia) y con ello obtener un falso negativo.

Además, se recomienda la verificación de las amplificaciones obtenidas mediante secuenciación, tanto de las muestras amplificadas como de la cepa de control, y con ello verificar con una mayor exactitud que la amplificación corresponde al marcador molecular correspondiente, y/o en su defecto diseñar cebadores específicos. Además, se recomienda utilizar como controles positivos genes sintéticos, lo cual evita la manipulación de cepas multirresistentes en los ensayos y generando una mayor credibilidad de la presencia de la secuencia que se busca en el control.

Por último, utilizar una mayor gama de marcadores moleculares de los antibióticos Ampicilina y Tetraciclina, además de otros antibióticos, y con ello determinar con mayor robustez la presencia de estos en los alimentos, contribuyendo de esta forma en generar un mayor conocimiento sobre los sitios y los productos en Costa Rica de donde mayormente se

aíslan bacterias resistentes a antibióticos como posible fuente de información para los tomadores de decisiones en el manejo y manipulación de estos productos en el país.

8. Referencias

- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Andrews, W. H., Wang, H., Jacobson, A., & Hammack, T. (2018). Bacteriological Analytical Manual: Salmonella. Retrieved May 20, 2018, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>
- Angulo, F. J., Nunnery, J. A., & Bair, H. D. (2004). Antimicrobial resistance in zoonotic enteric pathogens. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 23(2), 485–496. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702715>
- Arlet, G., Rouveau, M., & Philippon, A. (1997). Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extendedspectrum beta-lactamase. *FEMS Microbiology Letters*, 152, 163–167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10423.x>
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., ... Bork, P. (2013). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174–180. <https://doi.org/10.1038/nature09944>. Enterotypes
- Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221. <https://doi.org/10.15517/am.v17i2.5163>
- Balassiano, I. T., Bastos, M. do C. de F., Madureira, D. J., Silva, I. G. da, Freitas-Almeida, Â. C. de, & Oliveira, S. S. de. (2007). The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7), 861–866. doi:10.1590/s0074-

- Balsalobre, B., & Hernández-Godoy, J. (2004). Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* aislados de alimentos de origen animal. *Revista de Salud Ambiental*, 4(1–2), 42–46. Retrieved from <http://www.ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/348>
- Barrantes, K., Chacón, L., Solano, M., & Achí, R. (2014). Class 1 Integrase and Genetic Cassettes bla_{oxa} and bla_{tem} among Multi-Drug Resistant *Shigella* Isolates in Costa Rica. *International Journal of Biological Sciences and Applications*, 1(1), 24–27
- Bennett, R. W., & Lancette, G. A. (2016). Bacteriological Analytical Manual: *Staphylococcus aureus*. Retrieved May 20, 2018, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>
- Bergman, M., Nyberg, S. T., Huovinen, P., Paakkari, P., & Hakanen, A. J. (2009). Association between Antimicrobial Consumption and Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 912–917. <https://doi.org/10.1128/AAC.00856-08>
- Bolaños, H., Acuña, M., Tijerino, A., Duarte, F., Sánchez, L., Dittel, I., ... Laboratorios de Bacteriología, R. N. (2014). *Informe de vigilancia basada en laboratorio de Salmonella, Costa Rica, 2013*. Tres Ríos, Costa Rica. Retrieved from <http://www.inciensa.sa.cr>
- Boza-Cordero, R., & Barrantes-Valverde, E. (2001). Resistencia bacteriana a antibióticos en el Hospital San Juan de Dios, 1995–1999. *Acta Médica Costarricense*, 43(3), 119–127.
- Cabrera, C. E., Gómez, R. F., & Zúñiga, A. E. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2), 149–158.
- Cabrera, R., Ruiz, J., Ramírez, M., Bravo, L., Fernández, A., Aladueña, A., ... Vila, J. (2006). Dissemination of *Salmonella enterica* serotype Agona and multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in Cuba. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74(6), 1049–1053. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16760518>

- Cahill, S., Desmarchelier, P., Fattori, V., Bruno, A., & Cannavan, A. (2017). Global Perspectives on Antimicrobial Resistance in the Food Chain. *Food Protection Trends*, 37(5), 353–360.
- Campuzano, S., Mejía, D., Madero, C., & Pabón, P. (2015). Determinación de la calidad microbiológica y sanitaria de alimentos preparados vendidos en la vía pública de la ciudad de Bogotá D.C. *NOVA*, 13(23), 81–92.
- Capita, R & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(1), 11-48. 10.1080/10408398.2010.519837.
- Capita, R., Castaño-Arriba, A., Rodríguez-Melcón, C., Iglesias, G., Poeta, P., & Alonso-Calleja, C. (2020). Diversity, Antibiotic Resistance, and Biofilm-Forming Ability of Enterobacteria Isolated from Red Meat and Poultry Preparations. *Microorganisms*, 8(8), 1226. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081226>.
- Chacón-Jiménez, Luz, & Rojas-Jiménez, Keilor. (2020). Resistencia a desinfectantes y su relación con la resistencia a los antibióticos. *Acta Médica Costarricense*, 62 (1), 7-12.
- Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., ... Meng, J. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant Salmonella Serovars Isolated from Retail Meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 1–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.1.1-7.2004>.
- Chiluisa, V., Coba, J., & Echeverría, A. (2014). Determinación por PCR en tiempo real de Escherichia coli en muestras de comida rápida. *La Granja: Revista de Ciencias de La Vida*, 19(1), 44–50.
- Colquechagua, F., Sevilla, C., & Gonzales, E. (2015). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(1), 26–32. Retrieved from <http://www.medicinabuenosaires.com/PMID/26502462.pdf>
- Cota-Rubio, E., Hurtado-Ayala, L., Pérez-Morales, E., & Alcántara-Jurado, L. (2014).

- Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(1), 75–85.
- Curiale, M. S., Sons, T., McIver, D., McAllister, J. S., Halsey, B., Roblee, D., & Fox, T. L. (1991). Dry Rehydration Film for Enumeration of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Food Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 74(4), 635–648.
- Dapkevicius, M.d.L.E., Sgardioli, B., Câmara, S.P.A., Poeta, P., & Malcata, F.X. (2021). Current Trends of Enterococci in Dairy Products: A *Comprehensive Review of Their Multiple Roles*. *Foods*, 10, 821. <https://doi.org/10.3390/foods10040821>
- De La Fuente, A., Romero, D., Cárdenas, O., & Álvarez, M. (2018). Diseño y evaluación de primers in silico del gen E1 del virus de chikungunya para Real-Time PCR (qPCR). *Revista CON-CIENCIA*, 6(1), 107-124
- Díaz, S., Ripoli, M., Peral-García, P., & Giovambattista, G. (2005). Marcadores genéticos para resistencia y susceptibilidad a enfermedades infecciosas en animales domésticos . Los Loci del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) como genes candidatos. *Analecta Veterinaria*, 25(1), 40–52.
- Doğruer, Y., Telli, N., Telli, A., & Güner, A. (2015). Presence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in retail meat and meat products. *International Journal of Biological Research*, 3(2), 76-81. doi:<http://dx.doi.org/10.14419/ijbr.v3i2.5323>
- Embid, A. (2002). Resistencia de las bacterias a los antibióticos. *Revista de Medicinas Complementarias, Medicina Holística.*, 53, 45–59. Retrieved from <http://www.amcmh.org/PagAMC/medicina/articulospdf/53ResistenciaBacterias.pdf>
- Feng, P., Weagent, S. D., & Grant, M. A. (2002). Bacteriological Analytical Manual: Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Retrieved May 20, 2018, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948.htm>
- Fernández Escudero, I. (2015). *Estudio sobre el comportamiento de bacterias patógenas entéricas vehiculadas por alimentos*. Universidad de Valladolid. Retrieved from <https://uvadoc.uva.es/bitstream/10324/16194/1/Tesis810-160222.pdf>

- Fierro-Amature, M., Osorio-Amortegui, C., Fandiño de Rubio, L., & Rondón-Barragán, I. (2011). Resistencia Antibiótica en Salmonella enterica serovar Typhimurium aisladas de granjas porcícolas en el departamento del Tolima. *Orinoquia* 15(1), 71-78.
- Founou, L., Founou, R., & Essack, S. (2016). Antibiotic Resistance in the Food Chain: A Developing Country-Perspective. *Frontiers in Microbiology* 7(1881). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Founou, L., Founou, R., & Essack, S. (2021). Antimicrobial resistance in the farm-to-plate continuum: more than a food safety issue. *Future Science OA*. 10.2144/fsoa-2020-0189
- Gail, Mónica. (23 de noviembre de 2022). *Las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos provocaron 7,7 millones de muertes en 2019*. Gaceta Médica. <https://gacetamedica.com/investigacion/las-infecciones-por-bacterias-resistentes-a-los-antibioticos-provocaron-77-millones-de-muertes-en-2019/#:~:text=Gaceta%20M%C3%A9dica-,Las%20infecciones%20por%20bacterias%20resistentes%20a%20los%20antibi%C3%B3ticos%20provocaron%207,millones%20de%20muertes%20en%202019&text=Las%20resistencias%20antimicrobianas%20son%2C%20actualmente,salud%20p%C3%BAblica%20a%20nivel%20mundial.>
- Gangar, V., Curiale, M. S., Lindberg, K., & Gambrel-Lenarz, S. (1999). Dry Rehydratable Film Method for Enumerating Confirmed Escherichia coli in Poultry, Meats, and Seafood: Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 82(1), 73–78.
- García-Álvarez, L., Holden, M., Lindsay, H., Webb, C., Brown, D., Curran, M., ... Holmes, M. (2011). Meticillin-resistant Staphylococcus aureus with a novel mecA homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. *The Lancet Infectious Diseases*, 11(8), 595–603. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70126-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8)
- García, C., Astocondor, L., & Banda, C. (2012). Enterobacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido: Situación en América Latina y en el Perú. *Acta Médica Peruana*, 29(3), 163–169.
- Gebreyes, W. A., Thakur, S., Davies, P. R., Funk, J. A., & Altier, C. (2004). Trends in

- antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), 997–1003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh247>
- Giménez, C. (2015). Diseño de cebadores degenerados para la caracterización de genes en *Musa*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 32, 191-208.
- Hanson, B. M., Dressler, A. E., Harper, A. L., Scheibel, R. P., Wardyn, S. E., Roberts, L. K., ... Smith, T. C. (2011). Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *Journal of Infection and Public Health*, 4(4), 169–174. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2011.06.001>
- Hitchins, A. D., Jinneman, K., & Chen, Y. (2017). Bacteriological Analytical Manual: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*. Retrieved May 20, 2018, from <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>
- Jagdmann, J., Andersson, D.I., & Nicoloff, H. (2022). Low levels of tetracyclines select for a mutation that prevents the evolution of high-level resistance to tigecycline. *PLOS Biology* 20(9): e3001808. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001808>
- Jahantigh, M., Samadi, K., Dizaji, R.E., & Salari, S. (2020). Antimicrobial resistance and prevalence of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolated from lesions of colibacillosis in broiler chickens in Sistan, Iran. *BMC Veterinary Research*, 16(267). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02488-z>
- Jans, C., Sarno, E., Collineau, L., Meile, L., Stärk, K.D.C., & Stephan, R. (2018). Consumer Exposure to Antimicrobial Resistant Bacteria From Food at Swiss Retail Level. *Frontiers in Microbiology* 9(362). doi: 10.3389/fmicb.2018.00362
- Johnson, R., & Mills, J. (2013). VIDAS® *Listeria monocytogenes* II (LMO2). *Journal of AOAC International*, 96(2), 246–250. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.GovVal05>
- Jung, A., Chen, L., Suyemoto, M., Barnes, J., & Borst, L. (2018). A Review of *Enterococcus cecorum* Infection in Poultry. *Avian Diseases* 62(3), 261-271. <https://doi.org/10.1637/11825-030618-Review.1>
- Kieun, L., Lee, M., Lim, J., Jung, J., Park, Y., & Lee, Y. (2008). Contamination of Chicken

- Meat with *Salmonella enterica* Serovar Haardt with Nalidixic Acid Resistance and Reduced Fluoroquinolone Susceptibility. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(11), 1853–1857. <https://doi.org/10.4014/jmb.0800.221>.
- Kilonzo-Nthenge, A., Rotich, E., & Nahashon, SN. (2013). Evaluation of drug-resistant Enterobacteriaceae in retail poultry and beef. *Poultry Science*, 92(4), 1098-1107. <https://doi.org/10.3382/ps.2012-02581>.
- Kinch, M. S., Haynesworth, A., Kinch, S. L., & Hoyer, D. (2014). An overview of FDA-approved new molecular entities: 1827-2013. *Drug Discovery Today*, 19(8), 1033–1039. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.03.018>
- Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., ... Yamaguchi, K. (2005). Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Farm Animals from 1999 to 2002: Report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3533–3537. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3533>
- Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., & Gutiérrez, G. (2009). *Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico*. (C. Rosell & D. Mejía, Eds.). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Retrieved from <http://www.fao.org/3/a-i0480s.pdf>
- Latifpour, M., Gholipour, A., & Damavandi, M. S. (2016). Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Nosocomial and Community-Acquired Urinary Tract Infections. *Jundishapur journal of microbiology*, 9(3), e31179. <https://doi.org/10.5812/jjm.31179>
- Leza-Leza, MT., Viquez-Ruiz, E., Barquero-Calvo, E., Sancho, C., & Umaña-Castro, R. (2022). Optimización de PCR de punto final y en tiempo real para la detección de *Salmonella enterica* serovar *Gallinarum* en aves de corral de Costa Rica. *Revista de Investigación UNED*, 14 (1), e3831. <https://doi.org/10.22458/urj.v14i1.3831>
- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T. M., Hasman, H., Magiorakos, A.-P., Mevius, D., ... Threlfall, J. (2013). Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing

- Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. *Clinical Infectious Diseases*, 56(7), 1030–1037. <https://doi.org/10.1093/cid/cis1043>
- López-Jácome, L. E., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidades*, 3(1), 10–18. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2014/ir141b.pdf>
- López, O., León, J., Jiménez, M., & Chaidez, C. (2009). Detección y resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Salmonella* en agua y suelo agrícola. *Revista Fitotecnica Mexicana*, 32(2), 119–126.
- Lorenz, T.C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, 63, doi:10.3791/3998
- 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*, 301(6), 500–505. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.02.004>
- Feiyang, M., Shixin, X., Zhaoxin, T., Zekun, L., & Lu, Z. (2021). Use of antimicrobials in food animals and impact of transmission of antimicrobial resistance on humans. *Biosafety and Health* 3(1), 32-38. <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2020.09.004>.
- Malik, Y. S., Olsen, K., Kumar, K., & Goyal, S. M. (2003). In Vitro Antibiotic Resistance Profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* Strains Isolated from Minnesota Turkeys During 1996-2002. *Avian Diseases*, 47(3), 588–593. <https://doi.org/10.1637/6086>
- March-Rosselló, G. A. (2017). Métodos rápidos para la detección de la resistencia bacteriana a antibióticos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.12.005>
- Marrero-Moreno, C. M., Mora-Llanes, M., Hernández-Fillor, R. E., Báez-Arias, M., García-Morey, T., & Espinosa-Castaño, I. (2017). Identificación de enterobacterias productoras

- de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) en instalaciones porcinas de la provincia Matanzas. *Revista Salud Animal*, 39(3), 1–16.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 718–733. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-11>
- Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: Causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(Supl 4), 4–9. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70035-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70035-5)
- Matlock, B. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. Thermo Fisher Scientific Inc. Recuperado de: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.
- Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., ... Harel, J. (2004). Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5444–5452. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5444>
- McMahon, W. A., Aleo, V. A., Schultz, A. M., Horter, B., & Lindberg, K. (2003). 3M™ Petrifilm™ Staph Express Count Plate for the Rapid Enumeration of *Staphylococcus aureus* in Foods – Collaborative Study. *Journal of AOAC International*, 86(5), 947–953.
- Mendel, F. (2015). Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(15), 3805–3822. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00778>
- Ministerio de Salud. (2011). *Política Nacional para la Seguridad Alimentaria y Nutricional 2011-2021* (1ª ed). San José, Costa Rica. Retrieved from file:///D:/SkyDrive/Administaci%20n%20M%20dica/msal.gov.ar/Res.779_msal_gov_ar.pdf
- Miranda, C. D., Kehrenberg, C., Ulep, C., Schwarz, S., & Roberts, M. C. (2003). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), 883–888. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.883->

- Møller, T. S., Overgaard, M., Nielsen, S. S., Bortolaia, V., Sommer, M. O., Guardabassi, L., & Olsen, J. E. (2016). Relation between tetR and tetA expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, 16(39). <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0649-z>
- Moodley, A., & Guardabassi, L. (2009). Transmission of IncN plasmids carrying blaCTX-M-1 between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(4), 1709–1711. <https://doi.org/10.1128/AAC.01014-08>
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342011000400013>
- Mubarak, S., Al-Koofee, D., Radhi, O., Ismael, J., & Al-Zubaidi, Z. (2020). An Optimization and Common Troubleshooting Solving in Polymerase Chain Reaction Technique. *Systematic Review Pharmacy*, 11(2): 427 436. DOI: 10.5530/srp.2020.2.63
- Newsome, T., Li, B. J., Zou, N., & Lo, S. C. (2004). Presence of bacterial phage-like DNA sequences in commercial Taq DNA polymerase reagents. *Journal of clinical microbiology*, 42(5), 2264–2267. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.2264-2267.2004>
- Nucleótido [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; [2009] - [citado 2023 Feb 11]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GQ343144.1/>
- Nucleótido [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; [2022] - [citado 2023 Feb 11]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/OM977025.1/>
- Nucleótido [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; [2022] - [citado 2023 Feb 11]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_061611.1
- Nucleótido [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro

- Nacional de Información Biotecnológica; [2016] - [citado 2023 Feb 11]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/KT400656.1/>
- Nucleótido [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE. UU.), Centro Nacional de Información Biotecnológica; [2020] - [citado 2023 Abr 01]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MN370009.1>
- Olesen, I., Hasman, H., & Aarestrup, F. (2004). Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 10(4), 334-340.
- Oliveira, M., Reginato, A., Ruschel, L., Pilotto, F., De Moraes, H., Pippi, C. T., ... Pinheiro, V. (2006). Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(3), 368–371. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300030>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2021). *Resistencia a los antimicrobianos*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#:~:text=La%20OMS%20ha%20declarado%20que,la%20aparici%C3%B3n%20de%20pat%C3%B3genos%20farmacorresistentes.>
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). (2021). *La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial*. Organización Mundial de la Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
- Orozco-Mera, J., Caro-Hernandez, P., & Quimbaya, M. (2019). Evaluación de la Resistencia a Antibióticos y Desinfectantes en Bacterias Aisladas de Locaciones Formales e Informales de Preparación y Ventas de Alimentos. Pontificia Universidad Javeriana Cali.
- Pantosti, A. (2012). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. *Frontiers in Microbiology*, 3(127), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00127>

- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 4943–4960. <https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11>
- Patiño, D., Pérez, L., Torres M., Rosas, D., & Filippo, G. (2018). Uso de biocidas y mecanismos de respuesta bacteriana. *Revista Cubana de Investestigaciones Biomédicas*, 37(3), 1-17.
- Pincus, D. H. (2010). *Microbial identification using the bioMérieux VITEK® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods*. Hazelwood, MO, USA. Retrieved from https://store.pda.org/tableofcontents/ermm_v2_ch01.pdf
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Poutou, R., Burbano, M., Sierra, S., Torres, K., Carrascal, A.K., & Mercado, M. (2005). Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *UNIVERSITAS SCIENTIARUM Revista de la Facultad de Ciencias*, 10(2), 61-78
- Puig, Y., Espino, M., & Leyva, V. (2011). Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. *Panorama Cuba y Salud*, 6(1), 30–38.
- Puig, Y., Leyva, V., Aportela, N., Camejo, A., & Tejedor, R. (2019). Resistencia antimicrobiana en bacterias aisladas de pescados y mariscos. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(3), 500-512.
- Puig-Peña, Y., Leyva-Castillo, V., Tejedor-Arias, R., Illnait-Zaragoz, MT., Aportela-López, N., Camejo-Jardines, A., & Ramírez-Areces, J. (2020). Antimicrobial resistance in bacteria isolated in foods in Cuba. *MEDICC Rev* 22(3), 41–45. <https://doi.org/10.37757/MR2020.V22.N3.9>
- QIAGEN®. (2016). *mericon™ DNA Bacteria Handbook*. Retrieved from file:///C:/Users/Esleyder Lobo/Downloads/slides_tips_mericon-dna-bacteria-

handbook.pdf

- Quizhpe, A., Encalada, L., Sacoto, A. M., Calvo, D. M., Lara, M. C., Guevara, A. J., ... Sivaraman, S. (2014). Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana. *Afeme*, 168. Retrieved from <http://www.reactgroup.org/uploads/react/resources/854/Uso-Apropiado-de-Antibioticos-y-Resistencia-Bacteriana.pdf>
- Rajaei, M., Moosavy, MH., Gharajalar, S., & Khatibi, S. (2021). Antibiotic resistance in the pathogenic foodborne bacteria isolated from raw kebab and hamburger: phenotypic and genotypic study. *BMC Microbiology* 21(272). <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02326-8>
- Rodicio, M. R., & Mendoza, M. C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238-245
- Rodríguez, C. H., de Mier, C., Bogdanowicz, E., Caffer, M. I., Garcia, S., Lasala, M. B., ... Famiglietti, A. (2007). Salmonelosis extraintestinal: clínica, epidemiología y resistencia antimicrobiana. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(3), 379–383
- Rojas-Herrera, R. A., & González-Flores, T. (2006). Detección e identificación de bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. *Bioquímica*, 31(2), 69–76. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2006/bq062e.pdf>
- Ruiz-Roldán, L., Martínez-Puchol, S., Gomes, C., Palma, N., Riveros, M., Ocampo, K., Durán, D., Ochoa, Theresa., Ruiz, J., & Pons, M. (2018). Presencia de Enterobacteriaceae y Escherichia colimultirresistente a antimicrobianos en carne adquirida en mercados tradicionales en Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*; 35(3):425-32. doi:10.17843/rpmesp.2018.353.3737.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schell, C. M. (2011). *Bacterias zoonóticas y alimentos* (Temas de Z). Buenos Aires,

- Argentina: Asociación Argentina de Zoonosis. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/233796159>
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., & Obst, U. (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43, 325–335.
- SENASA. (2017). *Protocolo de vigilancia de Salmonella en aves reproductoras*. Costa Rica. <https://doi.org/PN-AVI-PV-04>
- Sengeløv, G., Agersø, Y., Halling-Sørensen, B., Baloda, S. B., Andersen, J. S., & Jensen, L. B. (2003). Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment international*, 28(7), 587–595. [https://doi.org/10.1016/s0160-4120\(02\)00084-3](https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00084-3)
- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: Una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105–122. <https://doi.org/10.14482/sun.32.1.8598>
- Spandidos, A., Wang, X., Wang, H., Dragnev, S., Thurber, T., & Seed, B. (2008). A comprehensive collection of experimentally validated primers for Polymerase Chain Reaction quantitation of murine transcript abundance. *BMC Genomics*, 9(633). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-633>
- Suárez-Contreras, L., & Yañez-Meneses, L. (2018). Extracción de ADN de bacterias conservadas en el banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Campos Elíseos. *Respuestas*, 23 (S1), 24-28. <https://doi.org/10.22463/0122820X.1496>
- Tabatabaei, R. R., & Nasirian, A. (2003). Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of E. coli isolated from chicken flocks. *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, 2(2), 39–42. Retrieved from <http://ijpt.tums.ac.ir/index.php/ijpt/issue/view/25>
- Tafur, D., & Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3), 217–226. <https://doi.org/http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua->

cuba/mecanismos_de_resistencia_a_los_antibioticos_en_bacterias_gram_negativas.pdf

- Thomas, G. (2014). WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. Retrieved May 2, 2018, from <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>
- Torres, C., & Zarazaga, M. (2007). Infecciones por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): un desafío epidemiológico y terapéutico. BLLE en animales y su importancia en la transmisión a humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(Supl.2), 29–37.
- Ushida, K., Segawa, T., Kohshima, S., Takeuchi, N., Fukui, K., Li, Z., & Kanda, H. (2010). Application of real-time PCR array to the multiple detection of antibiotic resistant genes in glacier ice samples. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 56(1), 43–52. <https://doi.org/10.2323/jgam.56.43>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., Vargas-Albores, F., & Harris, C. (2015). El gen ARNr 16S en el estudio de comunidades microbianas marinas. *Ciencias marinas*, 41(4), 297–313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Vallejo, M., Gil, M., Parada, R., Marguet, E. (2020). Resistencia a metales pesados y antimicrobianos en cepas de enterococos aisladas de cerdos del Valle Inferior del Río Chubut - Argentina. *Revista Colombiana de Ciencia Animal RECIA*, 12(2), 3–11. DOI: <https://doi.org/10.24188/recia.v12.n2.2020.763>
- Vanegas, M., Correa, N., Morales, A., Martínez, A., Rúgeles, L., & Jiménez, F. (2009). Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. *Revista MVZ Córdoba*, 14(2), 1677–1683. Retrieved from Dialnet-Resistencia Antibioticos Bacterias AisladasDeBiope-3232000.pdf
- Verraes, C., Van Boxtael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M. A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>

- Walsh, F., Ingenfeld, A., Zampiccoli, M., Hilber-Bodmer, M., Frey, J. E., & Duffy, B. (2011). Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods*, 86(2), 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.04.011>
- Waters, S. H., Rogowsky, P., Grinsted, J., Altenbuchner, J., & Schmitt, R. (1983). The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. *Nucleic acids research*, 11(17), 6089–6105. <https://doi.org/10.1093/nar/11.17.6089>
- WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). (2012). *Critically Important Antimicrobials for Human Medicine - 3rd Revision 2011*. World Health Organization. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Zahraei Salehi, T., & Farashi Bonab, S. (2006). Antibiotics Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* Strains Isolated from Chickens with Colisepticemia in Tabriz Province, Iran. *International Journal of Poultry Science*, 5(7), 677–684.
- Zhang, L., Huang, Y., Zhou, Y., Buckley, T., & Wang, H. H. (2013). Antibiotic administration routes significantly influence the levels of antibiotic resistance in gut microbiota. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(8), 3659–3666. <https://doi.org/10.1128/AAC.00670-13>
- Zhang, L., Kinkelaar, D., Huang, Y., Li, Y., Li, X., & Wang, H. H. (2011). Acquired antibiotic resistance: Are we born with it? *Applied and Environmental Microbiology*, 77(20), 7134–7141. <https://doi.org/10.1128/AEM.05087-11>

9. Anexos

Anexo 1. Información de cepa utilizada como control positivo

Nombre	Código	Antimicrobiano	CIM	Interpretación
<i>Escherichia coli</i>	0808180175	Ampicilina	>16	Interpretación predictiva resistente
		Tetraciclina	>8	Resistente
<i>Escherichia coli</i>	M74B	Ampicilina	>5	Resistente
		Tetraciclina	>5	Resistente

<i>Escherichia coli</i>	M96A	Ampicilina	>8	Resistente
		Tetraciclina	>8	Resistente

Anexo 2. Marcadores moleculares utilizados en la prueba de resistencia a antibióticos

Antibiótico	Descripción	Nombre	Secuencia	Tamaño esperado	Referencia
Tetraciclina	TetA cebador1	Cebador 173	5'-GTAATTCTGAGCACTGTCGC-3'	956 pb	Waters et al., 1983
	TetA cebador 2	Cebador 175	5'-CTGCCTGGACAACATTGCTT-3'		
	TetB- Tn10=, 39- >58	Cebador 90	5'-CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3'	414 pb	Sengeløv et al., 2003
	TetB- Tn10=, 454- >434	Cebador 91	5'-ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'		
	TetC,595- >576	Cebador 92	5'-GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC-3'	505 pb	Sengeløv et al., 2003
	TetC,90- >110	Cebador 93	5'-CCTCTTGCGGGATATCGTCC-3'		
	Tet D2 (894-874)	Cebador 575	5'-CATCCATCCGGAAGTGATAGC-3'	505 pb	Miranda et al., 2003
	Tet D1 (459-478)	Cebador 576	5'-GGATATCTCACCGCATCTGC-3'		
Ampicilina	TEM front P1	Cebador 757	5'-GCGGAACCCCTATTTG-3'	964 pb	Olesen et al., 2004; Moodley & Guardabassi, 2009
	TEM-C-R- ny	Cebador 686	5'-ACCAATGCTTAATCAGTGAG-3'		
	SHV OS5	Cebador 1545	5'-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3'	795 pb	Arlet et al., 1997
	SHV 06S	Cebador 1546	5'-GATTTGCTGATTCGCTCGG-3'		
	OXA-48-F	Cebador 2641	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3'	564 pb	Poirel et al., 2011

	OXA-48-R	Cebador 2642	5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'		
--	----------	-----------------	----------------------------	--	--

Anexo 3. Perfiles térmicos de las reacciones PCR

Marcador molecular	Perfil térmico				
	Etapa 1 (Temperatura, tiempo y ciclos)	Etapa 2 (Temperatura, tiempo y ciclos)			Etapa 3 (Temperatura, tiempo y ciclos)
16S	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 13 segundos 36X	60.0 °C 30 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
TetA	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	57.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
TetB	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	57.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
TetC	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	67.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
TetD	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	62.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
TEM	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	62.0 °C 7 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
SHV	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	67.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X
OXA	95.0 °C 1 minuto 1X	95.0 °C 15 segundos 36X	62.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 45 segundos 36X	72.0 °C 7 minutos 1X

Anexo 4. Información del alimento y su lugar de procedencia

Número de muestra	Alimento	Lugar de procedencia	Microorganismo aislado y porcentaje de confianza
Bacterias Gram negativas			
1	Fruta de pan	Productora	<i>Enterobacter aerogenes</i> (93%)
2	Carne molida de cordero	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
3	Carne molida de res	Supermercado	<i>Enterobacter aerogenes</i> (94%)
4	Bistec solomo de res	Supermercado	Grupo de <i>Salmonella</i> (99%)
5	Fruta de pan	Productora y distribuidora	Grupo de <i>Salmonella</i> (99%)
6	Semolina de arroz	Arrocera	<i>Salmonella entérica spp arizonae</i> (98%)
7	Ensalada de fresas	Restaurante	<i>Salmonella entérica spp arizonae</i> (89%)
8	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
9	Pico de gallo	Comedor	<i>Escherichia coli</i> (99%)
10	Queso mozzarella	Distribuidora de queso	<i>Escherichia coli</i> (99%)
11	Carne mechada de res	Panificadora	<i>Escherichia coli</i> (92%)
12	Fruta de pan	Procesadora-productora	<i>Escherichia coli</i> (99%)
13	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
14	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
15	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
16	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
17	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
18	Pejibaye fresco cocinado	Supermercado	<i>Escherichia coli</i> (99%)
19	Sopa de tortilla	Restaurante	<i>Salmonella entérica spp arizonae</i> (99%)
20	Carne molida de cordero	Supermercado	<i>Salmonella entérica spp entérica</i> (87%)
21	Carne molida de cordero	Supermercado	<i>Salmonella entérica spp entérica</i> (99%)
22	Carne molida de cerdo	Restaurante	<i>Salmonella entérica spp arizonae</i> (99%)
Bacterias Gram positivas			
1	Pan casero con queso	Comedor	<i>Staphylococcus aureus</i> (95%)
2	Lechuga americana	Restaurante	<i>Staphylococcus aureus</i> (95%)
3	Queso Turrialba	Distribuidora de queso	<i>Enterococcus cecorum</i> (98%)

4	Queso Turrialba	Distribuidora de queso	<i>Enterococcus cecorum</i> (98%)
5	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria welshimeri</i> (99%)
6	Carne molida de ternero	Supermercado	<i>Listeria welshimeri</i> (99%)
7	Carne molida de cordero	Supermercado	<i>Listeria welshimeri</i> (99%)
9	Brócoli	Foodservice	<i>Listeria monocytogenes</i> (89%)
10	Brócoli	Foodservice	<i>Listeria monocytogenes</i> (95%)
11	Brócoli	Foodservice	<i>Listeria monocytogenes</i> (95%)
12	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (98%)
13	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (97%)
14	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (97%)
15	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (97%)
16	Carne rostizada	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (99%)
17	Carne rostizada	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (98%)
18	Queso Mozzarella	Distribuidora de queso	<i>Listeria monocytogenes</i> (98%)
19	Brócoli	Foodservice	<i>Listeria monocytogenes</i> (98%)
20	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (97%)
21	Brócoli	Restaurante	<i>Listeria monocytogenes</i> (92%)
22	Carne molida de res	Supermercado	<i>Listeria monocytogenes</i> (97%)

Anexo 5. Cantidad de muestras aisladas por lugar de procedencia y alimento para consumo humano

Lugar de procedencia	Alimento	Cantidad de muestras
Supermercado	Carne molida (cordero, res, ternero)	12
	Bistec de res	1
	Pejibaye	5
	Carne rostizada	2
Restaurante	Fresas	1
	Sopa de tortilla	1
	Lechuga	1
	Carne molida (cerdo)	1
Distribuidora	Fruta de pan	2
	Queso mozzarella	2

	Queso Turrialba	2
Foodservice	Brócoli	5
Procesadora	Fruta de pan	1
Arrocera	Semolina de arroz	1
Panificadora	Carne mechada de res	1
Comedor	Pico de gallo	1
	Pan casero con queso	1