

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA



**PREVALENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A
ANTIBIÓTICOS Y
ENTEROTOXIGÉNICO EN LA CADENA PRODUCTIVA AVÍCOLA.**

POR

JAVIER IGNACIO LAGOS CARRASCO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA

**PREVALENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A
ANTIBIÓTICOS Y
ENTEROTOXIGÉNICO EN LA CADENA PRODUCTIVA AVÍCOLA.**

POR

JAVIER IGNACIO LAGOS CARRASCO

**MEMORIA PRESENTADA A LA
FACULTAD DE AGRONOMÍA DE LA
UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÓNOMO.**

**CHILLÁN – CHILE
2024**

Aprobada por:

Profesor guía, Valeria Velasco P.
Ing. en Alimentos, Mg., Ph.D.

Profesor Asociado, Pamela Williams S.
Ing. Agrónomo, Dr. Cs. Agrarias

Profesor Asociado, Macarena Gerding G.
Ing. Agrónomo, PhD.

Profesor Asociado, Guillermo Wells M.
Ing. Agrónomo, Mg. Sc.

RECONOCIMIENTOS

Tesis financiada por el proyecto 202.100.0173INV, aprobado en el CONCURSO VRID INVESTIGACIÓN 2021.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Resumen	1
Summary	2
Introducción	2
Materiales y Métodos	6
Resultados y Discusión	12
Conclusiones	19
Referencias	20
Apéndices	26

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura 1 Electroforesis para genes asociados a enterotoxinas.....	19
Tabla 1 Determinación del tamaño de la muestra.....	7
Tabla 2 Mecanismos de acción, grupos o clases de antibióticos	11
Tabla 3 Prevalencia de <i>S. aureus</i> en la cadena productiva avícola.....	13
Tabla 4 Susceptibilidad a antibióticos de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de la cadena productiva avícola.....	15

PREVALENCIA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS Y ENTEROTOXIGÉNICO EN LA CADENA PRODUCTIVA AVÍCOLA.

PREVALENCE OF ANTIBIOTIC-RESISTANT AND ENTEROTOXIGENIC *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN THE POULTRY PRODUCTION CHAIN.

Palabras índice adicionales: Enterotoxinas, enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), gen *nuc*, One Health, PCR, resistencia antimicrobiana.

RESUMEN

Staphylococcus aureus es una bacteria que se encuentra presente, principalmente en fosas nasales, piel de humanos y animales. Diversos estudios han determinado la prevalencia de cepas resistentes a antibióticos y productoras de enterotoxinas. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *S. aureus* resistente a antibióticos y enterotoxigénico en la cadena productiva avícola. Se recolectaron 356 muestras de aves (n=120), carne (n=98), y huevos (n=138). El aislamiento de *S. aureus* se realizó mediante cultivo selectivo y PCR. Además, mediante el análisis filogenético Fingerprinting, se seleccionaron cepas para determinar susceptibilidad a antibióticos y genes asociados a enterotoxinas mediante PCR. Se determinó una prevalencia total de *S. aureus* de 13,5% (48/356) en la cadena productiva avícola. Se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en el tipo de manejo (convencional o libre de jaula) en las muestras de piel y huevos, siendo mayor en los sistemas convencionales. En la carne envasada y no envasada también se presentó diferencia significativa ($P \leq 0,05$), siendo mayor en la carne no envasada. De 8 cepas seleccionadas, 6 resultaron ser resistentes a antibióticos y 4 fueron multirresistentes y 2 serían posiblemente positivas a enterotoxinas SEA, SEB Y SED. Por lo tanto, en la cadena productiva avícola existe presencia de *S. aureus* resistente a antibióticos y posiblemente enterotoxigénico.

SUMMARY

Staphylococcus aureus is a bacterium found primarily in the nostrils and skin of humans and animals. Various studies have determined the prevalence of antibiotic-resistant and enterotoxin-producing strains. The aim of this study was to determine the prevalence of antibiotic-resistant and enterotoxigenic *S. aureus* in the poultry production chain. 356 samples of poultry (n=120), meat (n=98) and eggs (n=138) were collected. *S. aureus* was isolated by selective culture and PCR. In addition, strains were selected by phylogenetic fingerprinting to determine antibiotic susceptibility and genes associated with enterotoxins by PCR. The overall prevalence of *S. aureus* in the poultry production chain was 13.5% (48/356). There were significant differences ($P \leq 0.05$) in the type of management (conventional or cage-free) in skin and egg samples, being higher in conventional systems. There was also a significant difference ($P \leq 0.05$) between packaged and unpackaged meat, which was greater in unpackaged meat. Of the 8 selected strains, 6 were found to be resistant to antibiotics, 4 were multiresistant and 2 were potentially positive for SEA, SEB and SED enterotoxins. Therefore, there is a presence of antibiotic-resistant and possibly enterotoxigenic *S. aureus* in the poultry production chain.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas a través de los alimentos (ETAs) se han acrecentado en los últimos años, generando problemas en la salud pública y gastos económicos en los países afectados. Este aumento se debe al cambio en hábitos alimenticios y a la creciente demanda global de alimentos. El problema aumenta al existir una mayor resistencia bacteriana a los antibióticos, generando muertes a nivel mundial por brotes asociados a deficientes controles de inocuidad en los procesos de producción, transformación y distribución de alimentos (Palomino-Camargo *et al.*, 2018). La intoxicación alimentaria estafilocócica es uno de los tipos de intoxicaciones alimentarias más frecuente en todo el mundo, causada por la ingestión de algún tipo de enterotoxina estafilocócica (SEs).

Staphylococcus aureus es una bacteria causante de diversas enfermedades infecciosas y es la segunda causante de intoxicación alimentaria más común después de *Salmonella* spp., causada por la ingesta de enterotoxinas producidas por esta bacteria. El género *Staphylococcus* debe su nombre a Alexander Ogston por la unión de las palabras Staphylo (del griego staphylé), que significa racimo de uvas y coccus (del griego kókkos) que significa gránulos (Cervantes-García *et al.*, 2014). Es anaeróbica facultativa, lo que quiere decir que puede sobrevivir en presencia o ausencia de oxígeno, es inmóvil, ya que no posee flagelos ni estructuras que le permitan desplazarse, no produce esporas y es productora de enzimas como la catalasa y coagulasa (Fabian, 2020). Principalmente, esta bacteria tiende a colonizar zonas cutáneas y mucosas de humanos y animales.

Las enterotoxinas estafilocócicas (SEs) son consideradas superantígenos por tener la capacidad de unirse al complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) en las células presentadoras de antígenos (APC), y a los receptores de las células T (TCR) de manera no específica y pueden activar un gran número de células T del sistema inmunológico (Benkerroum, 2018). Las SEs son proteínas simples de bajo peso molecular, termotolerantes y resistentes a la acción de las enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal humano manteniendo así su actividad biológica. El consumo de alimentos contaminados con SEs puede causar gastroenteritis y además, estas enterotoxinas estimulan el peristaltismo intestinal y ejercen un efecto sobre el sistema nervioso central, debido a la liberación excesiva de citoquinas que se manifiesta como náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, cefalea y sudoración (Márquez Ramos, 2012). Para mejorar la caracterización de SEs, se han integrado varias técnicas en la estrategia de diagnóstico, siendo los métodos más utilizados para detectar toxinas bacterianas en alimentos: bioensayos, molecular y biología inmunológica. La biología molecular basada en PCR es un método viable, más rápido y con resultados concluyentes (Silva *et al.*, 2017).

S. aureus produce distintas enterotoxinas, las cuales pueden permanecer estables en ambientes con condiciones adversas, como altas y bajas temperaturas. Además, pueden subsistir en un amplio rango de pH, desde 4 a 10. Una de las principales enterotoxinas que produce es la enterotoxina A (SEA), la cual es causal

de un alto porcentaje de las intoxicaciones alimentarias en varios países, y con la ingesta de cerca de 100 ng ya es suficiente para que se generen síntomas toxicológicos como náuseas, mareos, vómitos y diarrea (Upadhyay y Nara, 2018).

S. aureus se ha encontrado en variados productos como carne, pescado y lácteos. Esto implica un alto riesgo para la salud, debido a que los productos alimenticios pasan por procesos de calentamiento para eliminar posibles patógenos, pero al producirse SEA es probable que esta no se elimine por completo debido a su tolerancia al calor (Fujikawa, 2021).

A lo largo de la historia ha quedado en evidencia que la introducción de un nuevo antibiótico suele ir de la mano del desarrollo de resistencia bacteriana a estos, ya que el uso de antibióticos proporciona el potencial para la selección de cepas resistentes. Una de las principales razones del desarrollo de resistencia antimicrobiana (RAM) son en primer lugar el uso de antimicrobianos en forma excesiva, por ejemplo, el uso desmedido en infecciones menores o en producción animal, debido a un mal uso a falta de conocimiento o acceso a un tratamiento adecuado (Schito, 2006).

La resistencia bacteriana es una capacidad que demuestra un microorganismo para defenderse contra uno o varios antibióticos, mediante mecanismos que disminuyen la capacidad microbicida o inhibitoria de dichos medicamentos (Bisso-Andrade, 2018).

Un mecanismo de resistencia a la meticilina en *S. aureus*, está relacionado con la síntesis de PBP2a una proteína de unión a la penicilina 2a, la cual es una enzima que actúa en la formación de la pared celular bacteriana, específicamente en la biosíntesis de peptidoglicano, un polímero que conforma la estructura de la pared bacteriana. Esta enzima presenta un bajo nivel de afinidad con la mayoría de los antibióticos betalactámicos, los cuales actúan inhibiendo la síntesis de peptidoglicano (Ali *et al.*, 2021).

Otra característica importante de esta bacteria es que ha desarrollado, a través de la selección natural, resistencia a antibióticos como la penicilina (PRSA), la meticilina (MRSA), entre otros (Nazari *et al.*, 2015).

La industria de la carne de pollo y otros productos derivados del pollo, como huevos e hígados son, en muchas partes del mundo, la principal fuente de proteínas, sobre todo si existe escasez de carnes rojas y no obstante, durante las diferentes etapas de la cadena productiva de estos alimentos, pueden contaminarse con patógenos y toxinas que al ser ingeridos, pueden provocar intoxicación alimentaria (Darwish *et al.*, 2018).

La importancia de evaluar la prevalencia de *S. aureus* resistente a antibióticos y enterotoxigénico en la cadena productiva avícola se basa en que no existen muchos estudios al respecto en Chile, ya que, si bien ha sido investigada en productos alimenticios, como la carne de cerdo, no hay registros de su prevalencia en la cadena productiva avícola, como lo son las aves, la carne, los huevos. Cabe destacar que desde el año 1998, la carne de aves es la preferida por los consumidores nacionales, desplazando a la carne de bovinos. El consumo per cápita de carne es de 78,6 kg por persona en Chile, 34,1 kg de ellos equivalen al consumo de carne de ave (ChileCarne, 2024). Por otro lado, el consumo de huevo alcanza los 230 huevos por habitante al año (Aguirre y Pizarro, 2018). Lo anterior se debería a los grandes avances de la industria, que llegó a los consumidores con un producto que económicamente es más atractivo que las otras fuentes de proteínas. Además, se ha posicionado como un producto saludable y de fácil preparación (ODEPA, 2012). Dado estas circunstancias es sumamente importante determinar la prevalencia de *S. aureus*, en la cadena productiva avícola, para saber si las pequeñas y grandes empresas del rubro productivo avícola cumplen con los estándares de sanidad y los protocolos para evitar la presencia de cepas bacterianas potencialmente peligrosas para la salud humana, las cuales son capaces de volverse menos susceptibles a una o más clases de antibióticos, lo que dificulta el tratamiento de las infecciones que causan. *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) es reconocido como el pionero entre las bacterias multirresistentes. Este microorganismo exhibe resistencia a prácticamente todos los antibióticos betalactámicos y puede manifestar también resistencia a otras categorías fundamentales de agentes antimicrobianos, como las fluoroquinolonas (Gajdács, 2019).

La emergencia de las bacterias multirresistentes destaca la importancia del enfoque *One Health*, que aborda las interconexiones entre la salud humana, animal y ambiental en un sistema biológico y social. Este sistema involucra a diversos actores y procesos, así como sus interacciones a lo largo del tiempo, a niveles local, nacional y global, buscando unificar el conocimiento de diferentes instituciones públicas, privadas y de investigación, con el fin de buscar mejores soluciones a problemas sociales y de salud pública desde una perspectiva multiprofesional, que permita desarrollar políticas públicas a partir de prácticas integradas, que garanticen una mejor aceptabilidad y relevancia de las medidas de salud pública (de Macedo Couto y Brandespim, 2020).

A pesar de la existencia de estudios internacionales asociados a prevalencia de *S. aureus* y su resistencia a los antibióticos, en Chile no hay estudios acerca de estos parámetros en los productos derivados de las aves. El objetivo de este estudio fue determinar la prevalencia de *S. aureus* resistente a antibióticos y enterotoxigénico en la cadena productiva avícola de las regiones de Ñuble y Biobio

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron muestras al azar de gallinas ponedoras, pollos de carne y huevos en planteles en confinamiento (sistema convencional) y sistemas libres de jaulas en la región de Ñuble y Biobio además, muestras de carne y huevos de supermercados y del mercado local en la ciudad de Chillán, Chile.

Determinación del tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue determinado mediante la siguiente ecuación (Moore y Kirkland, 2007).

$$n \geq \left(\frac{z}{m}\right)^2 \times \hat{p}(1 - \hat{p}) \quad (1)$$

En donde n es el tamaño de la muestra, z indica la puntuación estándar en la frecuencia de distribución normal, m corresponde al margen de error y \hat{p} es la prevalencia de patógenos que presentan RAM obtenida en otros estudios. El nivel

de confianza del intervalo corresponde al 95%, con $z=1,96$ y $m= 0,05$ (considerando un intervalo no mayor al 10%).

Tabla 1. Determinación del tamaño de la muestra.

Tipo de muestra	Lugar de muestreo	N° muestras	Prevalencia de <i>S. aureus</i> o <i>Salmonella</i> spp. resistente	Referencia
Piel	Campos	107	0,075	El-Adawy <i>et al.</i> (2016)
Carne	Supermercados	98	0,068	Boost <i>et al.</i> (2013)
Huevos	Campos/Super mercados	133	0,096	Pondit <i>et al.</i> (2018)
Total		>338		

Muestreo

El total de muestras extraídas fue de 356, comprendiendo: 120 muestras de la piel de los animales (convencional, $n=50$; libre de jaula, $n=70$), 98 muestras de carne (envasadas, $n=73$; no envasadas, $n=25$), y 138 muestras de huevos (convencional, $n=102$, libre de jaula, $n=36$).

Para el muestreo de piel en animales se tuvo cuidado de no alterar a los animales del plantel, se debió inmovilizar a cada animal en una jaula sin causar estrés y procurando tomar las muestras de forma rápida y en condiciones estériles. Las muestras de piel se tomaron con una tórula (hisopo) estéril, sacando una muestra de la zona bajo el ala del ave (Friese *et al.*, 2013).

Las muestras de carne de pollo de diferentes cortes y marcas fueron seleccionadas al azar y compradas en supermercados y mercados locales (Buyukcangaz *et al.*, 2013).

Las muestras de huevo fueron seleccionadas aleatoriamente en planteles y de diferentes marcas en diferentes supermercados y mercado local. La muestra se

obtuvo pasando una tórula (hisopo) estéril por toda la superficie del huevo (Pondit *et al.*, 2018).

Todas las muestras fueron rotuladas para su identificación, se almacenaron a temperatura de refrigeración hasta su posterior análisis microbiológico.

Aislamiento y detección de *S. aureus*

El aislamiento se llevó a cabo mediante enriquecimiento y cultivo selectivo. El pre-enriquecimiento se realizó depositando las muestras (tórulas) en 10 mL de Buffer Agua Peptonada estéril (BPW). Respecto a la carne, se tomó una muestra de 25 g, la cual fue homogenizada junto a 225 mL de BPW en un stomacher (BAGMIXER® 400 Interscience) a 230 golpes s⁻¹ por 90 s. Todas las muestras fueron incubadas durante 24 horas a una temperatura de 35±2°C. Posterior a la incubación, se depositó 1 mL del pre-enriquecimiento (BPW) en 9 mL de caldo Mueller Hinton con 6,5% de NaCl (MHB+6,5%NaCl), y fue incubado por 24 horas a 35±2°C. Posteriormente se inoculó con un asa de siembra en agar Baird Parker suplementado con yema de huevo telurito (BPA), con incubación por 48 horas a 35±2°C. Luego, se seleccionaron 1-3 colonias presuntivas de *S. aureus* (colonias de color negro con halo transparente) y se inocularon en agar Tripticasa Soya (TSA), dejándose en incubación por 24 h a 35±2°C. Luego, se inoculó un criotubo que contenía caldo cerebro corazón (BHI) con 20% de glicerol, y se incubó durante 24 horas a 35±2°C. Las cepas presuntivas fueron almacenadas a -20°C para su posterior confirmación a través de PCR.

Extracción de ADN

El ADN de las cepas presuntivas fue extraído a través del método de ebullición descrito por Ngamwongsatit *et al.* (2008).

Brevemente las cepas se inocularon en caldo tripticasa soya (TSB) y se incubaron a 35±2°C durante 4 h. Luego, se centrifugó 1 mL de suspensión de TSB a 5000 x g durante 2 minutos a 4°C. Se resuspendió el pellet en 500 µL de H₂O libre de DNA/RNAasa centrifugando a 5000 x g durante 2 minutos a 4°C, posteriormente el pellet se resuspendió en 100 µL de H₂O libre de DNA/RNAasa. Luego, se sometió a una temperatura de 100°C por 10 minutos dentro de un baño seco.

Posteriormente, se centrifugó a 1000 x g durante 5 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante (ADN templado) y se almacenó a -20°C.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la confirmación de las cepas de *S. aureus* se usó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se identificó el gen *nuc* (región de termonucleasa específica en *S. aureus*, 279 pb). Como control positivo se utilizó: ATCC 25923 (SASM *Staphylococcus aureus* susceptible a Meticilina, positivo para el gen *nuc*) y ATCC 43300 (SARM, positivo para gen *nuc* y *mecA*). Por otra parte, se utilizó como control negativo agua libre de ADNasa/ARNasa y ATCC 13076 (*Salmonella enterica* subsp. *enterica*). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 µL y consistió en: 1X PCR buffer (GoTaq® Green Master Mix, 2X), 0,4 µM para los dos partidores del gen *nuc*, 2,5 µL de ADN templado (250 ng µL⁻¹). Se utilizó un termociclador (MultiGene™ Optimax, Labret International). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 10 min a 94 °C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 51 °C y 2 min a 72 °C, con una etapa final de 5 min a 72 °C. Los productos de PCR (10 µL) se cargaron en un gel de agarosa (1,5 %) (1,5 g de agarosa en 100 mL de buffer 1X TAE), al cual se adicionaron 5 µL de compuesto intercalante (SafeView) para la detección de la doble hebra de ADN. Se usó una escalera de ADN de 100 pb a 1 Kb como marcador molecular para determinar el tamaño de los amplicones. La electroforesis se desarrolló en buffer 1X TAE a 100 V, 300 mA por 60 min. Luego, los geles se observaron con un transiluminador UV (Bio-Top, modelo TU1002) (312 nm) para determinar la presencia del gen *nuc* (Velasco *et al.*, 2018).

Análisis mediante fingerprinting

Se evaluó la diversidad genética de los 48 aislados confirmados de *Staphylococcus aureus* mediante el método ERIC-PCR molecular fingerprinting utilizando los cebadores Eric1R y Eric2F (ERIC1R: 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'; ERIC2F: 5' AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG 3') (Versalovic *et al.*, 1991). Las cepas de referencia de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y ATCC 43300 se utilizaron como controles positivos, mientras que *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 13076 se utilizó como control negativo. El ADN genómico de las

cepas de referencia se obtuvo utilizando el E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit (Omega Bio-Tek) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ERIC PCR se realizó con 2,0 µL de ADN templado de 50 ng, 1,25 µL de cebadores directos e inversos 10 µM, 12,5 µL de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) y 9,5 µL de agua libre de nucleasas (Promega) hasta un total de 25 µL. La mezcla de reacción se mantuvo a 94°C durante 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 1 min, 25°C durante 1 min y 72°C durante 4 min con una retención final a 72°C durante 5 min (Akindolire *et al.*, 2018).

Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) con una estandarización previa del contenido de ADN para cada muestra. Cada carril se cargó con una mezcla de 15 µL de producto de PCR y 3 µL de colorante de carga complementado con tinción en gel SafeView Plus DNA 20,000X (Fermelo Biotec). El marcador utilizado fue 100 bp Plus DNA ladder (Maestrogen). La electroforesis se llevó a cabo en tanques tamponados con 1xTAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 100 V durante 3 horas. Las bandas se visualizaron en un transiluminador UV.

Los patrones de bandas se analizaron manualmente para buscar la presencia de productos de PCR de tamaños moleculares específicos utilizando el protocolo establecido por Gerding *et al.* (2013). Se construyó una matriz binaria con las puntuaciones 1 y 0 para la presencia o ausencia de una banda en cada tamaño molecular. Luego, se analizó la matriz con AFPL SURV versión 1.0 (Vekemans, 2002) para calcular la distancia genética entre aislados. Luego, la matriz de distancia se sometió a análisis de conglomerados UPGMA utilizando la aplicación NEIGHBOR del paquete de software PHYLIP. Los cladogramas se visualizaron en MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Análisis de susceptibilidad a antibióticos

A través del método de difusión de disco se analizó la susceptibilidad a 12 antibióticos pertenecientes a 10 clases: Eritromicina, oxacilina, penicilina, clindamicina, trimetoprima-sulfametoxazol, cefoxitina, ceftarolina, tetraciclina, vancomicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, gentamicina. El criterio que se utilizó

para determinar si una cepa susceptible, intermedia o resistente a las diferentes clases de antibióticos corresponde a lo dispuesto por la CLSI (2020).

Tabla 2. Mecanismos de acción, grupos o clases de antibióticos.

Mecanismos de acción	Grupos	Clases	Antibióticos
Inhibición de la síntesis de la pared bacteriana	β -lactámicos	Penicilinas	Penicilina
			Oxacilina
		Cefalosporinas	2da gen: Cefoxitina
	5ta gen: Ceftarolina		
	Glucopéptidos		Vancomicina
Inhibición de la síntesis proteica	Aminoglucósidos		Gentamicina
	Anfenicoles		Cloranfenicol
	Lincosamidas		Clindamicina
	Macrólidos		14 átomos de carbono: Eritromicina
	Tetraciclinas		Tetraciclina
Alteración del metabolismo o la estructura de los ácidos nucleicos	Quinolonas		3era gen: Ciprofloxacina
Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos	Sulfonamidas, Diaminopirimidinas		Trimetoprima sulfametoxazol

(Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

Identificación de cepas enterotoxigénicas

Para la identificación de los genes que codifican las enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED, y SEE, se utilizaron partidores que identifican los genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* y *see* y la metodología descrita por Marques *et al.* (2015).

La reacción de PCR se realizó utilizando 12,5 μ L de GoTaq® GreenMaster Mix 2 X (Promega, Corp.®), 1 μ L de cada partidor (100 μ M/ μ L, Eurofins MWG operon®) a una concentración de 10 pmol, excepto en el iniciador para el gen *sec*, en el que se usaron 50 pmol, 2 μ L de ADN (50 ng), 8,5 μ L y agua ultrapura (Promega, Corp.®) para completar el volumen final de 25 μ L. La amplificación se realizó en un termociclador bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C; seguido de 37 ciclos de desnaturalización de 1 min a 95 °C, 1 min de recocido a 44,5 °C, y 1 min de extensión a 72 °C por 1 min; y un paso final de extensión de 72 °C por 10 min.

Luego de la amplificación, se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (p/v) en 1X TAE tamponada durante 70 min a 80 V utilizando un marcador de peso molecular de 1 Kb (Invitrogen®). Los geles se fotografiaron en un transiluminador UV (Marques *et al.*, 2015).

Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas en la prevalencia de las diferentes cepas de *S. aureus* entre los diferentes tipos de muestras se analizaron los datos de prevalencia mediante prueba de Chi-cuadrado con valor P de 2 colas ($P \leq 0,05$) (Moore & Kirkland, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 78/356 cepas resultaron ser presuntivas para *S. aureus* en medio de cultivo Baird-Parker, el cual es selectivo para coagulasa positiva. Las cepas presuntivas fueron confirmadas con PCR, a través de la identificación del gen *nuc*, obteniéndose un total de 48/356 muestras positivas para *Staphylococcus aureus* correspondiendo a un 13,5% del total (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia de *S.aureus* en la cadena productiva avícola.

Tipo de muestra	N° de muestras	Muestras positivas	Prevalencia <i>S. aureus</i> (%)
<u>Animales</u>	120	14	11,7
Convencional	50	11	22,0(*)
Libre de jaula	70	3	4,3
<u>Carne</u>	98	15	15,3
Envasada	73	8	11,0
No envasada	25	7	28,0(*)
<u>Huevo</u>	138	19	13,8
Convencional	102	18	17,6(*)
Libre de jaula	36	1	2,8
Total	356	48	13,5

(*): Diferencia significativa mediante test de Chi cuadrado ($P < 0,05$)

La prevalencia de *S. aureus* de acuerdo con el tipo de muestra (animal, carne, huevo) no presentó diferencia significativa ($P > 0,05$), dejando en claro que independiente de la etapa de la cadena productiva se obtenga la muestra, no es relevante para concluir que la prevalencia sea mayor o menor en alguna etapa de la cadena productiva.

El tipo de manejo (convencional o libre de jaula) en las muestras de animales y huevos presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), siendo mayor la prevalencia en los sistemas convencionales. Esto se puede deber a que, en sistemas de producción intensiva, es más probable que ocurra un aumento de infecciones respiratorias o entéricas (Esperbent & Migliorati, 2017). En la carne envasada y no envasada también se presentó diferencia significativa ($P < 0,05$), siendo mayor en la carne no envasada. La inocuidad y manipulación de productos cárnicos es un factor muy relevante en la presencia de esta bacteria, ya que se detecta una significativa contaminación microbiológica en la carne de pollo, indicando posibles deficiencias en la cadena de manipulación del alimento, desde la faena, producción, envasado y transporte hasta la comercialización (López *et al.*, 2018).

En el estudio realizado por Zhang *et al.* (2023), con una metodología de aislamiento e identificación muy similar, obtuvieron una prevalencia en la superficie de los huevos de un 15,9%, siendo un valor muy cercano al 13,8% obtenido en este estudio. Respecto a la prevalencia de la carne se compararon los resultados con el estudio realizado por Li *et al.* (2019), en el cual se obtuvo una prevalencia en la carne de pollo de un 20,5% en general, en comparación al 15,3% de este estudio es un valor levemente superior, lo cual puede deberse al alto número de muestras analizadas (507) siendo más de 5 veces mayor al de este estudio, con una metodología de aislamiento e identificación similar. Al comparar la prevalencia obtenida por Li *et al.* (2019), en la carne de supermercado (10,8%) y la prevalencia significativamente mayor en el mercado de agricultores locales (36,5%), son valores muy similares a la prevalencia en este estudio en lo que respecta a la carne envasada de supermercados (11%) y la carne no envasada obtenida del mercado local (28%), dando cuenta de la alza en la prevalencia en mercados donde las condiciones, reglamentaciones y fiscalizaciones en temas de higiene en el procesamiento y almacenamiento de alimentos son mínimas y en muchos casos inexistentes, lo que supone un alto nivel de contaminación cruzada y un elevado riesgo para la salud de los consumidores.

Si bien la metodología aplicada en este estudio para el aislamiento e identificación mediante cultivo/PCR fue capaz de confirmar las cepas de *S. aureus*, implicó una tarea de aproximadamente 5 a 7 días de trabajo, mediante lo cual se recomienda la aplicación de metodologías como lo descrito por Velasco *et al.* (2014), donde se aplica el método multiplex PCR en tiempo real (RT PCR), logrando identificar un mayor número de cepas de *S. aureus*, identificando el gen *nuc* (confirmación de *S. aureus*), el gen *mecA* (*S. aureus* resistente a meticilina) y PVL (factores de virulencia), método que demostró ser más rápido que el método convencional reduciendo el tiempo a 2 días, con muestras nasales de animales (ovejas, cerdos y vacas), en la cadena productiva de carne (cerdo, pollo y res), y en fiambre (jamón, pavo y pollo). La optimización de los métodos de aislamiento e identificación son parte clave para el análisis microbiológico en muestras clínicas y futuros estudios.

La metodología a aplicar en la detección de *S. aureus* es importante para determinar la prevalencia correcta, como se indica en González-Machado *et al.* (2024), en donde se analizaron estudios similares, y se menciona que el enriquecimiento previo de las muestras permite una mayor detección de muestras positivas para *S. aureus*, mientras que cultivos selectivos a su vez suplementados con cefoxitina aumentan la confirmación de SARM, haciendo hincapié en la necesidad de un protocolo estandarizado para la correcta detección de este microorganismo en los alimentos.

Mediante el método fingerprinting (Apéndice 1) las muestras confirmadas fueron separadas por su diversidad genética y se seleccionó una muestra por cada clúster, siendo seleccionadas 8 muestras de las 48 confirmadas para el posterior análisis de susceptibilidad a antibióticos (Tabla 4).

Tabla 4. Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *S. aureus* aisladas de la cadena productiva avícola.

Cepa	Origen de muestra	T. de producción	Perfil de resistencia
HP68	Huevo plantel	Convencional	S/R
PP37	Piel plantel	Libre	CLO, PEN, TET
HS22	Huevo supermercado	Convencional	TRS-CIP-CLO
CM7	Carne mercado local	Convencional	CEX, CLIN, ERI, OXA, PEN, TET, TRS, CIP
PP3	Piel plantel	Convencional	S/R
HS17	Huevo supermercado	Libre	TRS
HM14	Huevo mercado local	Convencional	TET
CM11	Carne mercado local	Convencional	CEX, CLIN, ERI, OXA, PEN, TET

CEX: Cefoxitina; CEF: Ceftarolina; CIP: Ciprofloxacina; CLIN: Clindamicina; CLO: Cloranfenicol; ERI: Eritromicina; GEN: Gentamicina; OXA: Oxacilina; PEN: Penicilina; TET: Tetraciclina; TRS: Trimetoprima-sulfametoxazol; VAN: Vancomicina; S/R: Sin resistencia; N/A: No aplica.

De un total de 8 cepas, 6 resultaron ser resistentes a antibióticos, siendo 4 de éstas multirresistentes, presentando resistencia a 3 o más clases de antibióticos. La cepa CM7 aislada de carne de pollo del mercado local con manejo de producción convencional, presentó resistencia a 7 clases de antibióticos tales como cefoxitina,

clindamicina, eritromicina, oxacilina, penicilina, tetraciclina, y Trimetroprima-sulfametoxazol, indicando ser una cepa multirresistente. La segunda cepa multirresistente fue la cepa CM11 aislada desde carne del mercado local con manejo de producción convencional, fue resistente a 5 clases de antibióticos como cefoxitina, clindamicina, eritromicina, oxacilina, penicilina y tetraciclina. La cepa PP37 aislada directamente de la piel de un ave de un plantel libre de jaula fue resistente a 3 clases de antibióticos como cloranfenicol, a penicilina y tetraciclina, la cepa HS22 aislada desde huevos de supermercado con un manejo de producción convencional, presentó resistencia a 3 clases de antibióticos como trimetroprima-sulfametoxazol, ciprofloxacina y cloranfenicol. La cepa HS17 aislada de huevos de supermercado con manejo de producción libre de jaula solo fue resistente a trimetroprima-sulfametoxazol, la cepa HM14 aislada de huevos del mercado local con un manejo de producción convencional presentó resistencia solo a la tetraciclina. Las cepas HP68 y PP3 fueron susceptibles a todos los antibióticos.

El uso de antibióticos en producción animal supera su uso en salud humana en muchos países superando el 60% del uso total es destinado a uso animal (Van Boeckel *et al.*, 2019).

El empleo de antibióticos en la agricultura es menor en comparación con su aplicación en la crianza de animales. No obstante, dado que estos compuestos entran en contacto directo con el suelo y el entorno, incluso una cantidad relativamente ínfima puede ejercer un impacto desproporcionado en el reservorio global de genes (Stockwell & Duffy, 2012). El uso indiscriminado de antibióticos en todos estos aspectos que de una u otra forma afectan directa o indirectamente al desarrollo de resistencia puede causar un punto de no retorno, en el cual cada vez menos antibióticos sean capaces de cumplir su rol a causa de las nuevas resistencias. Los antibióticos utilizados como promotores del crecimiento sin fines médicos mejoran el rendimiento productivo de los animales, reduciendo la mortalidad, permitiéndole a las industrias y productores mayor eficiencia y elevar sus ganancias (Kasimanickam *et al.*, 2021), pero a su vez contribuyendo al desarrollo de la resistencia antimicrobiana.

En Chile existe el Programa de Uso Responsable y Prudente de los Antimicrobianos en la Producción Primaria Nacional creado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG, 2022), el cual, promueve un correcto uso de éstos, pero también mediante la Resolución exenta N°:6801/2017, se prohíbe actualmente el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento animal, indicando que el uso de estos fármacos debe ser única y exclusivamente de forma terapéutica, metafiláctica o profiláctica, debiendo ser administrados por un médico veterinario (SAG, 2017).

Diversas investigaciones concuerdan en que la resistencia a penicilina, meticilina y vancomicina están codificadas por los genes *blaZ* (betalactamasa), *mecA* (PBP2a) y *vanA* (dipéptido D-alanina- D-alanina), respectivamente (Akpaka *et al.*, 2017), por lo que sería interesante identificar la presencia de estos genes en estudios futuros.

Estudios detallan la presencia de un nuevo gen denominado *mecC*, perteneciente al complejo genético *mec*, el cual comparte alrededor de un 61% de homología en la secuencia de aminoácidos con el PBP2a original (*mecA*), ambos genes se encuentran presentes en el casete cromosómico estafilocócico *mec* (SCC *mec*), la presencia de este gen *mecC* ha ocasionado un alto número de PCRs negativos para el gen *mecA*. El gen *mecC* presenta mayor afinidad con la oxacilina, mientras que el gen *mecA* tiene mayor afinidad con la cefoxitina (Lakhundi & Zhang, 2018). Lo anterior sugiere que para una mejor detección de *S. aureus* resistente a antibióticos debe de considerarse el uso de partidores específicos para el gen *mec* y a su vez más específicamente para los genes *mecA* y *mecC* para una diferenciación y así evitar falsos negativos en futuros estudios, otorgando una mayor precisión al identificar estas cepas y su relación con los perfiles de resistencia antimicrobiana.

Se han descrito por lo menos 13 clases de SCC *mec*, en cepas de SARM dando cuenta de la amplia variabilidad genética existente a nivel bacteriano, esto sumado a su rápida velocidad de incubación en condiciones favorables, posicionan a *S. aureus* y a las bacterias resistentes en general como una de las mayores amenazas y desafíos para la industria alimenticia y para la salud humana en el presente y futuro buscando desarrollar nuevas alternativas para el combate de bacterias resistentes a antibióticos (Lakhundi & Zhang, 2018).

En la Figura 1 se muestra el resultado de una electroforesis para observar la presencia de genes asociados a la producción de las diferentes enterotoxinas: SEA, SEB, SEC, SED, SEE. Se incluyeron las cepas CC007, CE004, CC015, obtenidas de carne de cerdo envasada y de carnicería en un estudio realizado por Lofa *et al.* (2019), y las cepas de referencia ATCC25923, ATCC43300 y ATCC13076. De las 8 cepas seleccionadas anteriormente para el análisis de susceptibilidad a los antibióticos, solo 2 presentaron posibles genes asociados a la producción de enterotoxinas, las cuales fueron CM7 y CM11. La carne al ser el producto que es mayormente procesado es almacenada a temperaturas bajo 0°C y para consumirlo se debe calentar al menos por sobre los 70°C, y en vista y consideración de que las SEs pueden soportar ambas temperaturas es importante considerar este tipo de análisis para enterotoxinas como requisitos necesarios para garantizar una mejor seguridad alimentaria para los consumidores.

La correlación entre el peso molecular del marcador utilizado y las cepas, muestran que existe la posibilidad que la cepa CC007 sea positivas para el gen que codifica para la enterotoxina SEA. Mientras que la cepa CC015 muestra un posible indicador positivo para la enterotoxina SEB. Las cepas CM7 y CM11 aisladas en este estudio presentaron pesos moleculares variados indicando posibles positivos para las enterotoxinas SEA en ambos casos y para las SEB y SED, respectivamente. La cepa CE004 no presentó banda positiva para enterotoxinas.

Si bien el instituto de Salud Pública (ISP) de Chile cuenta con diversos estudios, en los cuales identifican cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas, no se cuenta con una reserva de cepas de referencias positivas para estos genes, por lo que no se pudo confirmar si las cepas de este estudio eran positivas en la presencia de estos genes. Para esto existen otros métodos como la secuenciación del ADN y la detección de la proteína de la enterotoxina mediante inmunoensayos, lo cual sería interesante aplicar para una investigación a futuro, que pueda confirmar si estas cepas son positivas para estas enterotoxinas, a su vez de poder establecer un protocolo estándar con cepas de referencia para mejores resultados y así en un futuro poder modificar las pruebas que se realizan previamente a los alimentos para que puedan ser comercializados de manera segura a los consumidores.

Figura 1. Electroforesis para genes asociados a enterotoxinas



En el Reglamento Sanitario de los Alimentos (Ministerio de salud, 2024) existen exigencias microbiológicas que deben cumplir los diferentes tipos de alimentos, en el caso de la carne de ave cruda y huevos solo hay restricción para *Salmonella* spp. Por otra parte, respecto a *S. aureus* hay restricciones para productos como cecinas crudas y cocidas, pescados ahumados y cocidos, como también diversas salsas, entre otros alimentos, pero ninguno para de la cadena productiva avícola.

Es importante que se deba considerar a futuro un cambio en las medidas restrictivas, no solo para *S. aureus*, sino también para *S. aureus* enterotoxigénico y resistente a antibióticos, debido a su capacidad para producir intoxicaciones alimentarias, a modo de ir actualizando las normativas en busca de un mejor control a nivel sanitario de higiene e inocuidad de los alimentos que beneficie a la industria alimenticia y a los consumidores.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se puede concluir que:

1. *Staphylococcus aureus* está presente en la cadena productiva avícola, siendo su prevalencia mayor en animales y productos provenientes de sistemas de producción convencionales e intensivos en jaulas.
2. Existen cepas de *S. aureus* multirresistentes en la cadena productiva avícola, siendo más común la resistencia a antibióticos β -lactámicos.
3. Existe la necesidad de contar con un protocolo rápido y efectivo en la detección tanto de cepas resistentes como productoras de enterotoxinas para una futura modificación de las normativas incluyendo a *S. aureus* resistente a antibióticos y enterotoxigénico en alimentos.

REFERENCIAS

1. Aguirre, R., & Pizarro, M. (2018). Panorama y mercado del huevo. Departamento de Análisis de Mercado y Política Sectorial. Chile. Obtenido de www.odepa.gob.cl.
2. Akindolire, M. A., Kumar, A., & Ateba, C. N. (2018). Genetic characterization of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* from milk in the North-West Province, South Africa. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7), 1348-1355. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.10.011>
3. Akpaka, P. E., Roberts, R., & Monecke, S. (2017). Molecular characterization of antimicrobial resistance genes against *Staphylococcus aureus* isolates from Trinidad and Tobago. *Journal of Infection and Public Health*, 10(3), 316-323. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.05.010>
4. Ali, T., Basit, A., Karim, A. M., Lee, J.-H., Jeon, J.-H., Rehman, S. u., & Lee, S.-H. (2021). Mutation-Based Antibiotic Resistance Mechanism in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Pharmaceuticals*, 14(5), 420. <https://www.mdpi.com/1424-8247/14/5/420>
5. Benkerroum, N. (2018). Staphylococcal enterotoxins and enterotoxin-like toxins with special reference to dairy products: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(12), 1943-1970. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1289149>
6. Bisso-Andrade, A. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. *Revista de la Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 31(2), 50-59.

7. Boost, M. V., Wong, A., Ho, J., & O'Donoghue, M. (2013). Isolation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from Retail Meats in Hong Kong. *Foodborne pathogens and disease*, 10(8), 705-710. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1415>
8. Buyukcangaz, E., Velasco, V., Sherwood, J. S., Stepan, R. M., Koslofsky, R. J., & Logue, C. M. (2013). Molecular typing of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) isolated from animals and retail meat in North Dakota, United States. *Foodborne pathogens and disease*, 10(7), 608-617.
9. Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos [10.1016/j.eimc.2008.11.001]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
10. Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
11. Chilecarne. 2024. Reporte anual Chilecarne 2023 [en línea]. Asociación de Exportadores de Carnes A.G. <<https://www.chilecarne.cl/documentos/reporte-chilecarne-2023/>>. [Consulta: 10 junio 2024].
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
13. Darwish, W. S., Atia, A. S., Reda, L. M., Elhelaly, A. E., Thompson, L. A., & Saad Eldin, W. F. (2018). Chicken giblets and wastewater samples as possible sources of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Prevalence, enterotoxin production, and antibiotic susceptibility. *Journal of Food Safety*, 38(4), e12478. <https://doi.org/10.1111/jfs.12478>
14. Decreto N°977/96. Reglamento sanitario de los alimentos. Diario Oficial de la República de Chile. 13 mayo 1997. Santiago de Chile.
15. de Estudios, O., & Agrarias, P. (2012). Consumo aparente de principales alimentos en Chile. Santiago, ODEPA.
16. de Lima Marques, J., Volcão, L. M., Funck, G. D., Kroning, I. S., da Silva, W. P., Fiorentini, Â. M., & Ribeiro, G. A. (2015). Antimicrobial activity of essential oils

- of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. *Industrial crops and products*, 77, 444-450.
17. de Macedo Couto, R., & Brandespim, D. F. (2020). A review of the One Health concept and its application as a tool for policy-makers. *Int. J. One Health*, 6(1), 83-89.
 18. El-Adawy, H., Ahmed, M., Hotzel, H., Monecke, S., Schulz, J., Hartung, J., Ehricht, R., Neubauer, H., & Hafez, H. M. (2016). Characterization of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Healthy Turkeys and Broilers Using DNA Microarrays. *Front Microbiol*, 7, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02019>
 19. Esperbent, C., & Migliorati, M. (2017). Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece: El incremento en la aparición de cepas resistentes a los antibióticos plantea un serio reto a la comunidad científica. Estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que, para 2050, esto podría tener importantes consecuencias tanto para la salud pública como para las actividades agropecuarias. El abuso y la mala administración de antibióticos en sistemas agropecuarios de producción intensiva aparecen entre las principales causas. Especialistas argentinos recomiendan buenas prácticas de manejo sanitario para minimizar los riesgos. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 43(1), 6-10.
 20. Fabian, C. (2020). caracterización fenotípica de *Staphylococcus aureus* aislada pre y post odontectomía de los terceros molares mandibulares [Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela].
 21. Friese, A., Schulz, J., Zimmermann, K., Tenhagen, B.-A., Fetsch, A., Hartung, J., & Rösler, U. (2013). Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2759-2766.
 22. Fujikawa, H. (2021). Prediction of detection time of staphylococcal enterotoxin A formed in hydrated batter mix. *Food Control*, 121, 107559. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107559>
 23. Gajdács, M. (2019). The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 8(2), 52.
 24. Gerding, M., Howieson, J. G., O'Hara, G. W., Real, D., & Bräu, L. (2013). Establishment and survival of the South African legume *Lessertia* spp. and

- rhizobia in Western Australian agricultural systems. *Plant and Soil*, 370(1-2), 235-249. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1632-1>
25. González-Machado, C., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2024). Prevalence and types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in meat and meat products from retail outlets and in samples of animal origin collected in farms, slaughterhouses and meat processing facilities. A review. *Food Microbiology*, 123, 104580. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2024.104580>
 26. Kasimanickam, V., Kasimanickam, M., & Kasimanickam, R. (2021). Antibiotics use in food animal production: escalation of antimicrobial resistance: where are we now in combating AMR? *Medical Sciences*, 9(1), 14.
 27. Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
 28. Lakhundi, S., & Zhang, K. (2018). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), 10.1128/cmr.00020-00018. <https://doi.org/10.1128/cmr.00020-18>
 29. Li, Q., Li, Y., Tang, Y., Meng, C., Ingmer, H., & Jiao, X. (2019). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus argenteus* in chicken from retail markets in China. *Food Control*, 96, 158-164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.030>
 30. Lofa, A., Velasco, V., Gerding, M., López, M. D., Vallejos, D., Bonilla, A. M., & Logue, C. M. (2019). Antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* strains of swine origin: molecular typing and susceptibility to oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil and maqui (*Aristotelia chilensis* (Molina) Stuntz) extract. *J Appl Microbiol*, 127(4), 1048-1056. <https://doi.org/10.1111/jam.14393>
 31. López, A., Burgos, T., Díaz, M., Mejía, R., & Quinteros, E. (2018). Contaminación microbiológica de la carne de pollo en 43 supermercados de El Salvador. *Alerta, Revista científica del Instituto Nacional de Salud*, 1(2), 45-53. <https://doi.org/10.5377/alerta.v1i2.7134>
 32. Márquez Ramos, J. G. (2012). Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilocócicas en queso blanco venezolano artesanal tipo "telita" expendido en mercados de la ciudad de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32, 112-115.

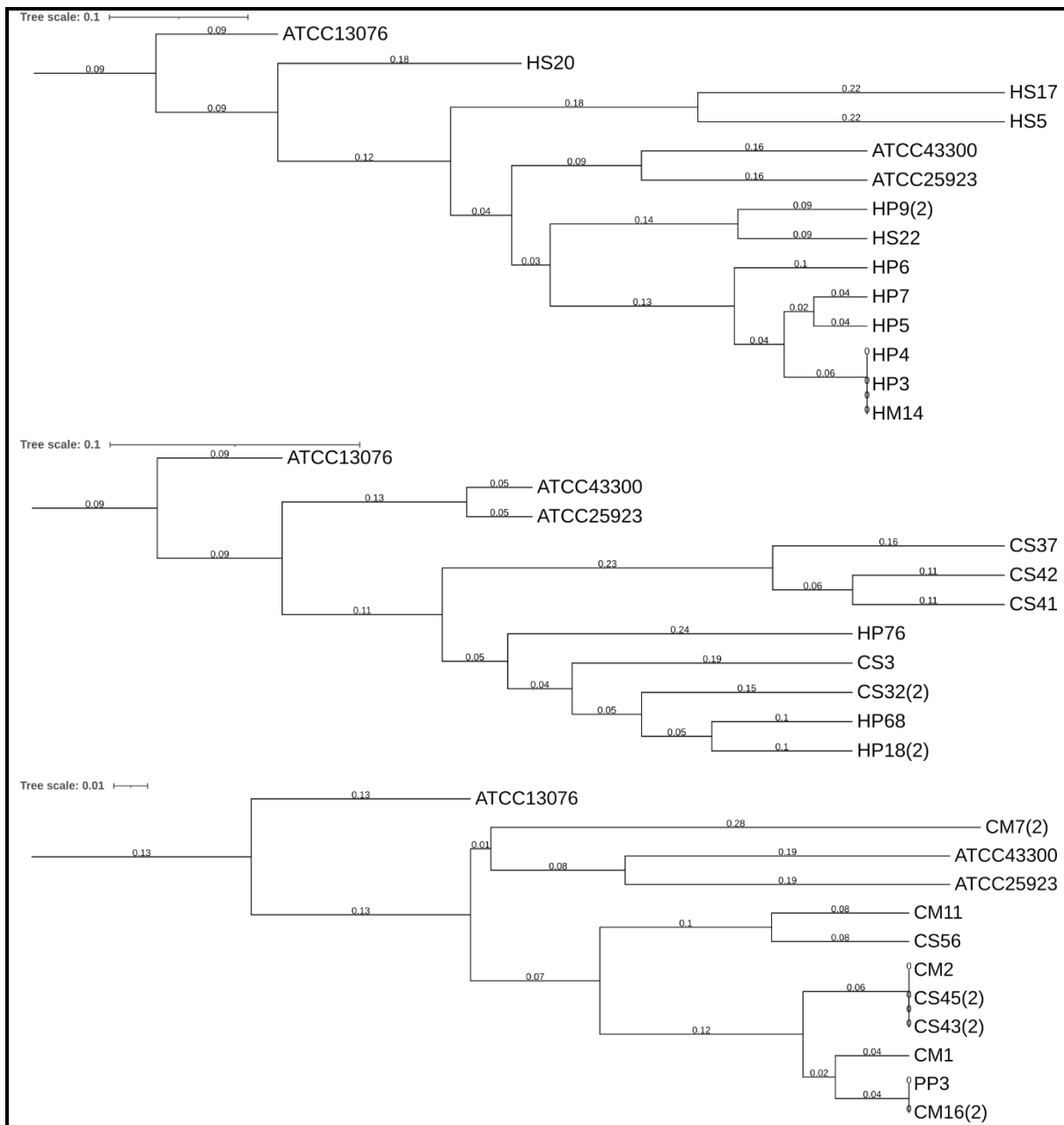
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562012000200007&nrm=iso

33. Moore, D. S., & Kirkland, S. (2007). *The basic practice of statistics (Vol. 2)*. WH Freeman New York.
34. Nazari, M. R., Sekawi, Z., Sadeghifard, N., Raftari, M., & Ghafourian, S. (2015). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *Reviews in Medical Microbiology*, 26(1), 1-7. <https://doi.org/10.1097/mrm.0000000000000023>
35. Ngamwongsatit, P., Buasri, W., Pianariyanon, P., Pulsrikarn, C., Ohba, M., Assavanig, A., & Panbangred, W. (2008). Broad distribution of enterotoxin genes (hblCDA, nheABC, cytK, and entFM) among *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* as shown by novel primers. *International journal of food microbiology*, 121(3), 352-356.
36. Palomino-Camargo, C., González-Muñoz, Y., Pérez-Sira, E., & Hugo Aguilar, V. (2018). Metodología Delphi en la gestión de la inocuidad alimentaria y prevención de enfermedades transmitidas por alimentos. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(3), 483. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.353.3086>
37. Pondit, A., Haque, Z. F., Sabuj, A. A. M., Khan, M. S. R., & Saha, S. (2018). Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken and quail eggshell. *Journal of advanced veterinary and animal research*, 5(4), 466.
38. Resolución exenta N°:6801/2017. Establece requisitos para el registro, comercialización y uso de antimicrobianos. 22 noviembre 2017. Santiago de Chile.
39. Resolución N°:1.129/2022. Crea el programa de uso responsable y prudente de antimicrobianos en la producción primaria. 4 marzo 2022. Santiago de Chile
40. Schito, G. C. (2006). The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 3-8. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01343.x>
41. Silva, J. F. M., Feitosa, A. C., & Rodrigues, R. M. (2017). *Staphylococcus aureus* em alimentos. desafios - Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins, 4(4), 15-31. <https://doi.org/10.20873/uft.2359-3652.2017v4n4p15>
42. Stockwell, V., & Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 31(1).

43. Upadhyay, N., & Nara, S. (2018). Lateral flow assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in milk. *Microchemical Journal*, 137, 435-442. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.12.011>
44. Van Boeckel, T. P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science*, 365(6459), eaaw1944.
45. Vekemans, X., Beauwens, T., Lemaire, M., & Roldán-Ruiz, I. (2002). Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular ecology*, 11(1), 139-151.
46. Velasco, V., Sherwood, J. S., Rojas-García, P. P., & Logue, C. M. (2014). Multiplex real-time PCR for detection of *Staphylococcus aureus*, *mecA* and Panton-Valentine Leukocidin (PVL) genes from selective enrichments from animals and retail meat. *PloS one*, 9(5), e97617.
47. Velasco, V., Vergara, J. L., Bonilla, A. M., Muñoz, J., Mallea, A., Vallejos, D., Quezada-Aguiluz, M., Campos, J., & Rojas-García, P. (2018). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* strains in the pork chain supply in Chile. *Foodborne pathogens and disease*, 15(5), 262-268.
48. Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
49. Zhang, P., Wang, P., Fu, X., Xu, X., Ruan, F., Wang, T., Chang, G., Wan, Y., Zhang, Y., & Wang, X. (2023). Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* in raw eggs and its growth and enterotoxin production in egg contents. *LWT*, 174, 114379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114379>
50. Zocche, F., RC Francia., JAG Aleixo., AN Moreira., WP Silva *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos aislados de alimentos de origen animal en Rio Grande do Sul *Brasil Interiencia*, 34 (7) (2009) , págs. 487 – 491.

APÉNDICES

Apéndice 1. Cladogramas de cepas positivas de *S. aureus* aisladas de la cadena productiva avícola.



Cladogramas que muestran la diferencia a nivel genético entre las diversas muestras que resultaron positivas a *Staphylococcus aureus* mediante un análisis PCR preliminar.