



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Veterinaria

Identificación de bacterias contaminantes de dosis seminales
de ganado porcino y perfil fenotípico de resistencias
antimicrobianas

Identification of contaminating bacteria of swine semen
extenders and phenotypic profile of antimicrobial resistance

Autor/es

Iñaki Piñas Sádaba

Director/es

Raúl Carlos Mainar Jaime
Clara María Marín Alcalá

Facultad de Veterinaria

2023

ÍNDICE

1.	Resumen/Abstract.....	1
2.	Introducción	2
2.1.	La resistencia a los antibióticos.....	2
2.1.1.	Las resistencias antimicrobianas, un problema global.....	2
2.1.2.	Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos.....	3
2.1.3.	La resistencia antimicrobiana en la práctica veterinaria.....	4
2.2.	La inseminación artificial en el ganado porcino y el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos	6
2.2.1.	Importancia	6
2.2.2.	Tecnología de la IA (o de la producción de dosis seminales).....	6
3.	Justificación y objetivos.....	12
4.	Material y métodos	13
4.1.	Selección de las dosis seminales	13
4.2.	Aislamiento e identificación bacteriana (VITEK-2 y 16S)	13
4.3.	Caracterización de la resistencia antimicrobiana (RAM)	16
5.	Ánalisis estadísticos.....	17
6.	Resultados	18
6.1.	Prevalencia de contaminación bacteriana en las dosis seminales de 4 y 8 días post-recogida.....	18
6.2.	Identificación bacteriana y RAM	18
6.2.1.	Géneros <i>Isoptericola</i> y <i>Cellulosimicrobium</i>	19
6.2.2.	Género <i>Kocuria</i>	21
6.2.3.	Género <i>Trueperella</i>	22
6.2.4.	Género <i>Corynebacterium</i>	23
6.2.5.	Género <i>Sphingomonas</i>	23
6.2.6.	Género <i>Burkholderia</i>	24
6.2.7.	Género <i>Staphylococcus</i>	25
6.2.8.	Género <i>Rhodococcus</i>	26
6.2.9.	Género <i>Streptococcus</i>	26
6.2.10.	Género <i>Salmonella</i>	27
6.2.11.	Género <i>Bacteroides</i>	28
7.	Discusión	28
8.	Conclusiones/Conclusions.....	31
9.	Valoración personal.....	32
10.	Bibliografía	32

1. Resumen/Abstract

El presente estudio se centró en la evaluación de la contaminación bacteriana de dosis seminales porcinas a los 4 y 8 días post recogida y de resistencias fenotípicas a los antimicrobianos en las bacterias aisladas. Para el aislamiento se utilizó el sistema automático de identificación bacteriana VITEK-2 o la secuenciación del gen ribosomal 16S. La detección de resistencias antimicrobianas (RAM) se llevó a cabo con el VITEK-2 mediante la estimación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se aislaron bacterias en 10 de las 12 dosis seminales analizadas. El mayor porcentaje de bacterias correspondió a bacterias Gram-positivas (70,27%). Los principales géneros identificados se asociaron con bacterias medioambientales, algunas de las cuales se han aislado en infecciones en personas inmunocomprometidas (*Cellulosimicrobium*, *Kocuria*, *Sphingomonas*, etc.). En menor medida se aislaron géneros habituales en el cerdo (*Salmonella*, *Trueperella*, *Rhodococcus*, etc.). El 91,6% de la bacterias mostró RAM a alguno de los antibióticos testados. El gran porcentaje de dosis seminales porcinas contaminadas por bacterias ambientales sugería la necesidad de seguir implementando medidas higiénicas en los centros de inseminación que ayuden a reducir este problema. Además, la presencia de RAM en dosis seminales obliga a plantearse si podría tener consecuencias en la cadena de producción porcina y en Salud Pública.

*The present study was focused on the assessment of the bacterial contamination of porcine semen extenders at 4 and 8 days post-collection, and of the phenotypic resistance to antimicrobials on the isolated bacteria. Isolation was performed using the VITEK-2 automatic bacterial identification system or by 16S ribosomal gene sequencing. The detection of antimicrobial resistance (AMR) was carried out with VITEK-2 by estimating the minimum inhibitory concentration (MIC). Bacteria were isolated in 10 of the 12 semen extenders analyzed. The highest percentage of bacteria corresponded to Gram-positive bacteria (70.27%). The main bacterial genera isolated were associated with environmental bacteria, some of which have been identified in infections in immunocompromised people (*Cellulosimicrobium*, *Kocuria*, *Sphingomonas*, etc.). To a lesser extent, genera that are common in pigs (*Salmonella*, *Trueperella*, *Rhodococcus*, etc.) were isolated. A 91.6% of the bacteria showed AMR to any of the antibiotics tested. The large percentage of semen extenders contaminated by environmental bacteria suggested the need to continue implementing hygienic measures in insemination centers to reduce this problem. In addition, the presence of AMR in semen extenders require to consider whether it could have consequences in the pig production chain and in Public Health.*

2. Introducción

2.1. La resistencia a los antibióticos

2.1.1. Las resistencias antimicrobianas, un problema global

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) de 2023, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza emergente para los tratamientos efectivos de una variedad cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos. Considera que la RAM es una de las 10 principales amenazas para la salud pública que enfrenta la humanidad. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de 2022 estiman que actualmente es responsable de al menos 1,27 millones de muertes de personas en todo el mundo y en 2019 se asoció con casi 5 millones de muertes. A modo de ejemplo, en los EE. UU., cada año ocurren más de 2,8 millones de infecciones resistentes a los antimicrobianos y más de 35,000 personas mueren como resultado de ellas.

Se trata de un problema global que posiblemente podría considerarse uno de los problemas de salud pública más complejos pues implica interacciones entre todas las formas de vida en el planeta (microbios, plantas y animales) y el medio ambiente (O'Neill, 2016) y tienen el potencial de afectar a las personas en cualquier etapa de la vida, así como a las industrias de la salud, la veterinaria y la agricultura (Jory, 2019). Debido a este origen multifactorial debe tratarse desde un enfoque multidisciplinario, que requiere la contribución activa de distintos sectores y de todos los países (O'Neill, 2016).

La RAM ocurre cuando los microorganismos patógenos dejan de ser sensibles a los antimicrobianos con los que antes se podían combatir, lo que hace que las infecciones sean más difíciles de tratar y aumenta el riesgo de propagación de enfermedades y de su severidad (OMS, 2023).

A riesgo de simplificar demasiado el problema de la RAM, se podría decir, que los principales impulsores de la RAM en humanos son: i) la prescripción inadecuada de antimicrobianos en la práctica médica, ii) el uso inapropiado de antimicrobianos en la producción animal, y iii) la propagación de genes de resistencia a antibióticos (ARG) en el medio ambiente (Mundaca-Shah, Ogawa, y Nicholson, 2017). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) de 2017, las infecciones por bacterias resistentes (por ejemplo, *E. coli*, *K. pneumoniae*) se han asociado con entornos hospitalarios y de atención médica. También se sabe que las personas pueden infectarse por bacterias resistentes presentes en los animales, o a través de productos alimenticios derivados de ellos (por ejemplo, bacterias zoonóticas resistentes). En este sentido, hay evidencia de la relación entre el uso de antibióticos

en animales destinados al consumo humano y la detección posterior de RAM en bacterias de humanos (ECDC, EFSA y EMA, 2017; Landers et al., 2012). La RAM en bacterias zoonóticas está muy extendida y se ha asociado con el uso de antibióticos en la práctica veterinaria (EFSA y ECDC, 2021).

2.1.2. Los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos

La RAM no es más que un fenómeno natural asociado a la evolución de las bacterias para defenderse de las sustancias antimicrobianas excretadas por bacterias competidoras o como defensa de las sustancias que ellas mismas son capaces de producir (Davies y Davies, 2010), por lo que no debe considerarse algo específico de la era moderna. De hecho, se ha detectado resistencia a los antibióticos actuales en bacterias aisladas de capas de permafrost que datan de hace más de 30.000 años (D'Costa et al., 2011). Así, los mecanismos de RAM están relacionados con la capacidad de las bacterias para superar la actividad de los antimicrobianos.

Estos mecanismos están generalmente controlados genéticamente, y es la expresión/anulación de determinados genes lo que suele hacer resistentes a las bacterias. Estos genes pueden estar presentes de forma natural en la bacteria, es la denominada resistencia intrínseca o natural. En algunos casos la resistencia intrínseca tiene que ver con la ausencia en la bacteria de determinadas estructuras diana para los antibióticos, como ocurre con la falta de pared en el género *Mycoplasma* y su resistencia a los betalactámicos (Munita y Arias, 2016).

La resistencia también puede ocurrir tras la aparición/anulación de genes mediante mutaciones, o incluso por transmisión de genes entre bacterias por transferencia genética horizontal (TGH). Es lo que entendemos por resistencia adquirida. Así, esta ocurre cuando una bacteria inicialmente sensible a un determinado antimicrobiano, a la dosis recomendada, deja de serlo y ya no puede ser inhibida o destruida ni con mayores dosis de ese antibiótico ni con mayores tiempos de exposición al mismo (Munita y Arias, 2016).

La resistencia por mutaciones se asocia sobre todo a entornos clínicos, o a lugares donde se utilizan antibióticos (Martínez, 2009). La exposición a dosis no letales de antibióticos (algo que puede ocurrir en esos entornos) provoca estrés oxidativo en las bacterias, es decir, un desequilibrio en sus niveles de especies reactivas de oxígeno (radicales libres, peróxidos, etc.), conocidas por ser responsables de alteraciones del ADN a nivel bacteriano, provocando tanto mutaciones como respuestas reparadoras al daño celular que pueden acabar causando mutaciones (Choffnes, Relman y Mack, 2010).

En cuanto a la TGH, puede ocurrir por diferentes mecanismos, dependiendo de si la presencia de genes de resistencia (GR) está en una bacteria viva y se transfiere a otra bacteria por contacto a través de pili (conjugación), o a través de virus (transducción); o si los GR se

encuentran en el entorno bacteriano, después de que el ADN bacteriano haya sido "liberado" de bacterias muertas, y son adquiridos por otra bacteria (transformación). La TGH se ve favorecida cuando los GR se localizan en elementos genéticos móviles como plásmidos, transposones, etc. En general, la TGH se asocia a entornos humanizados, pero no necesariamente clínicos (alcantarillado, aguas residuales, campos fertilizados con purinas animales, etc.), donde la presión selectiva antibiótica sobre las bacterias ambientales es mucho menor (Martínez, 2009). Estos mecanismos de TGH son los principales impulsores de la resistencia adquirida.

Los mecanismos bioquímicos que conducen a la RAM inducidos por estos mecanismos genéticos pueden ser de varios tipos, principalmente los siguientes: i) inactivación del antibiótico por enzimas producidas por la bacteria, p. ej. las betalactamasas; ii) modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al punto diana, p. ej. mutaciones que modifican las porinas de la pared impidiendo la entrada de ciertos antibióticos (betalactámicos) o alterando los sistemas de transporte (aminoglucósidos en los anaerobios); iii) bombas de eflujo, que favorecen la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que se acumule en cantidad suficiente para que actúe eficazmente; iv) alteración de lugares diana para los antibióticos, impidiendo o dificultando su actividad, p. ej. alteraciones a nivel del ADN girasa (resistencia a quinolonas), del ARNr 23S (macrólidos) o de las enzimas proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) necesarias para la formación de la pared celular (resistencia a betalactámicos); v) inactivación del antibiótico por síntesis de metabolito antagonista (sulfamidas) y, vi) utilización de vías metabólicas alternativas, para evitar el uso de las alteradas por el antibiótico (Munita y Arias, 2016).

Una bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas, todo lo cual complica el estudio de la RAM a los distintos antimicrobianos.

2.1.3. La resistencia antimicrobiana en la práctica veterinaria

Hoy en día, nadie duda de que la medicina veterinaria ha contribuido en mayor o menor medida al desarrollo del problema de la RAM. El uso de antibióticos en la producción primaria ha favorecido la selección de bacterias resistentes en los animales de abasto (Davies y Davies, 2010) que se han convertido en potenciales reservorios de genes de resistencia a los antibióticos (Antonelli et al., 2019; Seiffert et al., 2013).

Aunque la presencia de genes de resistencia en bacterias no es un fenómeno nuevo, lo que sí que es nuevo es la gran presión selectiva ejercida por el uso generalizado de antibióticos

sobre las bacterias tanto en medicina humana como veterinaria. Desde la década de 1950, esta presión impuesta por el uso de antibióticos con fines tanto clínicos como no clínicos ha aumentado de forma espectacular. Como consecuencia, las bacterias han desarrollado y refinado estrategias para resistir los efectos de estos agentes antimicrobianos (Schwarz, Loeffler y Kadlec, 2016).

Además del uso propiamente terapéutico, en veterinaria los antibióticos han sido, y están siendo utilizados todavía en algunos países, como promotores de crecimiento en animales de producción (Peng, Salaheen y Biswas, 2014). Como resultado, los animales sanos se exponen rutinariamente a agentes antimicrobianos, lo que proporciona condiciones favorables para el surgimiento, desarrollo, diseminación y persistencia de bacterias resistentes capaces de causar infecciones en animales y humanos (Aidara-kane, 2012). Este tipo de uso de los antibióticos ha sido probablemente una de las actividades que más ha contribuido al desarrollo de las RA, pues la exposición a dosis subterapéuticas se asocia con un mayor riesgo de desarrollo de mutaciones que pueden desembocar en RA (Wen et al., 2022).

Estos microorganismos resistentes que se desarrollan pueden transmitirse de los animales a las personas a través del consumo de los alimentos, contacto directo con animales o por propagación ambiental (Aidara-Kane, 2012). Los genes que codifican la resistencia a los antimicrobianos también pueden ser transferidos a los patógenos humanos, lo que suscita especial preocupación, ya que en muchas ocasiones se usan las mismas clases de antimicrobianos tanto en humanos como en animales. Por todo ello la utilización de antibióticos como promotores de crecimiento fue prohibida en toda la UE en 2006 (Reglamento -CE- No 1831/2003 de 22 de septiembre de 2003) y posteriormente en otros países (EE.UU. en 2017¹, y China en 2020 (Wen et al., 2022).

También se están utilizando con fines profilácticos, uso desaconsejado pues se acaba exponiendo innecesariamente al antibiótico a numerosas bacterias comensales. En la actualidad sólo se recomienda su uso profiláctico en caso de un riesgo microbiológico (infección) evidente en los animales, con el fin de atajarlo lo antes posible. Es lo que se denomina metafilaxis. En general, las nuevas políticas de uso de los antibióticos en sanidad animal exigen llevar a cabo un uso prudente de los antibióticos²

Además de estos usos, en la práctica veterinaria hay otras intervenciones en las que se usan antibióticos a dosis subterapéuticas. Es el caso de la inseminación artificial (IA) porcina que requiere del uso de antibióticos en el diluyente del semen. Sin embargo, su papel potencial en

¹ <https://www.accessscience.com/content/briefing/aBRO125171>

² <https://resistenciaantibioticos.es/es/lineas-de-accion/control/programas-reduccion-sanidad-animal>

el desarrollo, mantenimiento y dispersión de las RA en la cadena de producción porcina ha sido escasamente estudiado hasta el momento.

2.2. La inseminación artificial en el ganado porcino y el desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos

2.2.1. Importancia

La inseminación artificial (IA) en cerdos se viene utilizando desde principios de la década de 1930, pero su verdadero desarrollo y amplia aplicación comercial en la industria porcina no se produjo hasta la década de 1980 (Bortolozzo et al., 2015). La IA ha sido fundamental para el desarrollo del sector porcino y su éxito tiene que ver con las mejoras conseguidas en fertilidad, eficiencia laboral, genética y producción. El establecimiento de centros de IA para el manejo de verracos y producción de semen ha permitido la selección de verracos para fertilidad y producción de esperma utilizando medidas *in vitro* e *in vivo* (Knox, 2016).

Quizás la mayor ventaja de la IA es que le permite hacer un mayor uso de genética nueva y superior a un coste potencialmente más bajo que algunos sistemas de monta natural y con menos riesgo de transmisión de enfermedades. La compra de semen permite la diversidad genética, que se puede utilizar para optimizar los sistemas de cruzamiento en granjas más pequeñas y aumentar el progreso genético. Esto se puede lograr sin el gasto de comprar y mantener un solo verraco superior. Además, los buenos verracos se pueden utilizar de forma más extensiva que los de monta natural, ya que la IA aumenta el número de inseminaciones por eyaculado (Sterle y Safranski, 2018).

La IA es actualmente la forma predominante para la reproducción comercial de cerdas, ya que el aparato reproductivo de las hembras es más propicio para este procedimiento que el de las hembras de otras especies animales (vacas u ovejas) (Sterle y Safranski, 2018). En las cerdas esta práctica es sencilla y rápida de realizar, por ello, es una práctica ampliamente utilizada en países con una producción porcina intensiva (Althouse, 2008). En España se administra al 95% de las reproductoras (Althouse, 2008; Waberski et al., 2019).

Sin embargo, la IA también presenta aspectos negativos, asociados fundamentalmente con los procesos de recolección y manipulación del semen, en los cuales este se puede contaminar por un amplio abanico de microorganismos (Kuster y Althouse, 2016).

2.2.2. Tecnología de la IA (o de la producción de dosis seminales)

El semen de los verracos sanos generalmente no contiene bacterias. Sin embargo, el divertículo prepucial, la piel y el pelo del verraco sí que tienen, al igual que el establo y entorno

de recolección, que pueden contaminar las manos del recolector o el recipiente de recolección. La esterilidad no es una opción práctica para la recolección del semen de cerdo (Kuster y Althouse, 2016).

La contaminación bacteriana del eyaculado se considera anormal cuando el recuento de bacterias por mililitro sobrepasa los 1×10^4 o cuando una bacteria específica logra sobrevivir en el semen (Pineda y Santander, 2007). Sin embargo, de acuerdo con diversas investigaciones, el recuento promedio de células bacterianas en los eyaculados puede llegar a alcanzar $3,6 \times 10^4$ ml, lo cual sobrepasa los límites permitidos para semen fresco (Acosta et al., 2011).

Estas cifras evidencian la alta carga contaminante de bacterias que están presentes en los eyaculados evaluados y la necesidad de tomar medidas urgentes con el propósito de mejorar la calidad higiénica de las dosis seminales, pues la presencia de altas cargas microbianas está relacionada con la pérdida de motilidad espermática, reducción de la fecundación y muerte embrionaria (Acosta et al., 2011).

Para disminuir dicha contaminación se han desarrollado diferentes protocolos de recogida de semen con estrictas medidas higiénico-sanitarias en los centros de inseminación artificial (CIA).

A pesar de ellos, los eyaculados están generalmente contaminados por un amplio rango de bacterias. La mayoría son Gram-negativas, generalmente de la familia *Enterobacteriaceae* (*Serratia* spp., *E. coli*), aunque *Pseudomonas* spp. y *Acinetobacter* spp., así como algunas Gram-positivas (*Enterococcus* spp.) también suelen formar parte de esta microbiota contaminante (Úbeda et al., 2013; Althouse y Lu, 2005).

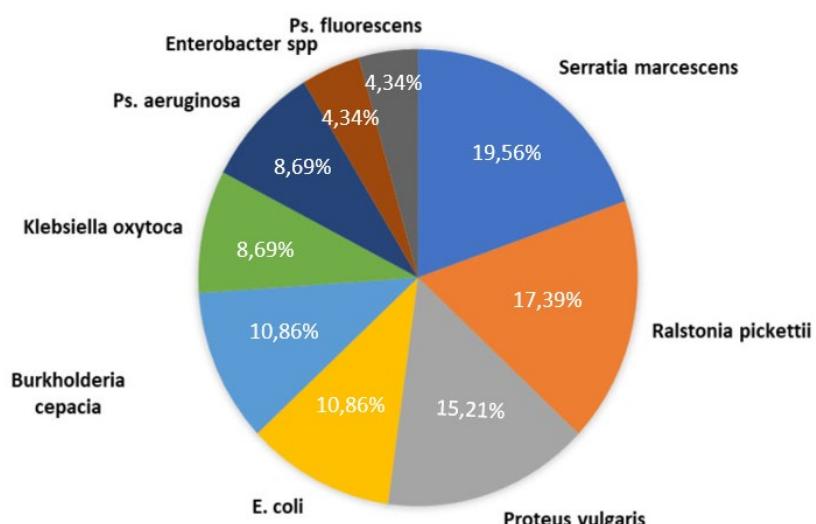


Figura 1. Proporción de bacterias Gram-negativas aisladas e identificadas en dosis de semen diluido (DS) (Costinar et al., 2021).

Como parte integral de los programas de control de calidad, las empresas de reproducción han definido criterios para el semen utilizable que, en muchos casos, incluyen la calidad del esperma el último día de almacenamiento. Los principales parámetros de calidad para las dosis seminales son la motilidad y carga bacteriana. Se considera que el estándar mínimo para la motilidad del semen preservado es del 50-70% de la motilidad total y que la presencia de formas anormales se debe limitar a un máximo del 20-30% (Waberski et al., 2019).

En cuanto a la contaminación bacteriana, su presencia en las dosis seminales suele producir efectos negativos sobre los espermatozoides. Además, los componentes nutritivos utilizados en los diluyentes de semen favorecen el desarrollo y supervivencia de las bacterias, lo que trae como consecuencia la acumulación de toxinas y productos del metabolismo bacteriano. Los productos metabólicos como endotoxinas y metabolitos ácidos que estos contaminantes producen tienen un efecto espermicida directo (Pineda y Santander, 2007).

Por ello muchas organizaciones exigen la completa ausencia de bacterias aerobias determinadas hasta la fecha de vencimiento del uso de las dosis seminales, a pesar de que hay estudios que informan valores umbral para las bacterias aerobias mesófilas de entre 10^3 y 10^7 UFC/ml antes de que se manifiesten los efectos adversos sobre la calidad del esperma o la fertilidad (Waberski et al., 2019).

Este deseo de eliminar prácticamente todas las bacterias de las dosis de semen fomenta el uso excesivo de antibióticos en los diluyentes de semen, lo que aumenta el riesgo de generar cepas de bacterias multirresistentes en los sementales de IA. Es importante por ello que se cuestione la necesidad de una eliminación bacteriana completa, especialmente porque, en condiciones fisiológicas, una gran cantidad de bacterias comensales se transfieren al útero sin comprometer la fertilidad (Waberski et al., 2019).

Tradicionalmente, la penicilina y la estreptomicina eran la combinación antimicrobiana habitual que se añadía a los diluyentes. Hoy en día, la clase de antimicrobianos conservantes más popular utilizada en los diluyentes de semen porcino son los aminoglucósidos, especialmente la gentamicina (Schulze et al., 2015), pero que se suele utilizar con una combinación de diferentes antibióticos de amplio espectro (penicilina, estreptomicina, lincomicina, espectinomicina) altamente potentes, cada uno a una concentración menor de la que se requeriría individualmente, con el fin de reducir la toxicidad espermática (Althouse, Pierdon y Lu, 2008). A veces también se pueden incluir "antibióticos de importancia crítica para la medicina humana" (por ejemplo, cefalosporinas de 3^a generación -ceftiofur-) (Gadea, 2003; Raheja et al., 2018).

El uso y las concentraciones de antibióticos en los diluyentes utilizados para el esperma porcino está regulado por el Reglamento delegado (UE) 2020/686 de la Comisión de 17 de

diciembre de 2019, que completa el Reglamento (UE) 2016/429 (referente a la autorización de los establecimientos de productos reproductivos y a los requisitos zoosanitarios y de trazabilidad aplicables a los desplazamientos dentro de la UE de productos reproductivos de determinados animales terrestres en cautividad)³. De acuerdo con este reglamento, los antibióticos a utilizar deben ser los equivalentes a “una combinación de antibióticos, eficaces en particular contra leptospiras y micoplasmas”. Dicha combinación deberá tener, al menos, un efecto equivalente a las diluciones siguientes:

- 500 µg de estreptomicina por mililitro de dilución final.
- 500 UI de penicilina por mililitro de dilución final.
- 150 µg de lincomicina por mililitro de dilución final.
- 300 µg de espectinomicina por mililitro de dilución final.

A pesar de la utilización de antibióticos en el diluyente seminal, se detectan bacterias contaminantes de las dosis seminales porcinas. De acuerdo con algunos estudios, alrededor del 24% de las dosis seminales podrían presentar contaminación bacteriana (Althouse, Pierdon y Lu, 2008; Schulze et al., 2015). En otro estudio realizado en el Laboratorio de Andrología de Referencia de la Universidad de Pensilvania (EE.UU.) esta proporción osciló a lo largo de los años (32% en 2002 y 2003, 17% en 2005 y el 26% en 2006). En España, en 2012, se notificó una prevalencia ligeramente inferior (14,73%) para la contaminación bacteriana aeróbica en muestras de dosis seminales cultivadas en un laboratorio de control de calidad (Kuster y Althouse, 2016).

La mayoría de las bacterias recuperadas a partir de cultivos de dosis seminales son bacterias Gram-negativas, con un gran porcentaje de la familia *Enterobacteriaceae* (Kuster y Althouse, 2016). Las bacterias más comúnmente identificadas a partir de dosis seminales porcinas se presentan en la Tabla 1 (Decuadro-Hansen, 2000).

Otros patógenos contaminantes encontrados, pero de manera más ocasional, son micoplasmas (*M. hyopneumoniae*, *M. hyorinis* y *M. verecundum*) y los ureoplasmas, sin embargo, no existe consenso general respecto a su presencia en el semen, ya sea debido a la baja frecuencia de aislamientos realizados o a las dificultades prácticas para poner en evidencia estos agentes por cultivo microbiológico. También se encuentran a veces levaduras, pero probablemente como resultado de una contaminación exógena (Decuadro-Hansen, 2000).

³ <https://www.boe.es/doue/2020/174/L00001-00063.pdf>

Tabla 1. Principales bacterias encontradas en el semen de verraco (Decuadro-Hansen, 2000).

1. <i>Aerobacter</i>	11. <i>Klebsiella</i>
2. <i>Alcaligenes</i>	12. <i>Micrococcus</i>
3. <i>Bacillus (subtilis, cereus)</i>	13. <i>Moraxella</i>
4. <i>Bacteroides</i>	14. <i>Neisseria</i>
5. <i>Bordetella bronchiséptica</i>	15. <i>Peptostreptococcus</i>
6. <i>Brucella suis</i>	16. <i>Proteus</i>
7. <i>Citrobacter</i>	17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8. <i>Corynebacterium (suis, pyogenes)</i>	18. <i>Serratia</i>
9. <i>E. coli</i>	19. <i>Staphylococcus (epidermidis, aureus)</i>
10. <i>Enterobacter</i>	20. <i>Streptococcus (D, L, C, E... y hemolítico)</i>

En 2014, Morrell y Wallgren, realizaron un análisis de riesgos y beneficios sobre el uso de antibióticos en los diluyentes seminales que se puede resumir diciendo que, por un lado, sin el uso de antibióticos el riesgo que existe es que además de poder causar enfermedad en las hembras inseminadas, las bacterias compiten con los espermatozoides por los nutrientes en la dosis seminal y producen productos tóxicos y LPS; y por otro lado, mediante su uso, además de la aparición de resistencias, pueden ser tóxicos para los espermatozoides y también conducir a la contaminación del ambiente.

Como se ha indicado anteriormente, el uso a bajas concentraciones de antibióticos en el diluyente seminal podría favorecer el desarrollo de RAM (mutaciones) o la selección de bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos incorporados en el diluyente. De hecho, esta resistencia a los antimicrobianos utilizados en el diluyente de semen es una característica relativamente común de las bacterias aisladas de las dosis seminales.

En un estudio realizado en los EE. UU. se detectó que el 86% de las bacterias encontradas en las dosis seminales presentaban RAM a los antibióticos utilizados en su preparación (Althouse y Lu, 2005). En otro estudio en Europa se observó la presencia de bacterias resistentes a la gentamicina en el 26% de las dosis y en el 66,7% de los CIA (Schulze et al., 2015). Ello implicaría que con la administración del semen se podrían estar inoculando bacterias con RAM directamente al tracto genital de las cerdas.

Se puede entender mejor la importancia que puede tener el uso de antibióticos en esta práctica veterinaria atendiendo a las cifras de consumo. Cada año, en el sector porcino mundial se utilizan aproximadamente 12,8 millones de litros de semen que contienen antibióticos (Schulze et al., 2015). A modo de ejemplo, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) de 2021, en España hay un censo de 2.575.000 cerdas reproductoras, casi todas ellas inseminadas artificialmente. Si una cerda es, en promedio, inseminada 6 veces al año, y el volumen medio de una dosis seminal es de 80 mL, considerando el uso de una combinación de antibióticos que tendría un efecto bactericida equivalente al de los antibióticos o sus mezclas

indicadas en dicho Reglamento, podría estimarse que la práctica de la IA porcina en España podría implicar al menos el uso de casi 2 toneladas de antibióticos por año (Tabla 2).

Tabla 2. Estimación de las toneladas de antibiótico utilizado para dosis seminales de porcino en España considerando las concentraciones de antibiótico a usar de acuerdo con la legislación (2023).

	España	Total año
Nº de cerdas	2.575.000	
Nº Inseminaciones Artificiales	6 (cerda/año)	15.450.000
Volumen dosis seminal (L)	0,08	1.236.000
Antibióticos*		Total año (g) Toneladas/año
Estreptomicina (0,5 g/L)		618.000
Lincomicina (0,15 g/L)		185.400 1,8
Espectinomicina (0,3 g/L)		370.800
Penicilina (0,5 g/L)		618.000

*Concentraciones indicadas en el Reglamento delegado (UE) 2020/686, Anexo 3, Parte 1, punto 3 a). Elaboración propia.

Un problema añadido es que en la inseminación intracervical, durante el procedimiento de inseminación estándar, aproximadamente el 70% del volumen de la dosis seminal infundida se suele eliminar por reflujo durante o después de la inseminación, lo que supone un vertido extra de antibióticos al medioambiente (Bortolozzo, 2015).

Así, el uso de antibióticos en la IA porcina podría contribuir a la diseminación de las RAM de diversas maneras, por lo que se requieren estudios que valoren en profundidad el papel que la IA porcina podría tener en este problema de Salud Pública.

3. Justificación y objetivos

Es bien conocido que la exposición de las bacterias a dosis subterapéuticas de antibióticos puede ayudar a seleccionar bacterias resistentes o promover el desarrollo de RAM. La IA porcina es una práctica veterinaria ampliamente extendida en el mundo que utiliza antibióticos a dosis reducidas.

Por ello, el objetivo general de este trabajo es estudiar el impacto que una intervención veterinaria masiva como la IA porcina, podría tener en la evolución y propagación de la RAM. Para ello, se evalúa en un primer momento la presencia de bacterias contaminantes en las dosis seminales porcinas listas para ser utilizadas, centrándose en aquellas que hayan sobrevivido en dosis seminales tras 4 y 8 días de contacto con los antibióticos presentes en los diluyentes seminales.

Posteriormente se identifican las bacterias contaminantes de dosis seminales, para determinar los principales grupos bacterianos que aparecen y su origen probable, así como su prevalencia, pues es escasa la información disponible sobre este tema en España.

Considerando que no se ha descubierto ninguna nueva clase de antibióticos desde 1980 (Es particularmente preocupante que desde 1962 no se ha descubierto ningún antibiótico nuevo para tratar las bacterias Gram-negativas, uno de los principales grupos bacterianos asociados con la RAM y un contaminante importante de los diluyentes de semen porcino (Coates, Halls y Hu, 2011; Wellcome, 2020), otro de los objetivos específicos es la caracterización fenotípica, mediante la estimación de la concentración mínima inhibitoria -CMIs-, de la sensibilidad antibiótica de las bacterias identificadas, para determinar la posible presencia de RAM.

Un conocimiento más profundo del fenómeno de la RAM en diferentes contextos como el de la reproducción animal puede, por un lado, proporcionar respuestas innovadoras, eficaces y sostenibles al problema de la RAM con el fin de reducir su aparición y propagación mundial, y, por otro lado, contribuir al descubrimiento que tanto urge de todos los mecanismos que explican la aparición y transmisión de la RAM.

Como un objetivo a largo plazo, este trabajo tiene como propósito servir de base para una investigación posterior y más detallada acerca de la probabilidad de transmisión de la RAM a cerdas inseminadas con dosis seminales contaminadas con bacterias resistentes. Esto último podría ayudar a determinar la posible transmisión de dichas RAM a los lechones nacidos de esas cerdas y su posible incorporación a la cadena de producción porcina.

4. Material y métodos

4.1. Selección de las dosis seminales

Se cuenta con la colaboración de tres centros de IA en la provincia de Zaragoza:

- Centro de Inseminación Artificial (CIA) de San Mateo de Gállego, Zaragoza (CIA 1).
- CIA de Plasencia de Jalón (Cerdos del Jalón SAU), Zaragoza (CIA 2).
- CIA de Cinco Villas, Tauste, Zaragoza (CIA 3).

Estos CIA suministran dosis seminales a miles de cerdas reproductoras de granjas repartidas por todo Aragón. En cada una se dispone de más de 150 verracos.

De cada dosis seminal se recoge la identificación del macho, el centro de recogida y la fecha de obtención de la muestra. Las dosis seminales se pueden preparar a partir de una mezcla de semen fresco de varios verracos (dosis seminales heterospérmicas), o de un solo verraco (dosis monospérmicas). Las dosis monospérmicas son las muestras de elección siempre que sea posible.

4.2. Aislamiento e identificación bacteriana (VITEK-2 y 16S)

Una vez recogidas las dosis seminales se mantienen en las condiciones habituales de refrigeración ($15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y se analizan el día 4 y 8 post recolección del eyaculado. De cada dosis se siembra 0,1 mL sin dilución previa en dos medios de cultivo: MacConkey y agar sangre. Se utiliza agar MacConkey como medio selectivo para la detección fundamentalmente de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, al tratarse de uno de los grupos de bacterias contaminantes más prevalentes en el semen fresco (Úbeda et al., 2013; Althouse y Lu, 2005). Por el contrario, el agar sangre es un medio de enriquecimiento que permite el crecimiento de un gran número de bacterias (Gram-negativas y Gram-positivas). Se utilizan tanto en condiciones aerobias como en anaerobiosis para ampliar el rango de detección. Las diferentes colonias bacterianas obtenidas se aislan de cada medio para su posterior identificación.

Para la identificación de cada colonia bacteriana se realiza en primer lugar la prueba del KOH para determinar si puede establecerse si es Gram-positivas o Gram-negativas. Si la prueba da un resultado claramente positivo (es decir, existe viscosidad evidente) se trata de una bacteria Gram-negativa y si da negativo posiblemente una Gram-positiva. En aquellas cepas donde hay dudas se les realiza la clásica tinción de Gram.

Una vez determinado el tipo de bacteria se procede a la identificación mediante el equipo de análisis microbiológico VITEK-2 (BioMérieux, Madrid). El VITEK-2 es un sistema automatizado para la identificación bacteriana y análisis de susceptibilidad antimicrobiana. Este

sistema tiene una alta fiabilidad y es particularmente eficaz cuando se usa para microorganismos Gram-negativos y Gram-positivos de interés clínico.

En el caso de aislar microorganismos no identificables por el VITEK-2, se utilizan técnicas de secuenciación de próxima generación (NGS) para su identificación. ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1.500 pb, codificado por el gen rrs, también denominado ADNribosomal 16S (ADNr 16S). En particular, se pueden secuenciar distintas regiones variables comparando las secuencias obtenidas en una base de datos para la tipificación bacteriana. En nuestro caso elegimos la región variable V5-V6 del ARNr16S de las bacterias (mediante los primers 27F y 1492R descrito). Este gen bien conservado es, con diferencia, el marcador genético más utilizado, debido a su presencia en todas las bacterias. Es fácil de secuenciar después de un proceso común de amplificación por PCR y existen grandes bases de datos para comparar los resultados obtenidos. Además, su costo es similar al VITEK-2.

En cuanto al procedimiento de la PCR para realizar la secuenciación del 16S, se llevan a cabo los siguientes pasos:

1. Extracción de ADN:

Se extrae el ADN bacteriano realizando una extracción por calor (a 98°C durante 10 minutos en un baño seco) de una suspensión bacteriana en cultivo puro realizada en 200 µlitratos de agua tipo I estéril. Tras el calentamiento se retiran los restos bacterianos mediante una centrifugación a 6000g durante 2 minutos y conservando el sobrenadante para la realización de la PCR.

2. Preparación de la PCR:

Los reactivos que se utilizan son *primers* (27F y 1492R), mononucleótidos (A_T_C_G), TAC polimerasa (platinum de Invitrogen), el ADN bacteriano a amplificar y *buffers* de la enzima TAC platinun de Invitrogen) (10 PC Buffer y 50 mg MgCl):

a) Los *primers* seleccionados son el 27F --> 5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3'; y el 1492R-

-> 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') descritos por Lane, (1991). Se encargan comercialmente (IDT) y se prepara una solución stock de 100 µmolar siguiendo las instrucciones del proveedor. Para la realización PCR se emplean en una dilución 10 µmolar (diluido 1/10).

b) Los mononucleótidos comerciales (Biotoools) a una concentración de 25 µmolar cada uno se emplean a una concentración de 10 µmolar.

c) Preparación de la mezcla (*mastermix*) de los componentes anteriores se realiza para obtener un volumen total de 50 µl de producto PCR (Tabla 3).

Tabla 3. Protocolo para preparación de la *mastermix*.

Agua tipo I estéril	57, 7 µl
10 PC Buffer	5 µl
50 mg MgCl	1,5 µl
dNTP10 M	1 µl
16S-27F	1 µl
16S-1492R	1 µl
Taq Platinum	0,2 µl
ADN bacteriano extraído por calor	4 µl
TOTAL	50 µl

3. PCR:

Las distintas muestras se introducen en el termociclador (Applied Biosistem) siguiendo el protocolo de temperaturas específico de PCR para amplificación de los productos en las distintas muestras (Tabla 4).

Tabla 4. Protocolo termociclador para realización de PCR 16S ARNr (Elaboración propia, 2023).

FASE	TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización inicial	94°C	2 minutos
Ciclos PCR (Realizar 30 ciclos)	94°C 55°C 72°C	30 segundos 30 segundos 30 segundos
Extensión final		
Final	4°C	∞

4. Revelado de la PCR:

El revelado de la amplificación de los productos PCR se lleva a cabo solo utilizando 5 µl de cada producto PCR amplificado con su correspondiente Ladder (Azul de bromofenol), en geles de agarosa al 1,5% en Buffer TBE empleando SyberSafe en el gel (Invitrogen) para el contraste. Se someten a 120 v durante 20-30 minutos y se visualizan las bandas de amplificación comparándolas con un patrón de 100 pb. Todas las bandas positivas se purifican con un kit comercial de columnas (Favorgen, Viena, Austria).

5. Purificación y envío de muestras:

La purificación se realiza según instrucciones precisas del fabricante:

- 5.1. Transferir 45 µl de producto PCR a un tubo de microcentrífuga y agregar 5 volúmenes de buffer FADF, mezclar bien y homogeneizar en el vortex.
- 5.2. Depositar la columna de FADF en un tubo de recogida.
- 5.3. Transferir la muestra mezclada a una columna de FADF, centrifugar (10.000 x g, 30 segundos) y eliminar el sobrenadante.

- 5.4. Añadir 750 µl de Agua de Buffer (con etanol) a la columna de FADF. Centrifugar (10.000 x g, 30 segundos) y eliminar el sobrenadante.
- 5.5. Centrifugar (~ 18.000 x g, 3 minutos) para secar la matriz de la columna.
- 5.6. Colocar la columna de FADF en un nuevo tubo de microcentrífuga y añadir 40 µl de Buffer de Elución o ddH₂O al centro de la membrana de la columna de FADF. Esperar 1 minuto.
- 5.7. Centrifugar (~ 18.000 x g, 1 minuto) para eluir el ADN.
- 5.8. Refrigerar las muestras hasta su envío al laboratorio designado para secuenciar las muestras.

Cada producto PCR purificado se remite a secuenciar a una empresa (STATVIDA) por duplicado (por ambos lados, F y R). Para ello se mezcla 10 µl de producto PCR purificado con 3 µl de primer 27F a una concentración 10 µmolar en un tubo y otros 10 µl de producto PCR purificado con 3 µl de primer 1492R a una concentración 10 µmolar. Con ello se cubre un gran rango del gen, más o menos 500 pb con el 27F (que incluye regiones variables 1-3) y otras 500 pb con el 1492R (que incluye V6-9).

6. Interpretación de los resultados:

Las secuencias recibidas se interpretan a partir del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Estas secuencias se comparan en la base de datos NCBI para identificar al organismo con el objetivo de conseguir llegar al género y la especie.

4.3. Caracterización de la resistencia antimicrobiana (RAM)

Todos los aislamientos no anaerobios identificados se analizan para determinar su patrón fenotípico de susceptibilidad a los antibióticos. Este análisis también se realiza utilizando el sistema VITEK-2. Este equipo permite estimar las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMIs) para cada antibiótico ensayado, es decir, la concentración mínima de antibiótico requerida para inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo, siendo así una técnica más precisa que los antibiogramas clásicos. La selección de antibióticos a realizar está relacionada con el grupo (Gram positivo o Gram-negativa) y la especie bacteriana analizada, y con el origen de la cepa (animal o humano). En concreto, en nuestro caso se utilizan tarjetas del VITEK-2 para cepas de origen animal. En caso de detectar más de una cepa de un mismo género/especie bacteriano en la misma muestra de dosis seminal, solo se analiza una de las cepas.

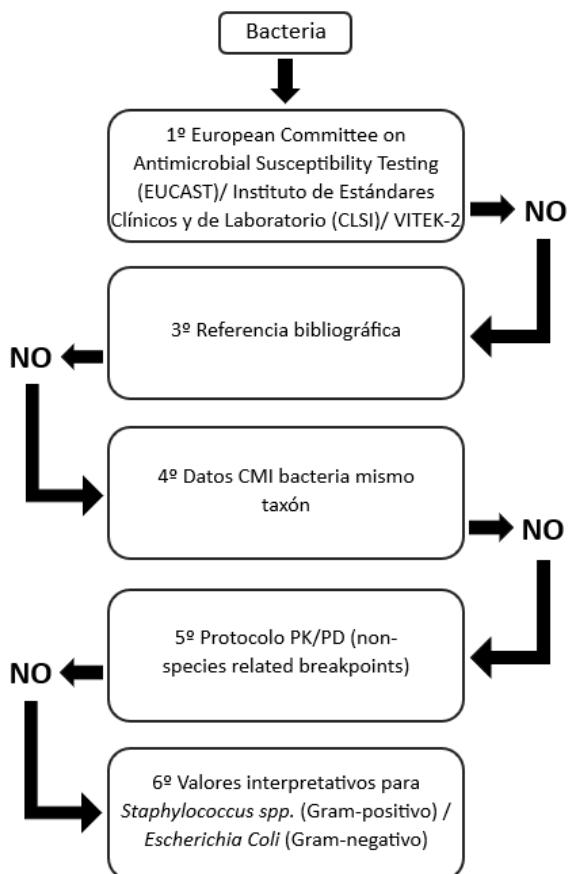
Los antibióticos testados para Gram-positivos son cefoxitina, bencilpenicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, oxacilina, cefalotina, cefovecina, ceftiofur, gentamicina,

kanamicina, neomicina, enrofloxacino, marbofloxacino, pradofloxacina, eritromicina, clindamicina, tetraciclina, nitrofurantoína, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazol.

En el caso de Gram-negativo se testaron betalactámicos de espectro extendido (BLEE), ampicilina, amoxicilina/ácido clavulánico, ticarcilina/ ácido clavulánico, cefalexina, cefalotina, cefoperazona, ceftiofur, cefquinoma, imipenem, gentamicina, neomicina, flumequina, enrofloxacino, marbofloxacino, tetraciclina, florfenicol, polimixina B, trimetoprim/sulfametoxazol.

Figura 2. Orden para interpretación de los valores de CMI de las distintas bacterias (elaboración propia, 2023)*

*Dado que el VITEK-2 solo interpreta RAM de aislados de interés clínico, en el caso de otros aislados, se obtienen las CMIs y para su interpretación se sigue el siguiente esquema: en primer lugar, siempre que haya valores de referencia (bien por EUCAST: Comité europeo del antibiograma o CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) de RAM para la cepa aislada, se consideran esos valores. En caso de no haber información para la bacteria aislada, se recurre a la búsqueda de referencias bibliográficas que hayan podido interpretar los valores de CMIs. Si no hay referencias bibliográficas, se utilizan los valores interpretativos de otra bacteria cercana taxonómicamente a la bacteria problema. En caso de seguir sin resultados, utilizar las tablas del Protocolo PK/PD (non-species related breakpoints) del EUCAST de 2023. Finalmente, si no se dispone tampoco de información, se compara las CMIs de la bacteria problema con la interpretación que daría el VITEK-2 para esas CMIs en caso de que fuera una bacteria tipo Gram-positiva (*Staphylococcus* spp.) o Gram-negativas (*E. coli*).



5. Análisis estadísticos

Se realiza una descripción de las frecuencias de aparición (prevalencias) para cada grupo bacteriano detectado con su correspondiente intervalo de confianza del 95% (MedCalc, Ostend, Belgium).

6. Resultados

6.1. Prevalencia de contaminación bacteriana en las dosis seminales de 4 y 8 días post-recogida

Se obtuvieron un total de 12 dosis seminales procedentes de un total de 16 verracos, 10 dosis eran monospérmicas y 2 eran heterospérmicas (una formada con el semen de 4 machos y otra con el semen de 2 machos). En dos de ellas (16,67%), no hubo crecimiento bacteriano en ninguno de los dos análisis (4 y 8 días post-recogida), por lo que el 83,33% (IC95% = 55,20-95,30) de las dosis seminales resultaron positivas en al menos uno de los cultivos bacteriológicos realizados.

De las dosis seminales en los que sí que hubo crecimientos, se obtuvieron un total de 37 cepas diferentes repartidas de la siguiente forma: CIA 1 (7 machos, 7 cepas), CIA 2 (7 machos, 25 cepas) y CIA 3 (2 machos, 5 cepas).

Respecto al análisis según el día post recogida, el número total de dosis en las que hubo crecimientos bacterianos el día 4 post-recogida fue de 9 (75%; IC95% = 46,77-91,11) y para el día 8 fue de 7 (58,33%; IC95% = 31,95-80,67), con 18 (48,65%) cepas el día 4 y 19 (51,35%) el día 8.

6.2. Identificación bacteriana y RAM

De las 37 cepas bacterianas aisladas se pudieron identificar un total de 22 (59,5%) mediante el sistema VITEK-2 y 15 (40,54%) tras la secuenciación del gen 16S. La mayoría de las cepas aisladas pertenecían al grupo de las Gram-positivas (26 cepas; 70,27%; IC95% = 54,22-82,51).

Se identificaron un total de once órdenes diferentes: *Micrococcales* (35,14%, 13 cepas), *Sphingomonadales* (16,22%, 6 cepas), *Lactobacillales* (10,81%, 4 cepas), *Mycobacteriales* (8,11%, 3 cepas), *Bacillales* (5,41%, 2 cepas), *Actinomycetales* (5,41%, 2 cepas), *Burkholderiales* (5,41%, 2 cepas), *Propionibacteriales* (5,41%, 2 cepas), *Eubacteriales* (2,70%, 1 cepa), *Enterobacteriales* (2,70%, 1 cepa) y *Bacteroidales* (2,70%, 1 cepa). Dentro de estos órdenes se identificaron 16 familias que incluían un total de 20 géneros (Tabla 5).

Atendiendo al número de cepas, el género más abundante fue *Sphingomonas* (16,22%, 6 cepas), seguido del género *Isoptericola* (10,81%, 4 cepas) y del género *Kocuria* (10,81%, 4 cepas). El resto de géneros detectados se presenta en la Tabla 5.

De todas las mencionadas con anterioridad, a continuación, se describen las cepas más relevantes clínicamente y aquellas más prevalentes. Se describen así mismo los resultados de

los análisis de sensibilidad antibiótica excluyendo todas aquellas cepas anaerobias estrictas para las que no se pudo realizar.

Tabla 5. Número e identificación (Orden, Familia y Género) de las cepas identificadas en 10 dosis seminales porcinas.

	Orden	Familia	Género	Nº de cepas
Gram-positivas	Micrococcales	Promicromonosporaceae	<i>Isoptericola</i>	4
			<i>Cellulosimicrobium</i>	3
		<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>	4
			<i>Rothia</i>	1
		Streptococcaceae	<i>Brevibacterium</i>	1
	Lactobacillales	Carnobacteriaceae	<i>Alloicoccus</i>	1
			<i>Granulicatella</i>	1
			<i>Streptococcus</i>	1
		Aerococcaceae	<i>Globicatella</i>	1
	Bacillales	Staphylococcaceae	<i>Gemella</i>	1
			<i>Staphylococcus</i>	1
Gram-negativas	Mycobacteriales	Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	2
		Norcardiaceae	<i>Rhodococcus</i>	1
	Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Trueperella</i>	2
	Propionibacteriales	Propionibacteriaceae	<i>Cutibacterium</i>	2
	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	6
	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	2
	Eubacteriales	Oscillospiraceae	<i>Ercella</i>	1
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Salmonella</i>	1
	Bacteroidales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	1
	Total	11	15	20
				37

6.2.1. Géneros *Isoptericola* y *Cellulosimicrobium*

Los dos géneros se identificaron mediante secuenciación del gen 16S. Se trata de dos géneros bacterianos Gram-positivos que se encuentran filogenéticamente muy cercanos (Coletta-Griborio et al., 2017, Figura 3) y que solo pudieron identificarse a nivel de género.

En cuanto a *Isoptericola*, se trata de bacterias ambientales anaerobias facultativas, de las cuales no se ha podido encontrar información clínica relevante. Este género, pertenece al orden Micrococcales y a la familia Promicromonosporaceae (Parte et al., 2020). Hay referencias sobre *Isoptericola variabilis*, que actuaría como especie tipo de este género y para la cual se describe su capacidad de hidrolizar el nitrilo, lo cual podría ser útil para la síntesis de productos

farmacéuticos y productos químicos básicos, el tratamiento de aguas residuales o la degradación de herbicidas (Kaur et al., 2014). Existen también referencias de *Isoptericola cucumis*, aislada a partir de la raíz del pepino (Kämpfer et al., 2016). En general, no parece ser una bacteria clínicamente relevante. En este trabajo se han hallado 4 cepas de este género, 3 en dosis seminales del día 4 y 1 del día 8.

Respecto al género *Cellulosimicrobium*, pertenece al orden *Micrococcales* y familia Promicromonosporaceae (Parte et al., 2020). Se detectaron 3 cepas de este género (2 el día 4 y 1 el 8). Se trata de bacterias anaerobias facultativas cuya especie tipo es *C. cellulans*. Esta especie tiene una distribución mundial y se encuentra en el medio ambiente, principalmente en el suelo, el agua, los residuos vegetales y en la materia orgánica descompuesta. Hay referencias de que puede afectar a pacientes inmunocomprometidos, pero también se ha implicado en infecciones por cuerpos extraños (catéteres venosos centrales, peritoneales o prótesis) en pacientes inmunocompetentes. También se ha relacionado con infecciones neonatales y peritonitis entre otras patologías (Coletta-Griborio et al., 2017).

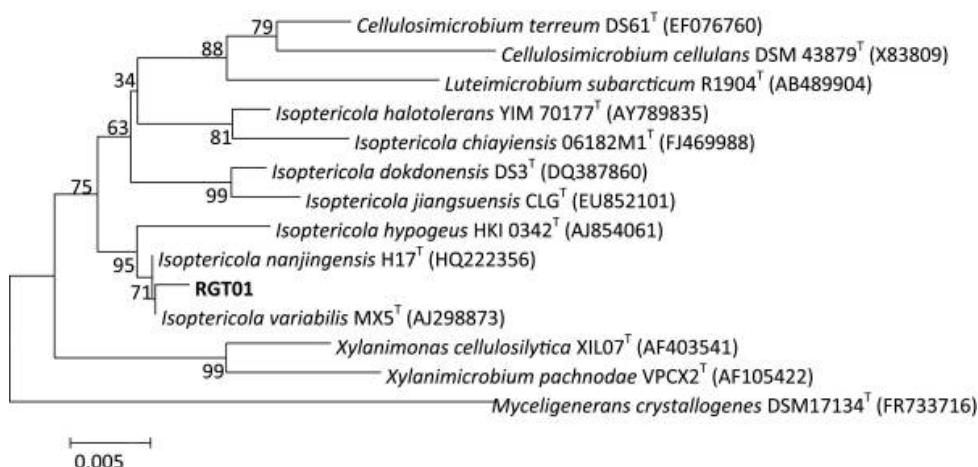


Figura 3. Árbol filogenético de *Isoptericola variabilis* y organismos relacionados basado en las secuencias de ADNr 16S (Kaur et al., 2014).

En cuanto a las resistencias de ambos géneros, no existen referencias para la interpretación de las CMI obtenidas. Comparando las CMI de *Cellulosimicrobium* con los valores umbrales que definen resistencia para *Staphylococcus* spp. según el Comité europeo del antibiograma (EUCAST) de 2023, se observaron valores de CMI por encima de ese umbral para bencilpenicilina, kanamicina, pradofloxacina, clindamicina, tetraciclina y nitrofurantoína en las tres cepas (Tabla 6).

Respecto a *Isoptericola*, podría existir resistencia para bencilpenicilina y nitrofurantoína. También podríamos sospechar de resistencia para clindamicina y tetraciclina, ya que 2 de 4

cepas presentaron valores elevados para el primero y para el segundo (≥ 4 y ≥ 16 , respectivamente).

Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en $\mu\text{g/ml}$) para las cepas de *Cellulosimicrobium* e *Isoptericola* con sospecha de poder presentar resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus* spp., de acuerdo con EUCAST, 2023; Pengov y Ceru, 2003, para kanamicina y Kizerwetter- Świda et al. 2016, para pradofloxacina).

Cepas	Bencilpenicilina (CMI $>0,125$ $\mu\text{g/ml}$)	Kanamicina (CMI ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$)	Pradofloxacina (CMI $\geq 2 \mu\text{g/ml}$)	Clindamicina (CMI $> 0,25$)	Tetraciclina (CMI >1 $\mu\text{g/ml}$)	Nitrofurantoína (CMI >64 $\mu\text{g/ml}$)
<i>Isoptericola</i> spp.	$\geq 0,5$			≥ 4 (2 cepas) $\geq 0,5$ (2 cepas)	≥ 16 (1 cepa); 4 (3 cepas)	256
<i>Cellulosimicrobium</i> spp. (cepa 1)	$\geq 0,5$	≥ 64	2	≥ 4	≥ 16	256
<i>Cellulosimicrobium</i> spp. (cepa 2)	$\geq 0,5$	≥ 64	2	≥ 4	≥ 16	256
<i>Cellulosimicrobium</i> spp. (cepa 3)	$\geq 0,5$	≥ 64	2	≥ 4	4	256

6.2.2. Género *Kocuria*

Se tratan de actinobacterias cocoides Gram-positivas, coagulasa negativas, pertenecientes al orden *Microccales* y familia *Micrococcaceae* (Parte et al., 2020). Son mayoritariamente aerobias estrictas no capsuladas (Li et al., 2006). Se identificaron 4 cepas de este género, dos correspondientes a la especie *K. rhizophila* (aislada el día 8), una a la especie *K. kristinae* (día 4) y una *Kocuria* spp. (día 8).

Se consideran bacterias ambientales, así como comensales de la piel humana y de la mucosa de la orofaringe, caracterizadas por su resistencia intrínseca a la nitrofurantoína (Savini et al., 2010). En los últimos años están cobrando importancia como patógenos emergentes en pacientes con cáncer, inmunocomprometidos o con trastornos metabólicos, en particular las especies *K. kristinae*, *K. marina* y *K. rhizophila* (Savini et al., 2010), por lo que se recomienda el estudio de la RAM en estas especies.

Basándonos en las CMIs descritas para *K. kristinae* por Lai et al. (2011), se podría sospechar de la presencia de RAM para los siguientes antibióticos: oxacilina, clindamicina, eritromicina, nitrofurantoína (intrínseca) y trimetoprim/sulfametoazol (Tabla 7). Es interesante resaltar de este género que resulta susceptible a las polimixinas, a pesar de que es bien conocido que las bacterias Gram-positivas suelen expresar resistencia intrínseca a esta clase de antibióticos.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para las cepas de *K. kristinae*, *K. rhizophila* y *Kocuria* spp. con sospecha de poder presentar resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *K. kristinae*, de acuerdo con Lai et al., 2011).

Cepa	Oxacilina (CMI>4 µg/ml)	Clindamicina (CMI>1 µg/ml)	Eritromicina (CMI>0,25 µg/ml)	Nitrofurantoína (CMI>64 µg/ml)	Trimetoprim/ Sulfametoaxazol (CMI>9,5 µg/ml)
<i>K. kristinae</i>	≥4	≥4	≥8	256	160
<i>K. rhizophila</i>	≥4	≥4	≥8	256	160 (1 cepa) y ≤10 1 cepa
<i>Kocuria</i> spp.	≥4	≥4	≥8	256	160

6.2.3. Género *Trueperella*

Se identificaron dos cepas de este género (día 4) mediante secuenciación del gen 16S, sin poder llegar a identificar la especie. Son bacterias Gram-positivas perteneciente al orden *Actinomycetales* y familia *Actinomycetaceae*, capaces de crecer en condiciones aerobias y anaerobias estrictas (García et al., 2014).

La especie tipo de este género es *Trueperella pyogenes*, una bacteria que causa infecciones purulentas en cerdos y otras especies animales (Jarosz, Grądzki y Kalinowski, 2014). Las bacterias de esta especie forman parte de la microbiota de la piel y las mucosas del tracto respiratorio superior, gastrointestinal o urogenital de los animales, pero también son patógenos oportunistas (Rzewuska et al., 2019). Las infecciones pueden ser locales y/o generalizadas dependiendo del estado inmunológico de los animales, su susceptibilidad individual y factores ambientales. Su presencia en las explotaciones de cerdas puede implicar importantes pérdidas económicas al relacionarse principalmente con problemas de infertilidad, muerte embrionaria, aborto y trastornos del ciclo estral y de la lactancia (mastitis) (Jarosz, Grądzki y Kalinowski, 2014). Se ha relacionado con la producción de biopelículas y con una alta incidencia de resistencia a múltiples fármacos (Alkasir et al., 2016).

Solo se pudo analizar la RAM de una de las dos cepas, por problemas con el crecimiento de la segunda (Tabla 8). En la cepa analizada se detectó resistencia a oxacilina, ceftiofur, eritromicina, clindamicina y tetraciclina.

Tabla 8. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *Trueperella* spp. con resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *T. pyogenes*, de acuerdo con el CLSI -Liu et al., 2009-).

Cepas	Oxacilina (CMI≥2 µg/ml)	Ceftiofur (CMI≥4 µg/ml)	Eritromicina (CMI≥1 µg/ml)	Clindamicina (CMI≥2 µg/ml)	Tetraciclina (CMI≥4 µg/ml)
<i>Trueperella</i> spp.	≥4	≥8	≥8	≥4	≥16

6.2.4. Género *Corynebacterium*

Género bien conocido perteneciente al orden *Mycobacterales* y familia *Corynebacteriaceae* (Parte et al., 2020). Según El Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (INNST) de 2022 son bacterias Gram-positivas, pleomórficas aerobias o anaerobias facultativas, que se encuentran aisladas, en parejas o agrupadas formando una especie de V o de letras chinas. De este género se han hallado 2 cepas pertenecientes a la especie *Corynebacterium jeikeium* (una cepa el día 8 y otra el día 4). Esta especie es una bacteria aerobia, comúnmente presente en la superficie de la piel. Se trata de una de las corinebacterias no diftéricas más importantes clínicamente en el entorno de cuidados intensivos y provoca infecciones especialmente en pacientes inmunocomprometidos con factores de riesgo y comorbilidades subyacentes. También se la ha relacionado con patologías tales como endocarditis, meningitis, neumonías, septicemia e infecciones de tejidos blandos (Moore Pardo et al., 2020).

De acuerdo con los valores umbrales de resistencia para esta especie una de las cepas sería resistente a bencilpenicilina, clindamicina y tetraciclina (Tabla 9) mientras que la otra sería sensible a todos los antibióticos analizados.

Tabla 9. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *Corynebacterium jeikeium*. con resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *Corynebacterium* spp., de acuerdo con EUCAST, 2023).

Cepas	Bencilpenicilina (CMI>0,125 µg/ml)	Clindamicina (CMI>0,5 µg/ml)	Tetraciclina (CMI>2 µg/ml)
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	≥0,5	≥4	8

6.2.5. Género *Sphingomonas*

Perteneciente al orden *Sphingomonadales* y familia *Sphingomonadaceae* (Parte et al., 2020), se aislaron 6 cepas bacterianas, 3 cepas el día 4 y las otras 3 el día 8. Las bacterias aisladas se identificaron como *Sphingomonas paucimobilis*. Esta especie engloba a un grupo de bacterias Gram-negativas aerobias con forma de bacilo no fermentadoras ubicua de medios acuosos, suelo y puede ser aislada del ambiente hospitalario. Se les considera de importancia clínica menor. Sin embargo, se describen en la literatura casos de infecciones con este organismo, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo bacteriemias, artritis séptica y osteomielitis. (Martínez y Ovalle, 2013).

De todas las cepas encontradas y considerando los valores interpretativos publicados por Alkhatib et al. (2022), se podía sospechar de resistencias frente a la gentamicina (todas las

cepas presentaron una CMI de 8 µg/ml, excepto una cuya CMI fue 2 µg/ml) y frente a trimetoprim/sulfametoxazol (CMI ≤20 µg/ml) (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *S. paucimobilis* con sospecha de poder presentar resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *S. paucimobilis*, de acuerdo con Alkhatab et al., 2022).

Cepas	Gentamicina (CMI> 1 µg/ml)	Trimetoprim/ Sulfametoxazol (CMI>9,5 µg/ml)
<i>S. paucimobilis</i> (4 cepas)	8 (3 cepas); 2 (1 cepa)	≤20

6.2.6. Género *Burkholderia*

Se trata de un género de bacterias Gram-negativas aerobias pertenecientes al orden *Burkholderiales* y familia *Burkholderiaceae* (Parte et al., 2020). Se aislaron e identificaron 2 cepas de *Burkholderia*, *B. cepacea* y *B. gladioli*.

Burkholderia cepacea se trata de una especie presente naturalmente en el agua, suelo y vegetación. *B. cepacia* ha surgido como un patógeno humano oportunista especialmente asociado a infecciones pulmonares fatales, destacando en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (Govan, Hughes y Vandamme, 1996). Esta bacteria también se caracteriza por presentar resistencia intrínseca a muchos antimicrobianos, como antimicrobianos catiónicos, polimixinas, aminoglucósidos, tetraciclina, cloranfenicol y ciprofloxacina. Además, se han detectado cepas resistentes a los β-lactámicos disponibles (EUCAST, 2013).

En nuestro estudio *B. cepacea* fue sensible a todos los antibióticos testados, aunque hay que señalar que algunos antibióticos no pudieron ser evaluados (ceftiofur, cefquinoma, imipenem, flumequina, enrofloxacino, marbofloxacino, florfenicol y trimetoprim/sulfametoxazol) debido a la falta de un crecimiento suficiente de la bacteria. Respecto a *B. gladioli*, se identificó por primera vez como un patógeno vegetal. La mayoría de las infecciones causadas por esta cepa afectan a adultos inmunocomprometidos y recién nacidos. En general, *B. gladioli* en humanos está asociada con un mal pronóstico (Zanotti et al., 2019). Esta cepa presentó resistencia a trimetoprim/sulfametoxazol (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *B. gladioli* con resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *B. pseudomallei*, de acuerdo con EUCAST, 2023).

Cepa	Trimetoprim/Sulfametoxazol (CMI>8 µg/ml)
<i>Burkholderia gladioli</i>	≤20

6.2.7. Género *Staphylococcus*

Son cocos Gram-positivos, anaerobios facultativos, pertenecientes al orden *Bacillales* y familia *Staphylococcaceae* (Parte et al., 2020). Los estafilococos se encuentran entre los componentes más frecuentes de la microbiota humana y además actúan como agentes etiológicos de enfermedades de diversas localizaciones, manifestaciones y/o cursos de infección. En general suelen producir infecciones de piel y tejidos blandos con manifestaciones como dermatitis, abscesos y furúnculos entre otros, y de tejidos profundos incluida la infección por cuerpos extraños. Los estafilococos pueden exhibir una amplia resistencia a los antibióticos, siendo una de sus características más peligrosa, junto con la presencia de diversos factores de virulencia (toxinas, enzimas, etc.) y su capacidad para formar de biopelículas que le permiten sobrevivir dentro de sus huéspedes. La mayoría de los estafilococos son productores de penicilinasa y algunos han desarrollado resistencia a la meticilina (Lisowska-Łysiak et al., 2021), por lo que son intrínsecamente resistentes a la bencilpenicilina, fenoximetilpenicilina, ampicilina, amoxicilina, piperacilina y ticarcilina.

La especie tipo es *S. aureus*, que presenta cepas comensales y patógenas. Se trata además de una bacteria utilizada como indicadora de RAM por su facilidad para desarrollar resistencias a numerosos antibióticos (Bush y Vazquez-Pertejo, 2021).

La cepa bacteriana aislada en una dosis seminal del día 4, responde a la especie *Staphylococcus lentus*, la cual pertenece al grupo *Staphylococcus sciuri* que puede colonizar a los humanos. Ocasionalmente puede producir infecciones graves como endocarditis, shock séptico o endoftalmitis en individuos inmunocomprometidos, normalmente asociado con el contacto con animales domésticos, pues es una especie frecuente en la piel de estos (Crespo-Ortega et al., 2022). Una característica a remarcar de *S. lentus* es que carece de un gen (Mec A) que poseen los otros miembros del grupo *S. sciuri* haciendo que esta especie sea más susceptible a los antibióticos (Rivera et al., 2014).

La cepa aislada de *S. lentus*, además de la resistencia intrínseca mencionada anteriormente, presentaría resistencia frente a la clindamicina, eritromicina, doxiciclina, tetraciclina, kanamicina, nitrofurantoína y trimetoprim-sulfametoaxazol (EUCAST, 2023) (Tabla 12).

Tabla 12. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *S. lentus* con resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *Staphylococcus spp*, de acuerdo con EUCAST, 2023).

Cepas	Kanamicina (CMI>8 µg/ml)	Clindamicina (CMI>0,25 µg/ml)	Eritromicina (CMI>1 µg/ml)	Doxiciclina (CMI>1 µg/ml)	Tetraciclina (CMI>1 µg/ml)	Nitrofurantoína (CMI>64 µg/ml)	Trimetoprim/ Sulfametoaxazol (CMI>4 µg/ml)
<i>S. lentus</i>	≥64	≥4	≥8	2	4	256	80

6.2.8. Género *Rhodococcus*

Se trata de un género de bacterias pleomórficas, Gram-positivas y aerobias perteneciente al orden *Mycobacteriales* y familia *Nocardiaceae* (Parte et al., 2020). Son un grupo de actinomicetos ampliamente distribuidos en diferentes ambientes, desde suelos hasta agua de mar que puede adaptarse a ambientes hostiles gracias a su equipamiento enzimático y a una estructura de pared celular única (Martíková al., 2009).

La mayoría de las especies no tienen significación clínica. La especie de mayor relevancia clínica es *Rhodococcus equi*, considerado como un patógeno zoonótico emergente (produce cuadros de neumonía, sepsis o infecciones urogenitales en personas -Sánchez et al., 2004-), que afecta con particular virulencia a potros, y es común en las heces de animales de granja. Las cepas de tipo porcino o bovino se han aislado de casos humanos con más frecuencia que las cepas ambientales equinas o avirulentas (Witkowski et al., 2016). El resto de las especies apenas se asocian con infecciones en los seres humanos y cuando ocurren suelen tener un carácter oportunista (Sánchez et al., 2004).

En este trabajo se detectó 1 cepa el día 8 correspondiente a la especie de *Rohodococcus hoagii*, anteriormente considerado *R. equi*. Se han descrito casos de bacteriemia asociados a individuos inmunocomprometidos y en los últimos años su frecuencia de aislamientos en humanos ha aumentado asociado a pacientes infectados con VIH, con producción de neumonía, abscesos pulmonares, en el SNC, pelvis o en tejido subcutáneo (Camponovo y García, 2006).

Según los valores de CMIs para la cepa aislada y comparándolo con los valores interpretativos descritos por Giguère, Berghaus y Willingham-Lane (2017) no se ha encontrado ninguna sospecha de resistencia, excepto a trimetoprim/sulfametoazol.

6.2.9. Género *Streptococcus*

De este género, incluido dentro del orden *Lactobacillales* y familia *Carnobacteriaceae* (Parte et al., 2020), se detectó 1 cepa bacteriana el día 4 post recogida, correspondiente a la especie *Streptococcus parasanguinis*.

Los estreptococos son bacterias cocoides Gram-positivas, mayoritariamente anaerobios facultativos. Muchas especies son parte de la flora comensal de los animales y personas, siendo su localización dependiente del tipo de estreptococo en cuestión (Por ejemplo los del tipo A forman parte de la garganta y piel y los del grupo B del aparato genital y tubo gastrointestinal) pero existen especies particularmente patógenas que se asocian con procesos respiratorios, infecciones de oído y piel, así como casos más graves de escarlatina, cardiopatía reumática, glomerulonefritis o neumonía neumocócica (Larry, 2023). Su clasificación es compleja y se hace

en función de la morfología de la colonia, la producción de hemólisis, las reacciones bioquímicas y la especificidad serológica. Además, algunas especies son esenciales en procesos industriales y lácticos (Patterson, 1996).

Streptococcus parasanguinis es una bacteria comensal y aerobia, colonizadora primaria de la cavidad bucal humana y está involucrada en el desarrollo de la placa dental y la endocarditis infecciosa. Tras la adhesión a la superficie oral, actúa como base sobre la que se adhieren otras especies bacterianas formando *biofilms* (Garnett et al., 2012).

La cepa aislada presentó resistencia a Bencilpenicilina, Nitrofurantoína, , Eritromicina (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *S. parasanguinis* con resistencias a los antibióticos indicados* (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *Streptococcus A, B, C, G* de acuerdo con EUCAST, 2023).

Cepas	Bencilpenicilina (CMI>0,25 µg/ml)	Eritromicina (CMI>0,25 µg/ml)	Tetraciclina (CMI>1 µg/ml)	Nitrofurantoína (CMI>64 µg/ml)
<i>S. parasanguinis</i>	8	≥8	8	>512

6.2.10. Género *Salmonella*

Este género de bacterias anaerobias facultativas Gram-negativas pertenecientes al orden *Enterobacterales* y familia *Enterobacteriaceae* está formado por dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*, siendo la primera la única con interés clínico. Dentro de *S. enterica* existen más de 2500 serotipos (caracterizados por su antígeno de la cadena O y los flagelares) que difieren en su gama de hospedadores y en su capacidad para causar enfermedades a pesar de su estrecho parentesco genético. En muchos animales están asociados con infecciones mayoritariamente asintomáticas, mientras que en personas (que se infectan principalmente a través de alimentos contaminados) producen infecciones intestinales y en casos más graves, infecciones sistémicas (Chan et al., 2003).

La salmonelosis humana es la segunda zoonosis de transmisión alimentaria más importante en la UE. El cerdo presenta alta prevalencia de infección y suele cursar de forma asintomática. Junto con sus productos derivados, es una de las principales fuentes de infección para las personas (después de los huevos y la carne de ave) (EFSA, 2022).

Solo se detectó una cepa de *Salmonella*, aunque no se llegó a identificar su especie. Se trataba de una cepa resistente a cefalotina, gentamicina y flumequina (Tabla 14) a todos los antibióticos.

Tabla 14. Concentración mínima inhibitoria (CMI, en µg/ml) para la cepa de *Salmonella* con resistencias a los antibióticos indicados (entre paréntesis valor umbral de CMI para definir resistencia antimicrobiana en *Salmonella* spp., de acuerdo con resultados VITEK-2)

Cepas	Cefalotina (CMI>2 µg/ml)	Gentamicina (CMI>1 µg/ml)	Flumequina (CMI>32 µg/ml)
<i>Salmonella group</i>	>2	>1	>32

6.2.11. Género *Bacteroides*

Género perteneciente al orden *Bacteroidales* y familia *Bacteroidaceae* (Parte et al., 2020). Se trata de bacterias Gram-negativas y anaerobias. Se tratan de bacterias comensales del intestino humano siendo colonizadores potenciales del colon y representando una fracción importante del bacterioma intestinal. Sin embargo, este género de bacterias desempeña una doble función como agente beneficioso, al formar parte de la microbiota intestinal y patógeno oportunista cuando se presenta en otras ubicaciones del cuerpo (endocarditis y pericarditis, infección oral, absceso cerebral y meningitis y enfermedad de Crohn entre otras). Se suelen encontrar en la mayoría de las infecciones por anaerobios, con una mortalidad asociada de más del 19%, por lo que se consideran patógenos oportunistas de interés (Wexler, 2007)

Las especies pertenecientes a este género han mostrado las tasas de resistencia más altas de todos los patógenos anaerobios, presentando una resistencia creciente a muchos antibióticos incluidos cefoxitina, clindamicina, metronidazol, carbapenémicos y fluoroquinolonas, ya que poseen la mayoría de los mecanismos de resistencia a los antibióticos (Wexler, 2007). No se pudo identificar la especie de la cepa aislada en este trabajo, ni tampoco se pudo realizar el análisis de RAM.

7. Discusión

La extracción del semen porcino, donde es difícil aplicar estrictas medidas higiénicas, y la tecnología de producción de dosis seminales porcinas (utilización de ingredientes nutritivos en los diluyentes del semen para favorecer la viabilidad de los espermatozoides, almacenamiento a temperaturas de 16°C), favorece la contaminación y crecimiento bacteriano. El empleo de dosis subterapéuticas de antibióticos para controlarlo puede seleccionar e incluso incrementar el riesgo de aparición de RAM de estas bacterias. Todo esto explica la necesidad de llevar a cabo más investigaciones relacionadas con esta práctica enfocándose en el problema de las RAM.

En este estudio, de las 12 dosis seminales analizadas, en el 83,33% (10) se aislaron bacterias contaminantes. La proporción de dosis seminales contaminadas fue aparentemente mucho mayor que lo descrito en otros trabajos (rango del 14,73-32%) (Kuster y Althouse, 2016; (Althouse, Pierdon y Lu, 2008; Schulze et al., 2015). Las diferencias podrían tener que ver con el

hecho de que en nuestro estudio cada dosis seminal se analizó dos veces, a los 4 y 8 días post extracción, lo que posiblemente incrementó las posibilidades de detección de bacterias. En cualquier caso, el número de dosis seminales analizadas es pequeño para poder sacar conclusiones.

Otra diferencia con respecto a los datos publicados previamente tiene que ver con los grupos bacterianos detectados. En nuestro estudio han predominado las bacterias Gram-positivas (70,27%), cuando generalmente eran las Gram-negativas, y sobre todo las enterobacterias, las más prevalentes (Kuster y Althouse, 2016). Quizá esto tenga que ver con los antibióticos empleados, inicialmente más dirigidos a este último grupo, lo que ha podido favorecer la supervivencia de Gram-positivas. Como se ha indicado anteriormente, los aminoglucósidos son unos de los antimicrobianos conservantes más utilizados en los diluyentes seminales y éstos tienen actividad especialmente frente a las bacterias Gram-negativas (Schulze et al., 2015). Sin embargo, el desconocimiento de los antibióticos empleados en las dosis seminales analizadas en este estudio nos impide confirmar esta hipótesis.

También resulta interesante destacar el hecho de que prácticamente no hubo diferencias en el número de dosis contaminadas el día 4 y el 8 (9 dosis contaminadas el día 4 frente a 7 el día 8), ni en el número de cepas diferentes aisladas (18 cepas de 11 géneros/especies diferentes el día 4 y 19 cepas de 15 géneros/especies diferentes el día 8). Algo más de la mitad (54,55%) de los géneros/especies identificados el día 4 se aislaron también el día 8. Estos resultados sugieren la posible existencia en estas cepas aisladas el día 8 de resistencia (intrínseca o adquirida) a los antibióticos utilizados en los diluyentes seminales.

De las bacterias identificadas, una mayoría y las más abundantes parecían ser de origen ambiental y/o comensal (e. j. *Cellulosimicrobium*, *Isoptericola*, *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Kocuria*, *Trueperella*, *Corynebacterium*, etc.), habiéndose asociado alguna de ellas con infecciones oportunistas en personas y/o animales. Ello podría hacernos pensar en la necesidad de mejorar las medidas higiénicas-sanitarias en los CIA, de manera que tanto la obtención del semen de los verracos, como el proceso posterior para la elaboración de las dosis seminales se realicen en condiciones óptimas de higiene. Esto es de especial relevancia si, como sugieren nuestros resultados, algunas de estas cepas de origen ambiental presentan resistencia antibióticos de uso común en animales.

El análisis de RAM en este estudio se limitó a aquellas bacterias aerobias o anaerobias facultativas más abundantes o de más relevancia clínica. Además, otra limitación de este análisis fue la falta de información relativa para los valores umbrales de CMI para muchas de las bacterias ambientales. Para este tipo de bacterias, si presentaban valores de CMI para un determinado antibiótico por encima de los valores de CMI que sugieren resistencia para otra

bacteria de un taxón cercano o una bacteria tipo dentro de su grupo correspondiente (Gram-positivas o Gram-negativas), se clasificaba como sospechosa de presentar RAM.

Así, se estudió la susceptibilidad antibiótica de 24 cepas pertenecientes a 11 géneros bacterianos. Un total de 22 (91,67%) cepas presentaron resistencia o sospecha de resistencia a al menos un antibiótico. Las dos únicas cepas susceptibles a todos los antibióticos testados fueron una cepa de *Corynebacterium jeikeium* y la de *Burkholderia cepacea*. De las cepas resistentes 16 (72,72%), distribuidas en 8 géneros bacterianos diferentes, se podrían considerar multirresistentes al presentar resistencia o sospecha de resistencia a al menos tres clases diferentes de antibióticos (Magiorakos et al., 2012). Estos resultados en conjunto mostraban que la prevalencia de RAM entre las bacterias aisladas de las dosis seminales era muy alta y estaba muy distribuida entre diferentes grupos bacterianos. De hecho, estos resultados están muy por encima de lo que la EFSA considera prevalencias de RAM altas (>20% a 50%) o muy altas (> 50% a 70%) para antibióticos de uso común en bacterias zoonóticas indicadoras aisladas de animales destinados a la producción de alimentos (EFSA, 2023). En cualquier caso, la escasa representatividad de nuestros resultados dado el limitado número de muestras analizadas impide sacar mayores conclusiones.

El antibiótico para el que más bacterias han presentado resistencia o sospecha de resistencia fue clindamicina (un derivado de la lincomicina) con 14 cepas (58,33%) sospechosas o resistentes, seguido de la nitrofurantoína (clase nitrofuranos; 13 cepas, 54,16%) y la tetraciclina (11 cepas; 45,83%). Los dos últimos antibióticos están indicados frente a bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, mientras que la clindamicina se usa preferentemente frente a bacterias aerobias Gram-positivas. Es interesante destacar que mientras que la resistencia a las tetraciclinas es probablemente una de las más extendidas, especialmente en bacterias aisladas de animales (EFSA, 2022), la resistencia a la clindamicina parece estar incrementándose en los últimos años, al menos en estreptococos aislados de infecciones humanas (Bryant et al., 2020). Respecto a la nitrofurantoína, los niveles de resistencia son generalmente bajos en la UE, aunque son escasos los estudios al respecto (Giske, 2015). En general, parece importante plantear la vigilancia sistemática de estos agentes antimicrobianos en este contexto.

Otro hecho a destacar es que comparando las RAM de las bacterias Gram-positivas con las RAM de las bacterias Gram-negativas, se observa que las primeras presentan resistencia a un mayor número de antibióticos (kanamicina, bencilpenicilina, eritromicina, tetraciclina, nitrofurantoína, trimetoprim/sulfametoazol, clindamicina, doxiciclina, oxaciclina, ceftiofur y pradofloxacina), mientras que las segundas solo presentaron resistencias frente a gentamicina

y trimetoprim/sulfametoxazol. Esto podría explicar en parte por qué se encontró un mayor número de bacterias Gram-positivas en las dosis seminales analizadas.

En cualquier caso, este trabajo se ha basado en el estudio de las RAM fenotípicas, lo cual es complicado de interpretar en el caso de muchas de las bacterias de origen ambiental aisladas. Por ello se hace necesario realizar estudios genéticos que demuestren la presencia de genes relacionados con las RAM detectadas.

8. Conclusiones/Conclusions

- Los niveles de contaminación de las dosis seminales de porcino analizadas fueron muy altos (83,33%), siendo algo mayores el día 4 que el 8 post recogida (75% y 58,33%, respectivamente). Una mayoría de las bacterias aisladas tenían un origen ambiental o comensal, sugiriendo que es recomendable tratar de mejorar las medidas higiénicas-sanitarias durante la extracción del semen y el procesado de las dosis seminales en los CIA.
- La prevalencia de RAM o sospecha de RAM entre las bacterias analizadas fue muy alta (91,67%), destacando la resistencia frente a clindamicina, nitrofurantoina y tetraciclinas. La resistencia observada podría explicar la presencia de una mayoría de bacterias contaminantes Gram-positivas. Sería conveniente plantear la vigilancia sistemática de estos agentes antimicrobianos en el contexto de la IA porcina.
- *The levels of contamination of the swine semen extenders analyzed were very high (83.33%), being a little bit higher on day 4 than on day 8 post-collection (75% and 58.33%, respectively). Most of the isolated bacteria had an environmental or commensal origin, thus it would be advisable to try to improve hygienic-sanitary measures during semen extraction and the processing of semen extenders in pig AI centers.*
- *The prevalence of AMR or suspected AMR among the bacteria analyzed was very high (91.67%), highlighting the resistance against clindamycin, nitrofurantoin and tetracyclines. The observed resistance could explain the presence of a bigger proportion of Gram-positive contaminating bacteria. Systematic surveillance of these antimicrobial agents should be considered in the context of swine AI.*

9. Valoración personal

Considero que este proyecto me ha aportado muchos conocimientos sobre la investigación al igual que el aprendizaje de nuevos métodos laboratoriales. Me ha permitido aprender a comparar varias fuentes de información al mismo tiempo y a no fiarme de todas las fuentes de información que encuentre. Además, debido a que en mi año no pudimos tener ni clases ni prácticas presenciales de microbiología, este estudio me ha permitido desarrollar este área que debido al COVID no se pudo desarrollar tanto como debería. Aparte de esto, ha aumentado mi preocupación e interés sobre las resistencias antimicrobianas y espero alargar este proyecto como futura tesis doctoral ya que considero que las RAM en la actualidad son muy importantes y es escasa la investigación en el campo de la IA porcina. Por último, me gustaría agradecer a Raúl Mainar y a Clara Marín por su paciencia y ayuda para la realización de este trabajo y su interés por enseñarme las distintas metodologías al igual que los conocimientos teóricos correspondientes.

10. Bibliografía

- Acosta, M., Ruedas, M., Arias, T., Raez, T., Espinosa, I., Martínez, V. y Perdigón, R. (2011). “Evaluación de la contaminación bacteriana de semen porcino puro y diluido”. *Sitio Argentino de Producción Animal*, pp. 1-6. Disponible en: https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_porcina/00-reproduccion_IA_porcinas/32-Evaluacion_contaminacion_bacteriana.pdf [Consultado 23-05-2023].
- Aidara-Kane A. (2012). “Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective”. *Revue Scientifique et Technique de l’OIE*, 31(1), pp. 10. DOI: 10.20506/rst.31.1.2115.
- Alkasir, R., Wang, J., Gao, J., Ali, T., Zhang, L., Szenci, O., Bajcsy, Á. C. y Han, B. (2016). “Properties and antimicrobial susceptibility of *Trueperella pyogenes* isolated from bovine mastitis in China”. *Acta Veterinaria Hungarica*, 64(1), pp. 1–12. DOI: 10.1556/004.2016.001
- Alkhatib, B., Veytsman, E., Klumpp, L. y Hayes, E. (2022). “*Sphingomonas paucimobilis* Septic Shock in an Immunocompetent Patient”. *Cureus*, 14(7). DOI: 10.7759/cureus.26720
- Althouse, G.C. (2008). “Sanitary Procedures for the Production Extended Semen”. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, pp. 374-378. DOI:10.1111/j.1439-0531.2008.01187.x
- Althouse, G. C. y Lu, K. G. (2005). “Bacteriospermia in extended porcine semen”. *Theriogenology*, 63(2), pp. 573–584. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.031

- Althouse, G. C., Pierdon, M. S., y Lu, K. G. (2008). "Thermotemporal dynamics of contaminant bacteria and antimicrobials in extended porcine semen". *Theriogenology*, 70(8), pp. 1317–1323. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.07.010
- Antonelli, P., Belluco, S., Mancin, M., Losasso, C. y Ricci, A. (2019). "Genes conferring resistance to critically important antimicrobials in *Salmonella enterica* isolated from animals and food: A systematic review of the literature, 2013–2017". *Research in Veterinary Science*, 126, pp. 59–67. DOI: 10.1016/j.rvsc.2019.08.022
- Bortolozzo, F., Menegat, M., Mellagi, A., Bernardi, M. y Wentz, I. (2015). "New Artificial Insemination Technologies for Swine". *Reproduction in Domestic Animals*, 50, pp. 80–84. DOI: 10.1111/rda.12544
- Bryant, A. E., Bayer, C. R., Aldape, M. J., McIndoo, E., y Stevens, D. L. (2020). "Emerging erythromycin and clindamycin resistance in group A streptococci: Efficacy of linezolid and tedizolid in experimental necrotizing infection". *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22, pp. 601–607. DOI: 10.1016/j.jgar.2020.04.032
- Bush, L. M. y Vazquez-Pertejo, M. T. (2021). "Infecciones por estafilococos". *Merck Sharp and Dohme*. Disponible en: [Infecciones estreptocócicas - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales \(msdmanuals.com\)](#) [Consultado el 28-05-2023].
- Camponovo C, R. y García C, P. (2006). "Rhodococcus equi". *Revista chilena de infectología*, 23(2). DOI: 10.4067/s0716-10182006000200009
- Centers for Disease Control and Prevention (2022). CDC. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> [Consultado el 5-05-2023].
- Chan, K., Baker, S., Kim, C. C., Detweiler, C. S., Dougan, G., y Falkow, S. (2003). "Genomic Comparison of *Salmonella enterica* Serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* Serovar *Typhimurium* DNA Microarray. *Journal of Bacteriology*, 185(2), pp. 553–563. DOI: 10.1128/jb.185.2.553-563.2003
- Choffnes, E. R., Relman, D. A. y Mack, A. (2010). "ANTIBIOTIC RESISTANCE: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies Workshop Summary". *Washington (DC): The National Academies Press*, pp. 116-140
- Coates, A. R., Halls, G. y Hu, Y. (2011). "Novel classes of antibiotics or more of the same?". *British Journal of Pharmacology*, 163(1), pp. 184–194. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01250.x
- Coburn, B., Grassl, G. A. y Finlay, B. B. (2006). "Salmonella, the host and disease: a brief review". *Immunology & Cell Biology*, 85(2), pp. 112–118. DOI: 10.1038/sj.icb.7100007
- Coletta-Griborio, E., Rodriguez Portela, G., Núñez García, J. M. y Bratos-Pérez, M. Á. (2017). "Bacteremia due to *Cellulosimicrobium cellulans* associated with central catheter for

- hemodialysis". *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 35(1), pp. 62–63. DOI: 10.1016/j.eimce.2016.04.001
- Collignon, P. (2005). "Fluoroquinolone Use in Food Animals". *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), pp. 1789-1792. DOI: 10.3201/eid1111.040630
- Costinar, L., Herman, V., Pitoiu, E., Iancu, I., Degi, J., Hulea, A. y Pascu, C. (2021). "Boar Semen Contamination: Identification of Gram-Negative Bacteria and Antimicrobial Resistance Profile". *Animals*, 12(1), pp. 43. DOI: 10.3390/ani12010043
- Crespo-Ortega, L., Bonilla-Hernández, R., Pedraza, A. y Lisker, A. (2022). "Endocarditis infecciosa por *Staphylococcus lentus*". *Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico ABC*, 67(4), pp. 304–308. DOI: 10.35366/108784
- Davies, J. y Davies, D. (2010). "Origins and Evolution of Antibiotic Resistance". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 3, pp. 417-433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10
- D'Costa, V. M., et al. (2011). "Antibiotic resistance is ancient". *Nature*, 477, pp. 457-461. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nature10388> [Consultado 5-05-2023]
- Decuadros-Hansen, G. (2000). "Control sanitario de los verracos en un centro de producción de semen". Disponible en: [anais0009_hansen.pdf \(embrapa.br\)](http://anais0009_hansen.pdf) [Consultado 24-05-2023].
- Drug-resistant infections: the economics need fixing (2020). Wellcome. Disponible en: <https://wellcome.org/news/drug-resistant-infections-science-economics> [Consultado 27-05-2023].
- Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C., y Göker, M. (2020). "List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(11), pp. 5607–5612. DOI: 10.1099/ijsem.0.004332
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Authority y European Medicines Agency (2017). "ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals". *EFSA Journal*. 15(7). DOI: 10.2903/j.efsa.2017.4872
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2023). "Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0". *EUCAST*. Disponible en: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints [Consultado el 28-05-2023].
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2013). "Antimicrobial susceptibility testing of *Burkholderia cepacia* complex (BCC)". *EUCAST*. Disponible en: [BCC_susceptibility_testing_130719.pdf \(eucast.org\)](http://BCC_susceptibility_testing_130719.pdf) [Consultado el 28-05-2023].

- European Food Safety Authority (2023). "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2020/2021". *EFSA Journal*, 21(3). DOI 10.2903/j.efsa.2023.7867
- European Food Safety Authority (2022). "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020". (2022). *EFSA Journal*, 20(3). DOI: 10.2903/j.efsa.2022.7209
- European Food Safety Authoriy y European Centre for Disease Prevention and Control (2021). "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019". *EFSA Journal*, 19(4), pp.179. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6490
- Gadea, J. (2003). "Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine". *Spanish Journal of Agricultural Research*, 1(2), pp. 17-27. Disponible en: <https://www.um.es/grupo-fisiovet/Gadea%202003%20SJAR.pdf> [Consultado 24-05-2023]
- García, N. V., Leiva, G. A. A., Jola, N. J. R. y Fandiño, L. C. (2014). "Múltiples abscesos en un cerdo causados por *Trueperella pyogenes* (*Arcanobacterium pyogenes*): Reporte de caso". *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 6(1), pp. 91-98. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcp/v6n1/v6n1a6.pdf> [Consultado el 28 de mayo de 2023].
- Garnett, J. A., Simpson, P. J., Taylor, J., Benjamin, S. V., Tagliaferri, C., Cota, E., Chen, Y.-Y. M., Wu, H. y Matthews, S. (2012). "Structural insight into the role of *Streptococcus parasanguinis* Fap1 within oral biofilm formation". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 421–426. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.131
- Giguère, S., Berghaus, L.J. Y Willingham-Lane, J. M. (2017). "Antimicrobial Resistance in *Rhodococcus equi*". *Microbiology Spectrum*, 5(5). DOI: [10.1128/microbiolspec.ARBA-0004-2016](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0004-2016)
- Giske, C. G. (2015). "Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin". *Clinical Microbiology and Infection*, 21(10), pp. 899–905. DOI: 10.1016/j.cmi.2015.05.022
- Govan, J. R. W., Hughes, J. E. y Vandamme, P. (1996). "*Burkholderia cepacia*: medical, taxonomic and ecological issues". *Journal of Medical Microbiology*, 45(6), pp. 395–407. DOI: 10.1099/00222615-45-6-395
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo (2022). Portal INSST. Disponible en: https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/bacterias/corynebacterium-spp.#bibliografia_1 [Consultado el 26-05-2023]

- Jarosz, Ł. S., Grądzki, Z. y Kalinowski, M. (2014). "Trueperella pyogenes infections in swine: clinical course and pathology". *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(2), pp. 395–404. DOI: 10.2478/pjvs-2014-0055
- Jory, D. E. (2019). "¿Qué pistas ofrece el moco de los peces en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos?". *Global Seafood Alliance*. Disponible en: [¿Qué pistas ofrece el moco de los peces en la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos? - Responsible Seafood Advocate \(globalseafood.org\)](#) [Consultado 5-05-2023].
- Kämpfer, P., Glaeser, S. P., Kloepper, J. W., Hu, C., McInroy, J. A., Martin, K. y Busse, H. (2016). "Isoptericola cucumis sp. nov., isolated from the root tissue of cucumber (*Cucumis sativus*)". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66, pp. 2784-2788. Disponible en: [14728175913001 2784..2788 \(microbiologyresearch.org\)](#) [Consultado 27-05-2023]
- Kaur, G., Soni, P., Tewari, R. y Sharma, R. (2014). "Isolation and Characterization of a Nitrile-Hydrolysing Bacterium Isoptericola variabilis RGT01". *Indian Journal of Microbiology*, 54(2), pp. 232–238. DOI: 10.1007/s12088-014-0453-0
- Kizerwetter-Świda, M., Chrobak-Chmiel, D., Rzewuska, M. y Binek, M., (2016). "Resistance of canine methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains to pradofloxacin". *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5), pp. 514–518. DOI: 10.1177/1040638716660131
- Knox, R. V. (2016). "Artificial insemination in pigs today". *Theriogenology*, 85(1), pp. 83–93. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.07.009
- Kuster, C. E. y Althouse, G. C. (2016). "The impact of bacteriospermia on boar sperm storage and reproductive performance". *Theriogenology*, 85(1), pp. 21–26. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2015.09.049
- Lai, C. C., et al. (2011). "Catheter-related bacteraemia and infective endocarditis caused by *Kocuria* species". *Clinical Microbiology and Infection*, 17(2), pp. 190–192. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2010.03211.x
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E. y Larson, E. L. (2012). "A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential". *Public Health Reports*, 127(1), pp. 4–22. DOI: 10.1177/003335491212700103.
- Lane, D.J. (1991). "16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics". En Stackebrandt E. y Goodfellow, M. (Coord.). *John Wiley and Sons*. Nueva York: NY, pp. 115-175.
- Larry, M. B. (2023). "Infecciones por estreptococco". *Manual MSD*. Disponible en: [https://www.msmanuals.com/es-es/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-Gram-positivas/infecciones-por-estreptococo](#) [Consultado el 26-05-2023].

- Lisowska-Łysiak, K., Lauterbach, R., Miedzobrodzki, J. y Kosecka-Strojek, M. (2021). "Epidemiology and Pathogenesis of *Staphylococcus* Bloodstream Infections in Humans: A Review". *Polish Journal of Microbiology*, 70(1), pp. 13–23. DOI: 10.33073/pjm-2021-005
- Liu, M. C., Wu, C. M., Liu, Y. C., Zhao, J. C., Yang, Y. L. y Shen, J. Z. (2009). "Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis". *Journal of Dairy Science*, 92(8), pp. 3659–3666. DOI: 10.3168/jds.2008-1756
- Li, W.-J., Zhang, Y.-Q., Schumann, P., Chen, H.-H., Hozzein, W. N., Tian, X.-P., Xu, L.-H., y Jiang, C.-L. (2006). "Kocuria aegyptia sp. nov., a novel actinobacterium isolated from a saline, alkaline desert soil in Egypt". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(4), pp. 733–737. DOI: 10.1099/ijsm.0.63876-0
- Magiorakos, A. P., et al. (2012). "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance". *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), pp. 268–281. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Martínez, J. L. (2017). "Effect of antibiotics on bacterial populations: a multi-hierarchical selection process". *F1000Research*, 6, pp. 51. DOI: 10.12688/f1000research.9685.1
- Martínez, J. L. (2009). "The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276 (1667), pp. 2521–2530 DOI: 10.1098/rspb.2009.0320
- Martínez, M. A. y Ovalle, A. (2013). "*Sphingomonas paucimobilis*". *Revista chilena de infectología*, 30(1), pp. 49–50. DOI: 10.4067/s0716-10182013000100007
- Martíková, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J. y Kren, V. (2009). "Biodegradation potential of the genus Rhodococcus". *Environment International*. 35(1), pp. 162–177. DOI: 10.1016/j.envint.2008.07.018
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2021). *Encuestas Ganaderas, análisis del número de animales por tipos*. Madrid: MAPA
- Moore Pardo, S. M., Patel, R. H., Ramsakal, A. y Greene, J. (2020). "Disseminated Corynebacterium jeikeium Infection in Cancer Patients". *Cureus*, 12(6) DOI: 10.7759/cureus.8764
- Morrell, J. y Wallgren, M. (2014). "Alternatives to Antibiotics in Semen Extenders: A Review". *Pathogens*, 3(4), pp. 934–946. DOI: 10.3390/pathogens3040934
- Mundaca-Shah C., Ogawa V. A. y Nicholson A. (2017). "Combating Antimicrobial Resistance". Washington, D.C.: National Academies Press, pp. 172. Disponible en: https://redemc.net/campus/wp-content/uploads/2021/07/Bookshelf_NBK469819.pdf [Consultado 5-05-2023].

- Munita, J. M., y Arias, C. A. (2016). "Mechanisms of Antibiotic Resistance". *Microbiology Spectrum*, 4(2). DOI: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015
- O'Neill, J. (2016). "Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations". *Government of the United Kingdom*, pp.13 Disponible en: https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf [Consultado 5-05-2023].
- Patterson, M. J. (1996). "Streptococcus". *Medical Microbiology*, 4(13). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7611/> [Consultado el 26-05-2023].
- Pengov, A. y Ceru, S. (2003). "Antimicrobial Drug Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Bovine and Ovine Mammary Glands". *Journal of Dairy Science*, 86(10), pp. 3157–3163. DOI: 10.3168/jds.s0022-0302(03)73917-4
- Peng, M., Salaheen, S. y Biswas, D. (2014). "Animal Health: Global Antibiotic Issues". *Elsevier eBooks*, pp. 346-357. DOI: 10.1016/B978-0-444-52512-3.00187-X
- Pineda, Y. y Santander, J. (2007). "Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela". "Zootecnia Tropical", 25(3), pp. 173-177. Disponible en: [Evaluación de la flora bacteriana del semen de verracos en granjas porcinas de Venezuela \(scielo.org\)](https://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0044-024X2007000300003&lng=es) [Consultado 23-05-2023].
- Raheja, N., Choudhary, S., Grewal, S., Sharma, N. y Kumar, N. (2018). "A review on semen extenders and additives used in cattle and buffalo bull semen preservation". *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(3), pp. 239-245. Disponible en: <https://www.entomoljournal.com/archives/2018/vol6issue3/PartD/6-2-211-347.pdf> [Consultado 24-05-2023].
- Rivera, M., Dominguez, M. D., Mendiola, N. R., Roso, G. R. y Quereda, C. (2014). "Staphylococcus lentus Peritonitis: A Case Report". *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, 34(4), 469–470. DOI: 10.3747/pdi.2012.00303
- Rodicio M. R. y Mendoza, M. C. (2004). "Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica". *Elsevier*, 22(4), pp. 238-245. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-identificacion-bacteriana-mediante-secuenciacion-del-13059055> [Consultado el 26-05-2023].
- Rzewuska, M., Kwiecień, E., Chrobak-Chmiel, D., Kizerwetter-Świda, M., Stefańska, I. y Gieryńska, M. (2019). "Pathogenicity and Virulence of *Trueperella pyogenes*: A Review". *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), pp. 2737. DOI: 10.3390/ijms20112737

- Sánchez, N., Sandoval, A.H., Diaz-Corales, F. y Serrano, J.A. (2004). "El género Rhodococcus. Una revisión didáctica". *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), pp.24-33. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100005 [Consultado el 26-05-2023].
- Savini, V., et al. (2010). "Drug sensitivity and clinical impact of members of the genus Kocuria". *Journal of medical microbiology*, 59(12), pp. 1395-1402. DOI: 10.1099/jmm.0.021709-0
- Schulze, M., Ammon, C., Rüdiger, K., Jung, M. y Grobbel, M. (2015). "Analysis of hygienic critical control points in boar semen production". *Theriogenology*, 83(3), pp. 430–437. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.10.004
- Schwarz S., Loeffler, A. y Kadlec, K. (2016). "Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine". *Veterinary Dermatology*, 28(1), pp. 82-e19. DOI: 10.1111/vde.12362
- Seiffert, S. N., Hilty, M., Perreten, V., & Endimiani, A. (2013). "Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health?". *Drug Resistance Updates*, 16(1-2), pp. 22–45. DOI: 10.1016/j.drup.2012.12.001
- Sterle, J. y Safranski, T. (2018). "Artificial Insemination in Swine: Breeding the Female". *University of Missouri-columbia*, pp.4. Disponible en: [Artificial Insemination in Swine: Breeding the Female \(missouri.edu\)](https://missouri.edu/) [Consultado 13-05-2023].
- Úbeda, J. L., Ausejo, R., Dahmani, Y., Falceto, M. V., Usan, A., Malo, C. y Perez-Martinez, F. C. (2013). "Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality". *Theriogenology*, 80(6), pp. 565–570. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.05.022
- Waberski, D., Riesenbeck, A., Schulze, M., Weitze, K. F. y Johnson, L. (2019). "Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges". *Theriogenology*, 137, pp. 2–7. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.030
- Wen, R., Li, C., Zhao, M., Wang, H. y Tang, Y. (2022). "Withdrawal of antibiotic growth promoters in China and its impact on the foodborne pathogen *Campylobacter coli* of swine origin". *Frontiers in Microbiology*, 13, pp. 11 DOI: 10.3389/fmicb.2022.1004725
- Wexler, H. M. (2007). "Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty". *Clinical Microbiology Reviews*, 20(4), pp.593–621. DOI: 10.1128/cmr.00008-07
- Witkowski, L., Rzewuska, M., Takai, S., Kizerwetter-Świda, M. y Kita, J. (2016). "Molecular epidemiology of Rhodococcus equi in slaughtered swine, cattle and horses in Poland". *BMC Microbiology*, 16, pp.98. DOI: 10.1186/s12866-016-0712-9
- World Health Organization (2023). WHO. Disponible en: <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance> [Consultado el 5-05-2023].

Zanotti, C., Munari, S., Brescia, G. y Barion, U. (2019). "Burkholderia gladioli sinonasal infection. European Annals of Otorhinolaryngology", *Head and Neck Diseases*, 136(1), pp. 55–56. DOI: 10.1016/j.anorl.2018.01.011