



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

Programa de Doctorado “Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

**“Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a
antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* de carne de
ave. Efecto de dosis subinhibitorias de biocidas sobre los patrones
y los mecanismos de resistencia”**

Memoria que presenta la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Diana Molina González

para optar al Grado de Doctora por la Universidad de León

Dirigida por:

Dra. Rosa María Capita González

Catedrática del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

Dr. Carlos Alonso Calleja

Catedrático del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

León, enero de 2021



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Doctorado “Ciencias Veterinarias y de los Alimentos”

“Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* de carne de ave. Efecto de dosis subinhibitorias de biocidas sobre los patrones y los mecanismos de resistencia”

“Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates from poultry. Effect of subinhibitory doses of biocides on patterns and mechanisms of resistance”

Diana Molina González

León, 2021



universidad
de león



esDule
Escuela de Doctorado
de la Universidad de León

INFORME DEL TUTOR

La Dra. Dña. **ROSA MARÍA CAPITA GONZALEZ**, como Tutora de la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* de carne de ave. Efecto de dosis subinhibitorias de biocidas sobre los patrones y los mecanismos de resistencia**”, realizada por Dña. **DIANA MOLINA GONZÁLEZ** en el programa de doctorado **Ciencias Veterinarias y de los Alimentos**, regulado por el R.D. 99/2011, de 28 de enero, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a 8 de enero de 2021



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹

Los Dres. Dña. **ROSA MARÍA CAPITA GONZÁLEZ** y D. **CARLOS ALONSO CALLEJA** (Catedráticos de Universidad, Área de Conocimiento de Nutrición y Bromatología, Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, Investigadores del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León –ICTAL-) como Directores² de la Tesis Doctoral titulada “**Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella enterica* de carne de ave. Efecto de dosis subinhibitorias de biocidas sobre los patrones y los mecanismos de resistencia**” realizada por Dña. **DIANA MOLINA GONZÁLEZ** en el programa de doctorado **Ciencias Veterinarias y de los Alimentos**, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, en León a ocho de enero de 2021.

¹ Solamente para las tesis depositadas en papel.

² Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.

El trabajo recogido en esta Memoria de Tesis Doctoral ha sido subvencionado por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Proyecto de Investigación LE013A10-2; IP Dr. Carlos Alonso Calleja), la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (Proyecto de Investigación 2011/00139/001; IP Dr. Carlos Alonso Calleja) y el Ministerio de Industria, Economía y Competitividad (Proyecto de Investigación AGL2011-29645; IP Dr. Carlos Alonso Calleja).

Diana Molina González disfrutó de varios Contratos por Obra y Servicio, con cargo a los Proyectos de Investigación anteriormente señalados, entre octubre de 2011 y diciembre de 2014.

Los Proyectos indicados se han llevado a cabo por las siguientes personas, a las que se reconoce y agradece el trabajo realizado: Dr. Carlos Alonso Calleja, Dra. Rosa Capita González, Dra. Alicia Alonso Hernando, Dra. Emilia Guerrero Ramos, Dra. Laura Buzón Durán, Dr. Félix Riesco Peláez, Dra. Elena María Álvarez Fernández, Dra. Patricia Poeta, Dr. Gilberto Igrejas, Jennifer Manteca Suárez, Miryam Díez García, Sonia Blanco Morán, María González Gutiérrez, Diana Molina González, Jorge Cordero de la Hueriga y Cristina Rodríguez Melcón.

La presente Memoria de Tesis Doctoral se ha elaborado utilizando una parte de los resultados derivados de los Proyectos mencionados, y los resultados que se presentan son fruto del trabajo colaborativo de varios de los investigadores anteriormente citados.

*“ Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.
Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
también es un niño colocado ante fenómenos naturales
que lo impresionan como un cuento de hadas ”*

Marie Curie (1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, mi agradecimiento a los Doctores Rosa María Capita González y Carlos Alonso Calleja, por haberme dado la oportunidad de realizar esta Tesis y contribuir así a cumplir este sueño.

A mis compañeros y amigos del Instituto de Ciencia y Tecnología de los alimentos (ICTAL) y del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos, gracias a todos y cada uno de vosotros por todos los momentos vividos y por todo lo que me habéis enseñado y apoyado, Rosana y Jezabel, sin vosotras esta aventura nunca habría sido lo mismo. Javi, Camino, Cristina Muñoz, Tiquio, María, Miguel, Avelino, Chema, María Eugenia, Bernardo, Félix, Eugenia, Eva, Laura, Jorge, Alicia, a todos gracias. Quisiera tener un recuerdo especial para ti Maria, sé, que me sigues sonriendo desde el cielo.

Al Dr. Gilberto Igrejas y a la Dra. Patricia Poeta, por el fabuloso trato y por facilitar mi estancia en su laboratorio en la Universidad de Tras-os-Montes e Alto Douro (UTAD, Vila Real, Portugal), y por poner a mi disposición cepas con genes de resistencia a antibióticos que pude emplear como controles positivos en varios trabajos. De igual modo, mi agradecimiento a Hajer Radhouani, Susana Correia, Rui Pacheco y Alexandre Gonçalves por toda su ayuda, compañerismo y por su amistad.

Quisiera agradecer a mis compañeros y amigos del Departamento de Sanidad Animal, en especial a Ana Carvajal, Juan Fregeneda, Héctor Argüello, a Sandra Rodríguez, Valentín Pérez, Tere Bravo, Chiru, Marcelino Álvarez, Héctor Puente, Manuel Gómez, Oscar Mencía y Gloria Fernández Bayón, por vuestro constante apoyo e inestimable ayuda, por escucharme y ser un soporte importante para mí, a todos gracias.

A mis abuelos, Guillermo y Dulcinea, y a mis tíos, Manolo y Jovino, por ser el mejor ejemplo de trabajo, esfuerzo y superación que yo podría tener, por facilitarme siempre el camino y apoyarme en todos mis emprendimientos.

A mis padres, Pedro y Lita, por su amor, paciencia, dedicación y por enseñarme los valores que intento seguir. A mi hermana, Miriam, por ser la mejor compañera de aventuras que se puede tener y ser en parte la responsable de que yo me metiera en esta.

A mis pequeñas Miriam y Lucía, por haberme permitido terminar de escribir esta "TESI" a pesar de su insistencia en jugar y reclamar mi atención, a ti Domingo por tu incondicional apoyo y por tu empeño en que terminase de redactar esta Tesis, sin tu dedicación e incansable esfuerzo no lo habría conseguido ya que has sido mi gran amparo en los múltiples momentos de angustia y desesperación, por todo ello ¡gracias!

Índices

Índice general

| | |
|---|-----|
| INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES | 1 |
| 1. El género <i>Salmonella</i> | 3 |
| 1.1 Clasificación y características generales | 3 |
| 1.2 Serotipos de <i>Salmonella</i> | 4 |
| 1.3 Infecciones causadas por <i>Salmonella</i> | 7 |
| 1.4 Patogenicidad de <i>Salmonella</i> | 9 |
| 2. Carne y preparados cárnicos | 16 |
| 2.1 Principales definiciones | 16 |
| 2.2 Principales definiciones en aves de corral domésticas (<i>Gallus domesticus</i>) | 17 |
| 2.3 Producción de carne | 18 |
| 2.4 Consumo de carne | 23 |
| 2.5 Calidad de la carne de pollo | 24 |
| 3. Antimicrobianos usados en la industria alimentaria | 28 |
| 3.1 Compuestos biocidas | 29 |
| 3.2 Antibióticos | 41 |
| 4. Justificación y objetivos | 68 |
| 5. Bibliografía | 72 |
| CAPÍTULO I. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>Salmonella enterica</i> AISLADAS DE CARNE DE AVE | 95 |
| 1. Introducción | 97 |
| 2. Materiales y métodos | 100 |
| 2.1 Cepas | 100 |
| 2.2 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos | 101 |
| 2.3 Caracterización genotípica | 102 |
| 3. Resultados y Discusión | 105 |
| 3.1 Resistencia a antibióticos | 105 |
| 3.2 Genes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia | 113 |
| 4. Conclusiones | 126 |

Índices

| | | | |
|---|---|-----|-----|
| 5 | Bibliografía..... | 127 | |
| CAPÍTULO II. EFECTO DE CONCENTRACIONES SUBLETALES DE BIOCIDAS SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS, LOS GENES DE RESISTENCIA Y LOS FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>Salmonella enterica</i> CON RESISTENCIAS MÚLTIPLES | | | 147 |
| 1 | Introducción..... | 149 | |
| 2 | Materiales y métodos..... | 153 | |
| 2.1 | Cepas..... | 153 | |
| 2.2 | Biocidas..... | 153 | |
| 2.3 | Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) antes de la exposición..... | 153 | |
| 2.4 | Exposición de las cepas a concentraciones subinhibitorias de los biocidas. | 155 | |
| 2.5 | Determinación de las concentracion mínima inhibitoria (MIC) después de la adaptación..... | 156 | |
| 2.6 | Antibiogramas de las cepas de <i>Salmonella</i> | 156 | |
| 2.7 | Caracterización genotípica..... | 158 | |
| 2.8 | Análisis estadístico..... | 158 | |
| 3 | Resultados y discusión..... | 158 | |
| 3.1. | Determinación de la MIC y perfiles de resistencia a antibióticos..... | 158 | |
| 3.2. | Determinación de genes de resistencia a antibióticos y biocidas..... | 168 | |
| 4 | Conclusiones..... | 174 | |
| 5 | Bibliografía..... | 176 | |
| Capítulo III. BIOFILMS, HIDROFOBICIDAD Y CURVAS DE CRECIMIENTO EN CEPAS DE <i>Salmonella enterica</i> SOMETIDAS AL EFECTO DE VARIOS BIOCIDAS DE USO ALIMENTARIO | | | 183 |
| 1 | Introducción..... | 185 | |
| 2 | Material y métodos..... | 191 | |
| 2.1 | Cepas..... | 191 | |
| 2.2 | Formación de biofilm..... | 191 | |
| 2.3 | Curvas de crecimiento..... | 193 | |

| | | |
|-----|---|------------|
| 2.4 | Determinación de la hidrofobicidad..... | 194 |
| 2.5 | Determinación de la actividad de las bombas de expulsión..... | 195 |
| 3 | Resultados y discusión..... | 195 |
| 3.1 | Formación de biofilm..... | 195 |
| 3.2 | Curvas de crecimiento..... | 200 |
| 3.3 | Hidrofobicidad..... | 214 |
| 3.4 | Bombas de expulsión..... | 219 |
| 4 | Conclusiones..... | 223 |
| 5 | Bibliografía..... | 224 |
| | CONCLUSIONES | 233 |
| | ANEXO. Publicaciones | 237 |

Índice de tablas

| | |
|--|---------|
| Tabla 1. Producción de carne en el mundo (FAOSTAT, 2018)..... | 18 |
| Tabla 2. Producción de carne en la Unión Europea (FAOSTAT, 2018)..... | 21 |
| Tabla 3. Producción de carne en España (FAOSTAT, 2018)..... | 22 |
| Tabla 4. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (Capita y Alonso-Calleja, 2013; SCENIHR, 2009)..... | 31 |
| Tabla 5. Principales antibióticos y mecanismos de acción antimicrobiana (Adaptada de Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Dowling et al., 2017; Guilhelmelli <i>et al.</i> , 2013; Tenover, 2006)..... | 43-44 |
| Tabla 6. Mecanismos asociados con el incremento de la resistencia a biocidas y antibióticos de las bacterias de los biofilms (Capita y Alonso-Calleja, 2013)..... | 52 |
| Tabla I.1. Familias de antibióticos utilizados para analizar las 64 cepas de <i>Salmonella enterica</i> | 101 |
| Tabla I.2. Genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia utilizados para los aislamientos de <i>Salmonella enterica</i> | 104 |
| Tabla I.3. Serotipos de <i>Salmonella enterica</i> con resistencia y resistencia intermedia a cada uno de los antibióticos ensayados..... | 106 |
| Tabla I.4. Patrones de resistencia obtenidos para 64 cepas de <i>Salmonella enterica</i> procedentes de carne de pollo..... | 109 |
| Tabla I.5. Fenotipo y genes de resistencia presentes en las cepas de <i>Salmonella enterica</i> AMP ^R analizadas..... | 115 |
| Tabla I.6. Fenotipo de resistencia a antibióticos, genes de resistencia y factores de virulencia detectados en las cepas de <i>Salmonella enterica</i> ensayadas..... | 124-125 |
| Tabla II.1. Antimicrobianos usados en el ensayo con las cepas de <i>Salmonella enterica</i> | 157 |
| Tabla II.2. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) de los tres biocidas (mg/mL) obtenidas para las 10 cepas de <i>Salmonella enterica</i> multirresistentes antes y después de la adaptación..... | 159 |
| Tabla II.3. Patrones de resistencia antibióticos de las 10 cepas de <i>Salmonella enterica</i> analizadas, sin adaptar y adaptadas a diferentes biocidas..... | 163-164 |
| Tabla II. 4. Fenotipo de multirresistencia y genes de resistencia presentes en las cepas de <i>Salmonella enterica</i> AMP ^R analizadas..... | 170 |
| Tabla II. 5. Perfil genotípico de 10 cepas de <i>Salmonella enterica</i> adaptadas al NS, FTS y HS..... | 172-173 |

Índices

| | |
|---|-----|
| Tabla III.1.A. Formación de biofilm en cepas de <i>Salmonella enterica</i> sin adaptar (cepas control) y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario..... | 198 |
| Tabla III.1.B. Formación de biofilm en cepas de <i>Salmonella enterica</i> sin adaptar y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario y expuestas al efecto del FTS..... | 198 |
| Tabla III.1.C. Formación de biofilm en cepas de <i>Salmonella enterica</i> sin adaptar y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario y expuestas al efecto del NS..... | 199 |
| Tabla III.1.D. Formación de biofilm en cepas de <i>Salmonella enterica</i> sin adaptar y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario y expuestas al efecto del HS..... | 199 |
| Tabla III.2. Formación de biofilm de las cepas de <i>Salmonella enterica</i> adaptadas y sin adaptar y expuestas y no expuestas a los tres biocidas ensayados en este Estudio..... | 200 |
| Tabla III.3.A. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas no expuestas al efecto de los biocidas..... | 206 |
| Tabla III.3.B. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas expuestas al efecto del FTS..... | 207 |
| Tabla III.3.C. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas expuestas al efecto del NS..... | 207 |
| Tabla III.3.D. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas expuestas al efecto del HS..... | 208 |
| Tabla III.4.A. Parámetros cinéticos de crecimiento (B, incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y no adaptados a biocidas en ausencia de biocidas o en presencia de FTS (MIC/2)..... | 209 |
| Tabla III.4.B. Parámetros cinéticos de crecimiento (B, incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y no adaptados a biocidas en presencia de NS (MIC/2) o de HS (MIC/2)..... | 210 |
| Tabla III.5. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y expuestos a diferentes biocidas de uso alimentario..... | 211 |
| Tabla III.6 Parámetros cinéticos de crecimiento (B, incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria) de 10 serotipos de <i>Salmonella enterica</i> adaptados y expuestos a diferentes biocidas de uso alimentario..... | 212 |
| Tabla III.7 Correlación entre la capacidad de formación de biofilms y la tasa de crecimiento para los diferentes serotipos de <i>Salmonella</i> ensayados (coeficiente de correlación de Pearson)..... | 213 |
| Tabla III.8. Hidrofobicidad de 10 cepas de <i>Salmonella</i> adaptadas y sin adaptar usando hexadecano..... | 215 |

| | |
|---|-----|
| Tabla III.9. Hidrofobicidad de 10 cepas de <i>Salmonella</i> adaptadas y sin adaptar usando xileno..... | 216 |
| Tabla III.10 Hidrofobicidad de 10 cepas de <i>Salmonella</i> adaptadas y sin adaptar..... | 217 |
| Tabla III.11. Fase de latencia (L, horas) en cepas de <i>Salmonella</i> no adaptadas y previamente adaptadas a tres biocidas, en presencia y ausencia de CCCP..... | 220 |
| Tabla III.12. Ritmo máximo de crecimiento (μ ; $\Delta OD_{420-580}/h$) en cepas de <i>Salmonella</i> no adaptadas y previamente adaptadas a tres biocidas, en presencia y ausencia de CCCP..... | 221 |
| Tabla III.13. Incremento de la densidad óptica desde la inoculación a la fase estacionaria (B) en cepas de <i>Salmonella</i> no adaptadas y previamente adaptadas a tres biocidas, en presencia y ausencia de CCCP..... | 222 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura antigénica de las enterobacterias. Adaptado de Murray <i>et al.</i> (2017)..... | 7 |
| Figura 2. Esquema de una isla genómica bacteriana (Adaptada de Hacker y Carniel, 2001)..... | 15 |
| Figura 3. Proporción de producción de carne de pollo por región. Promedio 1993 – 2016 (FAOSTAT, 2018)..... | 20 |
| Figura 4. Porcentaje de carne de pollo dentro del total de carne de aves de corral a nivel mundial, en la UE y en España (FAOSTAT 2018)..... | 21 |
| Figura 5. Porcentaje de producción de carne de pollo dentro del total de la carne producida a nivel mundial, en la UE y en España (FAOSTAT, 2018)..... | 22 |
| Figura 6. Evolución de los casos de <i>Salmonella</i> notificados al Sistema de Información Microbiológica (SIM, 2016)..... | 26 |
| Figura 7. Distribución global de los cinco serovares principales asociados con la enfermedad clínica humana. Los gráficos de barras representan los 5 principales serovares no tifoideos (NTS, es decir, el serovar <i>S. Typhi</i> fue excluido) (Cheng <i>et al.</i> , 2019)..... | 27 |
| Figura 8. Descubrimiento de antibióticos y desarrollo de resistencias, panorama de los siglos XX y XXI (Munir <i>et al.</i> , 2020)..... | 42 |
| Figura 9. Mecanismos de acción y mecanismos de resistencia asociados a los principales antibióticos (Buzón-Durán <i>et al.</i> , 2017; Wright, 2010)..... | 45 |
| Figura 10. Mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos (Adaptada de Yao y Moellering, 2005)..... | 48 |
| Figura 11. Esquema de las diferentes etapas de la formación de biofilms de células bacterianas..... | 51 |
| Figura 12. Comparación de las cinco familias de las bombas de expulsión (Adaptada de Piddock, 2006)..... | 55 |
| Figura 13. Cuando una bacteria capta un plásmido, los genes en el plásmido pueden darles diferentes fenotipos. Por ejemplo, este plásmido codifica un gen de proteína verde fluorescente que hace que la bacteria sea verde fluorescente (Cómico de Maya Kostman, Cecchetelli, 2019)..... | 62 |
| Figura 14. Transferencia horizontal de genes entre bacterias (Adaptada de Furuya y Lowy, 2006)..... | 64 |
| Figura 15. Estructura básica de un integron (Adaptada de Pinilla <i>et al.</i> , 2006)..... | 65 |
| Figura I.1. Porcentaje de casos de salmonelosis en UE en función de los serotipos de <i>Salmonella enterica</i> durante el periodo 2014-2016 (Fuente: EFSA-ECDC, 2019)..... | 97 |

Índices

| | |
|---|-----|
| Figura I.2. Porcentaje de aislamientos resistentes a los 16 antibióticos analizados en las 64 cepas de <i>Salmonella enterica</i> estudiadas..... | 107 |
| Figura I.3. Porcentaje de genes y factores de virulencia detectados en las 64 cepas de <i>Salmonella enterica</i> | 113 |
| Figura I.4. Imagen del revelado del gen <i>aadA</i> | 119 |
| Figura II.1. Esquema del procedimiento seguido para la determinación de la MIC..... | 154 |
| Figura II.2. Procedimiento seguido para la exposición de las cepas a concentraciones subinhibitorias crecientes de los biocidas..... | 155 |
| Figura II.3. Porcentaje de cepas que muestran un incremento en la resistencia a los antibióticos después de la exposición a concentraciones subletales de biocidas. El incremento en la resistencia se define como un cambio desde susceptibilidad (antes de la exposición) a resistencia (después de la exposición) de acuerdo con las directrices del CLSI..... | 151 |
| Figura III.1. Curva de crecimiento microbiano con las diferentes etapas o fases de crecimiento y muerte..... | 190 |
| Figura III.2 Estructura química del xileno $C_6H_4(CH_3)_2$ y hexadecano($C_{16}H_{34}$)..... | 194 |

Abreviaturas

AACSTCSu, Fenotipo de resistencia frente a la Ampicilina, Amoxicilina-Clavulánico, Estreptomicina, Tetraciclinas, Cloranfenicol y Sulfamidas

ABC, *ATP binding cassette*

ACSSuT, Fenotipo de pentarresistencia (Ampicilina, Cloranfenicol, Estreptomicina, Sulfamidas y Tetraciclinas)

ADN, ácido desoxirribonucleico (también figura como DNA)

AK, amikacina (también figura como AMK)

AMC, amoxicilina/ácido clavulánico

AMK, amikacina (también figura como AK)

AMP, ampicilina

AMP^R, Resistencia a la ampicilina

Arg, aminoácido arginina

ARN, ácido ribonucleico

ARN_m, ácido ribonucleico mensajero

ARN_r, ácido ribonucleico ribosómico

ARN_t, ácido ribonucleico de transferencia

ATM, aztreonam

ATP, adenosín trifosfato

Aw, water activity (actividad de agua)

BLEE, β-lactamasas de espectro extendido

BOE, Boletín Oficial del Estado

C, cloranfenicol (también figura como CHL)

CAZ, ceftazidima

CCCP, carbonil cianuro-m-clorofenilhidrazona

CDC, *Centers for Disease Prevention and Control* (Centros para la Prevención y el Control de Enfermedades, Estados Unidos)

CE, Comunidad Europea

CHL, cloranfenicol (también figura como C)

CIP, ciprofloxacina

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, Estados Unidos de América del Norte –EE.UU.-)

CN, gentamicina (también figura como GEN)

CNE, Centro Nacional de Epidemiología (España)

CTX, cefotaxima

Abreviaturas

DO, densidad óptica

DO_c, densidad óptica de corte

DOI, Identificación de Objeto Digital

ECDC, *European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro para la Prevención y el Control de Enfermedades, Unión Europea)

ECHA, *European Chemicals Agency* (Agencia Europea de Sustancias Químicas)

EE.UU., Estados Unidos de América del Norte

EEE, Espacio Económico Europeo

EFSA, *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

ENR, enrofloxacina

EPS, exopolisacárido

F, nitrofurantoina

FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, sede en Roma-Italia-)

FAOSTAT, división estadística de la FAO

FEP, cefepime

FOS, fosfomicina

FOX, cefoxitina

FTS, fosfato trisódico

GC, guanina-citosina

GEN, gentamicina (también figura como CN)

HS, hipoclorito sódico

IFT, *Institute of Food Technologists* (Instituto de Tecnólogos de Alimentos, EE.UU.)

IMP, imipenem

IR, integrón de resistencia

ISCI, Instituto de Salud Carlos III (España)

ISPCH, Instituto de Salud Pública de Chile

K, kanamicina

KF, cefalotina

KZ, cefazolina

L, fase de latencia

L+D, limpieza y desinfección

LPS, Lipopolisacárido

MAPA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España)

MATE, *Multidrug and Toxic compound Extrusion*

MATS, *microbial adhesion to solvents* (prueba de adhesión microbiana a solventes)

MH, Mueller-Hinton

MIC, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentración Mínima Inhibitoria)

MLEE, *MultiLocus Enzyme Electrophoresis* (Electroforesis enzimática MultiLocus)

MLST, *MultiLocus Sequence Typing* (Tipificación de la secuencia MultiLocus)

MLVA, *MultiLocus Variable number of tandem repeats Analysis* (análisis multiLocus de número variable de repeticiones en tándem)

MSF, *Major Facilitator Superfamily*

NAL, ácido nalidíxico

NO, óxido nítrico

NO₂, dióxido de nitrógeno

NS, nitrito sódico

OJEU, *Official Journal of European Union* (Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE)

OMP, *Outer Membrane Protein* (Proteínas de membrana externa)

OMS, Organización Mundial de la Salud (WHO en inglés, sede en Ginebra – Genève-, Suiza)

P, penicilina G

PABA, para-aminobenzoato

PBP, proteínas de anclaje de las penicilinas

PCR, *polimerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)

PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Electroforesis en gel de campo pulsado)

PMF, *Proton Motive Force* (Fuerza protón motriz)

QAC, compuestos de amonio cuaternario

RD, Real Decreto

RD, rifampicina

RND, *Resistance Nodulation-Cell Division*

S, estreptomycin (también figura como STR)

Abreviaturas

S3, sulfonamidas (también figura como SUL)

SAM, ampicilina/sulbactam

SCENIHR, *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (Comité Científico de Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados, Unión Europea)

SCV, Vacuola de contención de *Salmonella*

SDS, dodecilsulfato sódico (*Sodium dodecyl sulfate*)

SH, espectinomicina

SMR, *Staphylococcal multiresistance*

SPI, islas de patogenicidad

SST1, sistema de secreción tipo I

SST3, sistema de secreción tipo III

STR, estreptomicina (también figura como S)

SUL, sulfonamidas (también figura como S3)

SXT, trimetoprim/sulfametoxazol

TE, tetraciclina (también figura como TET)

TEC, teicoplanina

TET, tetraciclina (también figura como TE)

TIC, ticarcilina

TOB, tobramicina

TSA, *Tryptone Soya Agar* (agar triptona de soja)

TSB, *Tryptone Soya Broth* (caldo triptona de soja)

TZP, piperacilina/tazobactam

μ , ritmo máximo de crecimiento

UE, Unión Europea

WHO, *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud, sede en Ginebra –Suiza-)

Resumen

Resumen

La salmonelosis es una de las infecciones alimentarias de mayor importancia en Europa y, aunque se ha reducido de forma significativa su incidencia en los últimos años, *Salmonella enterica* sigue siendo el principal agente etiológico de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en la Unión Europea. Los dos serotipos de *S. enterica* con mayor prevalencia son *S. enterica* serotipo Enteritidis y *S. enterica* serotipo Typhimurium. Por otro lado, el incremento de *S. enterica* con resistencia o multiresistencia a los antibióticos es un problema de gran importancia clínica que se está acrecentando en las últimas décadas.

Los microorganismos han desarrollado varias estrategias para resistir frente a los efectos de los antimicrobianos, entre las que se incluyen la formación de biofilms, la reducción de la permeabilidad celular, la expresión incrementada de bombas de expulsión, la modificación o superproducción de los lugares diana o receptores y la adquisición de rutas metabólicas alternativas a las inhibidas por los antimicrobianos. De forma general, la transmisión de microorganismos resistentes a los antibióticos a los seres humanos en la cadena alimentaria puede tener lugar por contacto directo o por el consumo de alimentos contaminados, siendo estos la vía más importante, especialmente cuando no se llevan a cabo unas adecuadas prácticas de higiene. En los últimos años se ha sugerido que existe un vínculo directo entre la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos, ya que los mecanismos que contribuyen a ambas circunstancias son similares, y se ha comprobado que la exposición a concentraciones subletales de biocidas favorece la selección de cepas de microorganismos resistentes a antibióticos, principalmente a través de mecanismos de co-resistencia o de resistencia cruzada.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido evaluar la influencia de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de tres biocidas de uso habitual en la industria alimentaria, el fosfato trisódico (FTS), el nitrito sódico (NS) y el hipoclorito sódico (HS), sobre la generación de resistencias a diferentes antibióticos y sobre algunos de los posibles mecanismos de adaptación que causan dichas resistencias, tales como la formación de biofilms, las

Resumen

modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie celular o la expresión de bombas de expulsión activa.

Para ello, se llevó a cabo una caracterización, tanto fenotípica como genotípica, de la resistencia a antibióticos en 64 cepas de *S. enterica* procedentes de carne de pollo. Todos los aislamientos fueron ensayados frente a un panel de 16 antimicrobianos. Los porcentajes de resistencia más altos se obtuvieron frente a antibióticos aminoglucósidos, quinolonas, sulfonamidas, ampicilina y tetraciclina. La caracterización genotípica permitió demostrar la presencia de genes de resistencia para antibióticos betalactámicos (*bla*_{TEM} y *bla*_{PSE-1}), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*, *qacEΔ1*), estreptomina (*aadA*, *strA*, *strB*), gentamicina (genes *aac* (3)-II, *aac*(3)-IV), cloranfenicol (genes *cmiA* y *FloR*) y tetraciclina (*tetA*, *tetB*, *tetG*). Se han estudiado seis factores determinantes de virulencia (*papC*, *cnf1*, *fimA*, *aer*, *hly* y *papGIII*), los cuales se han detectado en porcentajes muy bajos (9,4%, 6,3%, 4,7%, 4,7 %, 0 % y 0%, respectivamente).

A continuación, se seleccionaron las 10 cepas (pertenecientes a 10 serotipos diferentes) de *S. enterica* más relevantes, por presentar un mayor número de resistencias o por pertenecer a serotipos frecuentemente implicados en casos de salmonelosis humana, que se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de FTS, NS e HS, con la finalidad de conseguir su adaptación a los compuestos. Además de determinar la influencia de esta exposición sobre los patrones de resistencia a antibióticos de las cepas, se estudió su efecto sobre algunos mecanismos de resistencia, como la capacidad para formar biofilm, la hidrofobicidad de la superficie celular, los parámetros cinéticos de crecimiento y la actividad de las bombas de expulsión.

Tras la adaptación a los biocidas, se produjo un incremento sustancial de la concentración mínima inhibitoria de los tres compuestos ensayados. Antes y después de la adaptación a los biocidas, se determinó la sensibilidad de las cepas frente a un panel de 31 antibióticos de interés clínico, observándose cambios en los patrones de resistencia para diferentes clases de antibióticos, hecho que sugiere la existencia de mecanismos de resistencia de amplio espectro (p. ej., cambios en la superficie celular o síntesis incrementada de bombas de expulsión inespecíficas) que pueden provocar una disminución en la sensibilidad a compuestos con diversas estructuras químicas.

Además, se realizó la caracterización genotípica de los aislamientos, presentando, los serotipos *S. Hadar* y *S. 1,4,[5],12:i:-*, una reducción en el número de genes de resistencia detectados tras la adaptación. El fosfato trisódico fue el biocida que se asoció a una mayor disminución en la detección de estos genes de resistencia, hecho que podría ser consecuencia de algún mecanismo que impida la amplificación de determinados genes o de cambios en el genoma bacteriano.

Las cepas de *S. Agona* y *S. Infantis* destacaron por presentar la mayor capacidad de formación de biofilms del conjunto de cepas ensayadas, tanto cuando no estaban adaptadas como cuando lo estaban frente a los tres biocidas. La adaptación al fosfato trisódico dio lugar al mayor incremento en la capacidad de formación de biofilms.

Otro de los mecanismos de resistencia estudiados fue la variación en la hidrofobicidad de la superficie celular de los aislamientos tras la exposición a los biocidas, empleando la técnica de adhesión microbiana a solventes no polares. De los dos compuestos utilizados, xileno y hexadecano, el primero fue el que mayor afinidad presentó por las cepas de *Salmonella* analizadas. Si bien se observaron variaciones entre serotipos, la adaptación de las cepas al FTS incrementó sustancialmente su hidrofobicidad superficial.

En cuanto a los parámetros de crecimiento estudiados, de manera general, los tratamientos biocidas más efectivos fueron el nitrito sódico y el hipoclorito sódico, ya que se asociaron a una mayor reducción del ritmo de crecimiento. En presencia del inhibidor de las bombas de expulsión carbonilcianuro-*m*-clorofenilhidrazona (CCCP), únicamente se observó crecimiento en el caso de las cepas expuestas a nitrito sódico, estando inhibido el crecimiento tras la exposición a fosfato trisódico e hipoclorito sódico, lo que demuestra el papel de las bombas de expulsión en la adaptación de las cepas a los biocidas.

Introducción y Antecedentes

1. El género *Salmonella*.

1.1. Clasificación y características generales.

Los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* están distribuidos ampliamente en la naturaleza y muchas de sus especies viven en el intestino tanto de seres humanos como de animales, incluidos los insectos, donde pueden causar enfermedades entéricas o permanecer como organismos comensales (Cabral, 2010; Lorenzo *et al.*, 2018; Morales-López *et al.*, 2019). Las enterobacterias son catalasa positiva y oxidasa negativa, no formadoras de esporas y con metabolismo oxidativo y fermentativo. El género *Salmonella* está incluido dentro de la Familia *Enterobacteriaceae*, Orden Enterobacteriales, Clase gamma-proteobacteria (Achtman *et al.*, 2012; Garrity *et al.*, 2004; Morales-López *et al.*, 2019), siendo un microorganismo patógeno transmitido por los alimentos y estando ampliamente distribuido por todas las regiones del mundo (Herrero-Fresno y Olsen, 2018). Se trata de bacterias Gram-negativas compuestas por una membrana interna (citoplasmática), que es una bicapa fosfolipídica con proteínas integradas, una membrana externa compuesta principalmente de lipopolisacáridos (LPS) y proteínas, y una delgada capa rígida de peptidoglicano localizado en el espacio periplásmico (Bertani y Ruiz, 2018). La capa de peptidoglicano tiene la capacidad de interactuar con varias proteínas de la membrana celular, lo que va a proporcionar estabilidad a las membranas externas e internas de las células (Egan *et al.*, 2020; Godlewska *et al.*, 2009; Meloni *et al.*, 2015).

Salmonella presenta un rango de temperaturas de crecimiento amplio, que varía desde los 5 °C hasta los 45-47 °C, estando su rango de temperatura óptima de crecimiento comprendido entre los 35 °C y los 37 °C. El pH óptimo de crecimiento es de 6,5-7,5, si bien sobrevive en el rango de 4,5 a 9. Estas bacterias se desarrollan bien con una actividad de agua (*A_w*) de 0,945 a 0,999, aunque son capaces de sobrevivir largos periodos de tiempo en medios con valores muy bajos de actividad de agua, como es el caso de los alimentos deshidratados (Andino y Hanning, 2015).

Introducción y Antecedentes

1.2. Serotipos de *Salmonella*.

Existe poca uniformidad en el sistema de clasificación de *Salmonella* y actualmente se considera que existen dos especies dentro del género *Salmonella*: *S. enterica* y *S. bongori* (Ryan *et al.*, 2017; Tindall *et al.*, 2005). *S. enterica* se subdivide a su vez en seis subespecies: *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV) y *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (Ashton *et al.*, 2016; Giner-Lamia *et al.*, 2019; Popoff *et al.*, 2004; Porwollik *et al.*, 2004) y más de 2500 serovares, alguno de los cuales son patógenos estrictamente humanos (*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhi), y otros están específicamente asociados a animales (*Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Abortusovis). Hay que señalar, no obstante, que la mayoría son serovares ubicuos y patógenos tanto en animales como en humanos y, como tales, pueden causar enfermedades zoonóticas (Lelièvre *et al.*, 2019; Lou *et al.*, 2019). *S. enterica* subsp. *enterica* es la más frecuente y se aísla en humanos y en animales de sangre caliente. El resto de subespecies de *S. enterica*, así como *S. bongori*, se encuentran habitualmente en animales de sangre fría y en el ambiente (Figueroa y Verdugo, 2005; Jajere, 2019; Lamas *et al.*, 2018).

Los distintos serotipos de *Salmonella* se suelen denominar según el lugar geográfico o especie animal donde se aislaron por primera vez. Las serovariedades de especies menos frecuentes se designan utilizando el nombre de la especie seguido de su fórmula antigénica. Los nombres de todas las serovariedades están contenidos en el Esquema de Kauffmann-White, publicado por el “Centro Colaborador de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para Referencia e Investigación en *Salmonella*” del Instituto Pasteur de París (Brenner *et al.*, 2000; Grimont y Weill, 2007; Ryan *et al.*, 2017).

El estudio de la estructura antigénica del género *Salmonella* permite tipificar las bacterias que lo componen en serovariedades (serotipos) que se basan en las diferencias en sus propiedades antigénicas. La serotipificación de *Salmonella* se basa en el sistema de Kauffmann-White que, del mismo modo que en otras enterobacterias, utiliza tres tipos de antígenos de superficie:

- 1) **Antígenos somáticos (O):** son moléculas complejas, termoestables y alcohol-resistentes. Forman parte del lipopolisacárido (LPS), el cual se considera un factor de virulencia en bacterias Gram-negativas y se localiza en la membrana externa de la pared celular y posee estructuralmente tres zonas (Figura 1). El **lípidio A** es la zona más interna y con actividad tóxica intensa (endotoxina), que ancla el LPS en la membrana; el **polisacárido central** o núcleo del polisacárido, formado por varios azúcares, muchos de ellos con estructura poco común, y la **cadena lateral O** que es una cadena de heteropolisacáridos, más o menos larga, que se extiende hacia la parte externa del núcleo protegiendo a la célula bacteriana de las acciones del sistema inmunológico (Kintz *et al.*, 2017; Maldonado *et al.*, 2016). El antígeno O es inmunogénico y puede ser un objetivo funcional para las vacunas (Kintz *et al.*, 2017).
- 2) **Antígenos flagelares (H):** los flagelos son los orgánulos responsables de la motilidad en diversas especies bacterianas. La proteína estructural de los flagelos se denomina flagelina y presenta una elevada actividad antigénica constituyendo un factor de virulencia que media la adhesión e invasión de las células epiteliales del hospedador (Won y Lee, 2016). Tienen una región central que presenta gran variabilidad, siendo muy variable tanto en secuencia como en longitud entre los genes del antígeno flagelar y generalmente se cree que determina el epítipo del antígeno H, mientras que los extremos terminales -COOH y -NH₂ están altamente conservados. Esta variabilidad de la región central se utiliza para definir los antígenos flagelares dentro del esquema de Kauffmann-White.

Los serotipos de *Salmonella* pueden ser monofásicos o bifásicos en función de si producen un solo tipo de antígeno H o dos tipos de antígeno H, respectivamente. Una cepa de *Salmonella* sólo es capaz de expresar un tipo de antígeno flagelar en un determinado momento, sin embargo, las cepas de *Salmonella* capaces de codificar para la flagelina de tipo 1 en la primera fase de crecimiento y para la flagelina de tipo 2 en la siguiente, presentarán una ventaja adaptativa para sobrevivir a la respuesta inmune del hospedador; a este proceso se le conoce como variación de fase (Herrera-León *et al.*, 2004; Thomson *et al.*, 2018)

Introducción y Antecedentes

3) **Antígenos capsulares (K):** el polisacárido capsular constituye la capa más externa de la célula bacteriana y media su interacción directa con el medio ambiente. Debido a estas interacciones, los polisacáridos capsulares suponen un importante factor de virulencia para muchos patógenos bacterianos. El polisacárido capsular se encuentra principalmente en bacterias Gram-negativas tales como *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella* (Misra *et al.*, 2015). En *Salmonella* solamente se conoce el antígeno Vi, denominado así por ser el determinante en la virulencia de esta bacteria. Es un polímero lineal del ácido α -1,4 (2-deoxi)-2-N-acetilgalacturónico, que puede estar acetilado en posición C3 y aparece de forma específica en tres serotipos altamente invasivos: S. Typhi, S. Paratyphi y S. Dublin (Virlogeux-Payant y Popoff, 1996; Raffatellu *et al.*, 2006).

De esta manera, se han identificado más de 2500 serotipos, pertenecientes a dos especies, a *S. enterica* (con más de 2400 serotipos) y a *S. bongori* (20 serotipos poco frecuentes) (Costa *et al.*, 2012; Reeves *et al.*, 1989). La determinación del serotipo de *Salmonella* es importante para evaluar la enfermedad, llevar a cabo el control de la infección y conseguir una adecuada vigilancia epidemiológica (CDC, 2011).

Los serotipos de *Salmonella* pueden dividirse a su vez en fagotipos. El fagotipado es una técnica muy utilizada para la tipificación de *Salmonella*, mediante la cual se estudia la resistencia o sensibilidad de las cepas frente a una serie de bacteriófagos seleccionados, los cuales infectan y lisan las células bacterianas. Es complejo mantener y utilizar una colección de fagos de manera adecuada, por lo que las fagotipias se suelen realizar solamente en los centros de referencia (Demczuk *et al.*, 2003; Petsong *et al.*, 2019).

El serotipado y el fagotipado han sido las técnicas tradicionalmente utilizadas para clasificar y diferenciar los aislamientos de *Salmonella* en base a sus características serológicas; hoy en día se emplean las técnicas de biología molecular, tales como: la técnica de *Pulsed Field Electrophoresis* (PFGE), *MultiLocus Variable number of tandem repeats Analysis* (MLVA), *MultiLocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE) o *MultiLocus Sequence Typing* (MLST). Dichas

técnicas se basan en la amplificación específica de fragmentos de ADN y posterior secuenciación, y se utilizan tanto para realizar la clasificación como para estudiar el origen evolutivo de las cepas (Achtman *et al.*, 2012; Ferrari *et al.*, 2017).

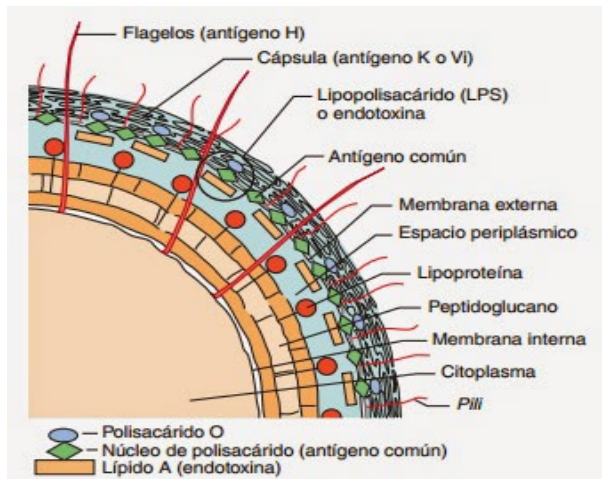


Figura 1. Estructura antigénica de las enterobacterias. Adaptado de Murray *et al.* (2017).

1.3. Infecciones causadas por *Salmonella*.

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos que presentan los animales productores de alimentos puede propagarse a las personas y no sólo a través de rutas alimentarias, sino a través de otras rutas como el agua, la contaminación ambiental, o a través del contacto directo con animales. *Campylobacter*, *Salmonella* y algunas cepas de *Escherichia coli* son ejemplos de bacterias zoonóticas que pueden infectar a las personas a través de los alimentos. Las infecciones causadas por bacterias que son resistentes a los antimicrobianos pueden provocar fallos en el tratamiento con estos compuestos o requerir el uso de otros medicamentos de segunda línea. La microbiota bacteriana comensal también puede formar un reservorio de genes de resistencia, que pueden transferirse entre especies bacterianas, incluidos los organismos capaces de causar enfermedades tanto en los seres humanos como en los animales (EFSA-ECDC, 2019).

Las infecciones humanas y animales producidas por *Salmonella* se denominan salmonelosis. *Salmonella* es un patógeno intracelular facultativo que dependiendo del serotipo y del hospedador puede presentar tres maneras de manifestarse: la bacteria puede ser eliminada del organismo gracias al sistema inmune del hospedador, puede mantenerse en el organismo dando lugar a un

Introducción y Antecedentes

estado de portador asintomático, o bien, puede ocasionar distintos cuadros clínicos, como infección intestinal, septicemia y fiebre entérica (Hensel, 2004; Hurley *et al.*, 2014; Khan, 2014).

La infección tiene lugar después del consumo de alimentos o agua contaminados por *Salmonella*, cuya dosis infectiva mínima es de 10^5 - 10^6 ufc, dependiendo de la virulencia de la cepa y de las características del hospedador. Generalmente, los síntomas aparecen entre las 6 y las 72 horas después de su ingesta. Los principales síntomas de la salmonelosis son: náuseas, dolor abdominal, somnolencia, diarrea con o sin sangre y fiebre. La mortalidad de los afectados por salmonelosis suele ser menor al 1%, siendo la población más vulnerable los ancianos, niños y personas previamente enfermas (Kurtz *et al.*, 2017).

Las principales fuentes de infección alimentaria por *Salmonella* son el huevo, la carne de cerdo y la carne de pollo (EFSA-ECDC, 2015). La salmonelosis se transmite a otras personas o a animales a través de las heces, ya que la forma más habitual de transmisión es la ruta fecal-oral, donde el lugar inicial de infección después de la ingestión se encuentra dentro del intestino delgado distal (Ly y Casanova, 2007). Los seres humanos excretan bacterias durante el curso de la infección, la cual puede durar de varios días a semanas, y las personas pueden ser portadoras durante varios meses. Así, se ha demostrado que entre el 0,3% y el 0,6% de los pacientes con infecciones por *Salmonella* no tifoidea excretan bacterias en las heces durante más de un año (Gunn *et al.*, 2014).

En general, el tratamiento antibiótico está desaconsejado para aquellas salmonelosis que provocan infección intestinal por el riesgo de fomentar la aparición de portadores crónicos. Sin embargo, en niños, ancianos y personas inmunocomprometidas se puede necesitar el uso de distintos antibióticos como fluoroquinolonas (solo en adultos), amoxicilina-ácido clavulánico, tetraciclinas, cotrimoxazol, fosfomicina o cefalosporinas de tercera o cuarta generación (EFSA-ECDC, 2015).

1.4. Patogenicidad de *Salmonella*

La estrategia patogénica desarrollada por *S. enterica* es muy compleja, llevándose a cabo la penetración de la barrera intestinal y la interacción con las células del sistema inmune, donde actúa como patógeno intracelular (Velge *et al.*, 2012)

Debido a que las células epiteliales no son intrínsecamente fagocíticas, *Salmonella* ha desarrollado un repertorio sofisticado de factores de virulencia que le permiten penetrar en el epitelio intestinal, desde el cual pueden diseminarse sistémicamente para colonizar varios órganos como el hígado y el bazo (Ly y Casanova, 2007).

Podemos distinguir dos grupos de factores de virulencia:

1) Estructuras superficiales de la bacteria: dentro de estas estructuras (son dianas también del sistema inmune del hospedador), se incluyen **el lipopolisacárido (LPS)**, con actividad tóxica, debido fundamentalmente al lípido A; **los flagelos**, que dirigen la bacteria hacia el epitelio intestinal, mediante quimiotaxis, permitiéndole atravesar la espesa capa de mucina, y además contribuyen al proceso de inflamación; **la cápsula**, directamente relacionada con la capacidad invasiva (serotipo Typhi) y **las fimbrias**. El LPS, los flagelos y la capsula han sido descritos con anterioridad en esta Introducción.

En cuanto a las **fimbrias** o “pili”, se definen como estructuras superficiales filamentosas de naturaleza proteica, producidas tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas, las cuales contribuyen a la colonización de la bacteria mediante la adhesión y la unión de receptores específicos del hospedador durante la primera etapa de la invasión (Chahales y Thanassi, 2015; Collinson *et al.*, 1996; Werneburg y Thanassi, 2018). Los análisis fenotípicos y genómicos han identificado 39 supuestos operones fimbriales en *Salmonella*, de los cuales el operón *agf* se encuentra entre los aislamientos de *S. enterica* y *S. bongori*, y codifica las fimbrias curli agregantes que favorecen la adhesión e invasión bacteriana (Cheng *et al.*, 2019). Muchos de estos operones son inducidos *in vivo* y se requieren tanto para la formación de biofilms (Azimi *et al.*, 2020; Hurtado-Escobar *et al.*, 2019) como para el ataque a células hospedadoras (anfitrionas) y la colonización, pero no para la supervivencia en el interior celular

Introducción y Antecedentes

(Foley *et al.*, 2013; Van Asten y Van Dijk, 2005a). Destacan las fimbrias de tipo 1 o Fim (operón *fim*); las denominadas “long polar fimbriae” o Lpf (operón *lpf*); fimbrias “thin aggregative fimbriae” (Tafi), dentro de las cuales tenemos las fimbrias agf y sef (operones *agf*) y las fimbrias asociadas a plásmidos o PEF (operón *pef*) (Baumler y Heffron, 1995; Collinson *et al.*, 1996; Foley *et al.*, 2013).

Cada uno de los operones fimbriales contienen múltiples genes, normalmente entre 8 y 11 genes, los cuales codifican para la estructura y el ensamblaje de las fimbrias (proteínas de las fimbrias) (Clouthler *et al.*, 1994; Foley *et al.*, 2013).

Estos tipos de fimbrias no están presentes en todos los serotipos de *Salmonella*. Por ejemplo, los operones *lpf* y *pef* se encuentran en *S. Typhimurium* pero no han sido descritos en serotipos relacionados ni tampoco en otro tipo de enterobacterias (Baumler y Heffron, 1995). Los operones *agf* y *sef* codifican para la fimbria SEF17 en *S. Enteritidis* (Aziz *et al.*, 2018; Thorns *et al.*, 1996; White *et al.*, 2003). Algunos autores indican que estas fimbrias pueden estar implicadas en la patogenia de *S. Enteritidis*, aunque en este sentido hay muchos estudios contradictorios.

Las fimbrias SEF14 se expresan en *S. Enteritidis*, *S. Dublin* y en los serotipos *S. Berta* y *S. Gallinarum* asociados a las aves de corral, donde parecen tener importancia para la adhesión a los tejidos del tracto reproductivo. Las fimbrias tipo I contribuyen a la colonización de cerdos por *Salmonella*, mientras que las 13 subunidades fimbriales principales de *S. Enteritidis* PT4, favorecen la adherencia de las bacterias y la colonización del intestino de pollo (Foley *et al.*, 2013).

La gran variabilidad proteica y la diversificación en cuanto a estructura y composición que se ha observado entre los distintos tipos de fimbrias van a permitir a *Salmonella* evadir de manera más fácil las defensas del hospedador (Werneburg y Thanassi, 2018; Yue *et al.*, 2012).

2) Genes de virulencia: están localizados en el cromosoma o en plásmidos. Estos genes pueden estar en agrupaciones mayores **llamadas islas de patogenicidad (SPI)** o también libres o formando parte de pequeñas agrupaciones llamadas **islotes** (Desvaux *et al.*, 2020; Schmidt y Hensel, 2004).

1.4.1. Islas de patogenicidad.

En *Salmonella* se han identificado 24 islas de patogenicidad, las cuales han sido adquiridas horizontalmente y codifican genes que facilitan varios mecanismos de virulencia, entre los que se incluyen (a) la expresión de sistemas de secreción, fimbrias, flagelos y cápsulas, (b) conversión de serotipos y (c) colonización y supervivencia dentro del hospedador (Cheng *et al.*, 2019; Van Asten y Van Dijk, 2005). La estrategia patogénica de *S. enterica* incluye la penetración de la barrera intestinal y la interacción con células del sistema inmune donde actúa como parásito intracelular. Generalmente, la bacteria penetra en el hospedador vía digestiva a través de alimentos o agua contaminados (Khan, 2014).

Tras la ingestión de *Salmonella*, las bacterias alcanzan el estómago donde se enfrentan a los jugos gástricos y a un pH muy ácido, lo cual da lugar a una respuesta de supervivencia de tolerancia a los ácidos, lo que va a generar cambios fisiológicos, permitiendo la supervivencia de una pequeña población. Aquellas bacterias capaces de sobrevivir a estas condiciones, así como a otros mecanismos defensivos propios de nuestro organismo, pueden llegar a colonizar el íleon y/o el colon e invadir el epitelio. Esta invasión puede ser pasiva (realizada por células dendríticas que emiten pseudópodos) o bien activa (mediante la unión a receptores específicos de la superficie de la célula hospedadora, seguida de una internalización). La invasión activa requiere que *Salmonella* inyecte sobre la célula hospedadora unas proteínas efectoras, utilizando un sistema de secreción de tipo III (STT3) codificado en la Isla de Patogenicidad de *Salmonella* de tipo I (SPI-1) (Khan, 2014; Ly y Casanova, 2007; McGhie *et al.*, 2009).

Una vez en el interior de la célula, *Salmonella* es capturada por células fagocíticas (macrófagos) que transportan la bacteria hacia el sistema linfático y pueden facilitar su dispersión hacia el hígado, bazo o nódulos linfáticos. La persistencia de la bacteria en el interior de este tipo de células se debe a que *Salmonella* es capaz de crear una vacuola, conocida como “Vacuola de Contención de *Salmonella*” (SCV) que permite su supervivencia y replicación en el interior de los macrófagos. Esta etapa requiere la expresión de otro sistema de secreción de tipo III, codificado en la Isla de Patogenicidad de tipo 2 (SPI-2), y que permite la secreción de efectores de virulencia desde la vacuola al

Introducción y Antecedentes

citoplasma celular del hospedador. Aunque se sabe que *Salmonella* puede provocar en este estadio una segregación de citoquinas que median en la inflamación epitelial (provocando el fenómeno de diarreas) e incluso una apoptosis de las células que las contienen, hasta el momento no quedan claros los mecanismos por los cuales la bacteria abandona la célula hospedadora y continúa infectando a otras células (Knuff-Janzen *et al.*, 2020; Ly y Casanova, 2007; McGhie *et al.*, 2009).

La capacidad de *Salmonella* para llevar a cabo un eficiente proceso de colonización es atribuida a un clúster de genes, como las Islas de Patogenicidad (SPI), los cuales codifican para factores de virulencia que se distribuyen en el genoma de *Salmonella* (Foley *et al.*, 2008; Jajere, 2019). Se cree que estas agrupaciones de genes han sido adquiridas por *Salmonella* a partir de otras especies bacterianas mediante transferencia horizontal debido a que se encuentran flanqueadas por genes que codifican RNAt. Además, están asociadas a elementos genéticos móviles, lo que habría provocado un incremento en la patogenicidad de esta bacteria a lo largo de la evolución (Hensel, 2004; Van Asten y Van Dijk, 2005; Kim *et al.*, 2019).

Las islas de patogenicidad a menudo incluyen elementos móviles (o fragmentos de los mismos), tales como bacteriófagos, plásmidos y secuencias de inserción. Estos elementos móviles juegan un papel importante en la recombinación, dando como resultado reordenamientos genéticos, inserciones, deleciones y, por lo tanto, variación en las islas de patogenicidad (Desvaux *et al.*, 2020).

Se han descrito varias islas de patogenicidad en *Salmonella*, algunas de las cuales están presentes en todas las células del género *Salmonella*, mientras que otras tan solo se han detectado en algunos serotipos (Hensel, 2004), siendo la SPI-1 y la SPI-2 las que mejor caracterizadas están tanto genotípica como fenotípicamente (Cheng *et al.*, 2019). A continuación, se detallan algunas de ellas (Figura 2):

- 1) Isla de patogenicidad de tipo 1 (SPI-1):** es una inserción de 40 kb en el cromosoma bacteriano. Esta isla es imprescindible en la invasión de las células epiteliales, ya que codifica un sistema de secreción de tipo III (SST3) que media en el transporte al interior de la célula intestinal de

proteínas efectoras necesarias para la invasión de las células hospedadoras. Es ubicua entre todas las especies y subespecies de *Salmonella*, por lo que se cree que fue adquirida en un proceso temprano de la evolución de *Salmonella* (Cheng *et al.*, 2019; Hensel, 2004; Lou *et al.*, 2019).

- 2) **Isla de patogenicidad de tipo 2 (SPI-2):** esta isla, de un tamaño también de 40 kb, está compuesta por dos fragmentos que fueron adquiridos independientemente. Uno de 25 kb, el cual sólo se encuentra en *S. enterica* y codifica un SST3 y otro, de 15 kb, que aporta genes que no son necesarios para la función del SST3. Esta isla tiene como función favorecer la supervivencia de la bacteria en el interior de células epiteliales y macrófagos, por lo que es indispensable para causar infecciones sistémicas y permitir la multiplicación de la bacteria en el órgano hospedador (Fookes *et al.*, 2011; Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000; Martínez, 2007).
- 3) **Isla de patogenicidad de tipo 3 (SPI-3):** es una inserción de tamaño variable (17-36 kb). Esta isla, distribuida en las especies *S. bongori* y *S. enterica*, muestra en el operón *mgtCB*, un sistema de alta afinidad por el ión Mg^{2+} , que permite a la bacteria adaptarse a las limitaciones nutricionales del hábitat intracelular. Existen variaciones estructurales en la zona adyacente a *se/C*, donde se han encontrado tanto inserciones como deleciones, sugiriendo éste como una posible zona de integración de DNA exógeno (Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000). Esta isla está implicada tanto en la supervivencia intracelular como en la colonización intestinal (Cheng *et al.*, 2019; Kaur y Jain, 2012).
- 4) **Isla de patogenicidad de tipo 4 (SPI-4):** su tamaño es de 25 kb. Es una estructura mosaico formada a partir de múltiples procesos de captación de DNA exógeno. Se cree que puede portar un sistema de secreción de tipo 1 (SST1) implicado en la liberación de toxinas (Hensel, 2004; Marcus *et al.*, 2000). Algunos autores destacan su implicación en la adhesión e invasión epitelial, y en la virulencia en ratones y vacas y se han localizado en algunas subespecies de *S. enterica* y en *S. bongori* (Fookes *et al.*, 2011).

Introducción y Antecedentes

- 5) **Isla de patogenicidad de tipo 5 (SPI-5):** es un locus de tamaño variable (11-44 kb). Esta isla codifica algunas proteínas efectoras como SopB, PipA, PipB o PipC que son traslocadas a través de los sistemas de secreción SPI-1-SST3 y SPI-2-SST-3. La región correspondiente a los genes *sopB* y *pipC* se encuentra altamente conservada y presente tanto en *S. bongori* como en *S. enterica*; sin embargo, la región *pipAB* está ausente tanto en *S. bongori* como en *S. enterica* subsp. *salamae*. Es posible que ambas regiones hayan sido adquiridas de manera independiente (Hensel, 2004; Schmidt y Hensel, 2004). Algunos autores han descrito su implicación en la colonización en pollos, dando lugar al desarrollo de la salmonelosis entérica mediante la invasión epitelial (Cao *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2019).
- 6) **Otras Islas de patogenicidad:** entre el resto de islas de patogenicidad descritas, destacan, por su implicación en procesos de colonización y virulencia en pollos, la SPI-6, SPI-10, SPI-13, SPI-14 y SPI-19 (Cheng *et al.*, 2019). La mayoría de las islas de patogenicidad se encuentran muy conservadas en el género *Salmonella* y parecen haber sido adquiridas mediante procesos de transferencia horizontal seguidos de reorganizaciones en la estructura. Los procesos de transferencia horizontal junto con la presencia de plásmidos que codifican factores de virulencia dan lugar a un mecanismo de dispersión de factores de resistencia y de virulencia.
- 7) **Islotes de patogenicidad y genes sueltos.** No todos los genes de virulencia que necesita *Salmonella* se encuentran agrupados en islas de patogenicidad, sino que existe una amplia variedad de ellos que se localizan en pequeños loci denominados islotes. Su contenido en GC, al igual que el de las islas de patogenicidad, también es menor, por lo que se cree que también fueron adquiridos a través de procesos de transferencia horizontal (Groisman *et al.*, 1999).

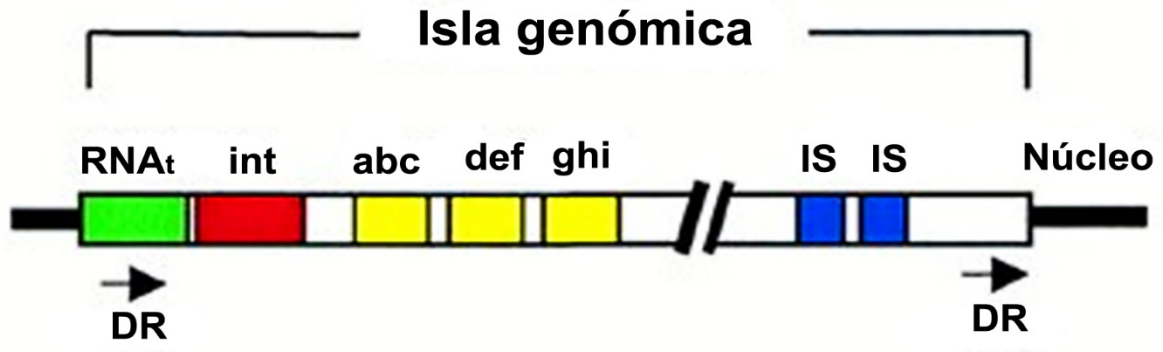


Figura 2. Esquema de una isla genómica bacteriana (Adaptada de Hacker y Carniel, 2001).

Abreviaturas: *int*, gen integrasa; *abc*, *def* y *ghi*, genes que codifican funciones específicas; IS, elemento de secuencia de inserción; DR (RD, repeticiones directas).

1.4.2. Plásmidos de virulencia.

Los plásmidos de virulencia son estructuras en las cuales podemos encontrar genes codificantes de proteínas involucradas en el proceso infectivo de *Salmonella*. Hasta el momento se han encontrado en determinados serotipos, todos ellos pertenecientes a *S. enterica* subsp. *enterica*, de tamaño y contenido genético variable, aunque existen regiones más o menos comunes en todos los tipos de plásmidos (Rychlik *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2017; Van Asten y Van Dijk, 2005). Además, el transporte del plásmido no es ubicuo entre todos los aislamientos de un serovar determinado, y las células que llevan el plásmido generalmente exhiben una mayor virulencia. El mediador de este aumento de virulencia es el operón *spvRABCD*, cuyos efectores alteran el citoesqueleto de la célula hospedadora para mejorar la supervivencia bacteriana (Cheng *et al.*, 2019).

Existen plásmidos denominados “híbridos”, que albergan tanto genes de virulencia como genes de resistencia a los antibióticos, los cuales suponen un grave problema en la diseminación conjunta de este tipo de factores mediante transferencia horizontal (Guerra *et al.*, 2002; Partridge *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2020).

2. Carne y preparados cárnicos

2.1. Principales definiciones

A continuación, se incluyen algunas de las definiciones de mayor interés relacionadas con la carne y productos cárnicos (Reglamento (CE) N° 853/2004, DOUE n° 139 –de 30-04-2004-) así como varias definiciones de interés en relación con las canales y cortes de las aves de corral (Reglamento (CE) N° 543/2008, DOUE n° L157, -de 17-06-2008-).

- **Canal:** cuerpo de un animal una vez sacrificado y faenado.
- **Carne fresca:** carne que no se ha sometido a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la envasada al vacío o en atmósfera controlada.
- **Despojos:** carne fresca que no sea de la canal, incluidas las vísceras y la sangre.
- **Carne picada:** carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1 % de sal.
- **Carne separada mecánicamente:** el producto obtenido extrayendo la carne de los huesos carnosos después del deshuesado, o de las canales de las aves, por medios mecánicos que ocasionan la pérdida o alteración de la estructura de la fibra muscular.
- **Derivados cárnicos:** productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o menudencias de los animales citadas en el punto 1.1 del anexo I del Reglamento (CE) N° 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 (por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal) y sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo. Serán preparados o productos cárnicos según lo establecido en la normativa comunitaria de aplicación.
- **Preparados de carne:** carne fresca, incluida la troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que se ha sometido a transformaciones que no alteran la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, eliminan las características de la carne fresca. Es un producto con cierto

grado de elaboración pero que, aun así, mantiene un aspecto similar a la carne fresca.

2.2. Principales definiciones en aves de corral domésticas (*Gallus domesticus*).

- **Pollo (de carne):** ave de corral en la que la extremidad del esternón es flexible (no osificada).
- **Gallo y gallina:** aves de corral en las que la extremidad del esternón es rígida (osificada).
- **Capón:** pollo macho castrado quirúrgicamente antes de haber alcanzado la madurez sexual y sacrificado a una edad mínima de 140 días; una vez castrados, los capones deberán pasar un período mínimo de engorde de 77 días.
- **Pollito:** pollo de peso inferior a 650 gramos de peso canal (expresado sin menudillos, cabeza ni patas). Los pollos de 650 a 750 gramos podrán denominarse «pollitos» si su edad en el momento del sacrificio no excede de 28 días.
- **Gallo joven:** pollo macho de estirpe ponedora en el que la extremidad del esternón es rígida pero no completamente osificada y cuya edad mínima de sacrificio es de 90 días.

En la carne de estos animales los principales tipos de cortes realizados serían los que se enumeran a continuación:

- **Medio:** media canal, obtenida por corte longitudinal siguiendo el plano de simetría que pasa por el esternón y la columna vertebral.
- **Cuarto:** cuarto trasero o delantero obtenido por corte transversal de un medio.
- **Cuartos traseros unidos:** ambos cuartos traseros unidos por una porción de lomo.
- **Pechuga:** el esternón y las costillas, o parte de éstas, distribuidas a ambos lados del mismo, con la musculatura que los envuelve, tanto si la pechuga se presenta entera o partida por la mitad.

Introducción y Antecedentes

- **Muslo y contramuslo:** el fémur, la tibia y el peroné con la musculatura que los envuelve. Los dos cortes se harán por las articulaciones.
- **Cuarto trasero de pollo:** la porción de espalda que no sobrepase el 25% del peso del corte.

2.3. Producción de carne

La producción de carne en el mundo ha experimentado un crecimiento moderado en los últimos años. Asia destaca como mayor productor de carne, seguido de América y Europa, siendo África un productor más moderado que los continentes anteriormente citados. En la Tabla 1 se puede observar la producción de carne a nivel mundial durante el período 2009-2016 (FAOSTAT, 2018).

Tabla 1. Producción de carne en el mundo (FAOSTAT, 2018).

| | AÑOS | | | | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|----------------|
| PRODUCCIÓN EUROPEA (MILLONES DE TONELADAS) | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
| CARNE DE AVES DE CORRAL | 94,75 | 99,27 | 103,26 | 106,97 | 110,40 | 113,30 | 116,41 | 120,30 |
| CARNE DE POLLO | 83,030 | 87,206 | 90,876 | 94,083 | 97,600 | 100,670 | 103,801 | 107,143 |
| CARNE DE PORCINO | 106,15 | 108,97 | 109,63 | 113,13 | 115,11 | 117,26 | 117,88 | 118,17 |
| CARNE DE VACUNO | 62,88 | 63,13 | 62,96 | 63,58 | 64,74 | 65,28 | 64,96 | 65,97 |
| CARNE DE OVINO-CAPRINO | 13,48 | 13,53 | 13,60 | 13,80 | 14,15 | 14,53 | 14,79 | 14,93 |
| CARNE TOTAL | 286,58 | 294,60 | 299,39 | 307,43 | 314,46 | 320,52 | 324,36 | 329,89 |

Los principales productores de carne en el ámbito mundial son China, EE.UU., Brasil y Alemania. Por lo que respecta a las especies, la carne de aves de corral, con 120 millones de toneladas, es la que ocupa el primer lugar, siendo los principales productores EE.UU. (17,9% de la producción mundial), China (15%), Rusia (3,4%) e India (2,8%). La Unión Europea en conjunto representa el 17,2% de la producción mundial, teniendo España una producción del 1,18%. Dentro de las carnes de ave de corral destaca la producción de carne de pollo, con una producción de 107 millones de toneladas, lo que supone un 89,1% dentro de la producción de aves de corral y un 32,5% dentro de la producción

total de carne, como puede observarse en las Figuras 3-5. Los principales productores de carne de pollo a nivel mundial son EE.UU. (17,5%), Brasil (13%), China (12%) y Rusia (4%). Se debe destacar que, aunque el primer productor es EE.UU., el mercado mundial está dominado por Brasil, que destina mayor cantidad de producto a la exportación. La Unión Europea representa el 11,1% de la producción mundial de carne de pollo, teniendo España una producción del 1,6%. Es de destacar la producción de carne de porcino, con 118,17 millones de toneladas en 2016, siendo los principales productores China (45,8% de la producción mundial), EE.UU. (9,6%), Alemania (4,7%) y España (3,3%) (datos del año 2016; FAOSTAT, 2018). Desde el año 2013 hasta la actualidad la producción de carne a nivel mundial ha cambiado ya que, en dicho año, en el análisis por especies realizado, la carne de cerdo destacaba en primer lugar con una producción de 115 millones de toneladas, estando la producción de carne de aves de corral en segundo lugar con una producción de 110 millones de toneladas (datos del año 2013; FAOSTAT, 2015; MAPA, 2020).

La evolución de la producción de carne de pollo a nivel mundial puede observarse en la Figura 3, en la que se refleja el porcentaje promedio del periodo 1993-2016. Por continentes, destaca como mayor productor de este tipo de carne América, con una producción del 32,2%, seguida de Asia, con un porcentaje del 23,4%, el tercer lugar lo ocupa Europa con un 12,1%, el cuarto África, con un 3,6% y, por último, Oceanía, con una producción del 0,9%.

Introducción y Antecedentes

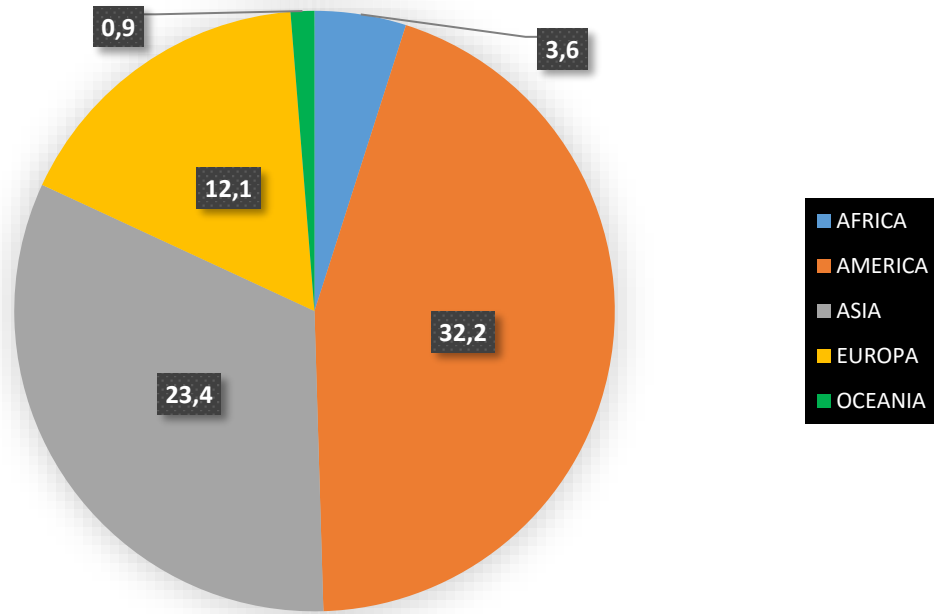


Figura 3. Proporción de producción de carne de pollo por región. Promedio 1993 – 2016 (FAOSTAT, 2018).

La producción de carne en Europa ha aumentado en los últimos años (periodo 2009-2016), como puede observarse en la Tabla 2, hasta alcanzar los 47 millones de toneladas en el año 2016. El primer lugar lo ocupa la carne de cerdo con una producción de 23 millones de toneladas, seguido de la carne de pollo con 12 millones de toneladas, lo que supone un 85,2% dentro de la producción de aves de corral y un 25,1% dentro de la producción total de carne, como puede observarse en las Figuras 4 y 5. Dentro de la Unión Europea destaca Polonia como primer productor de carne de pollo con un 16,7% de la producción, seguido del Reino Unido con una producción del 13,4%. Con un 10,3% de la producción total de carne de pollo España es el tercer productor europeo, por detrás de Polonia y del Reino Unido.

Tabla 2. Producción de carne en la Unión Europea (FAOSTAT, 2018).

| PRODUCCIÓN EUROPEA (MILLONES DE TONELADAS) | AÑOS | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
| <i>CARNE DE AVES DE CORRAL</i> | 11,67 | 12,07 | 12,34 | 12,84 | 12,89 | 13,50 | 13,93 | 14,51 |
| <i>CARNE DE POLLO</i> | 9,40 | 9,67 | 9,90 | 10,31 | 10,48 | 11,03 | 11,42 | 11,92 |
| <i>CARNE DE PORCINO</i> | 22,32 | 22,98 | 23,26 | 22,84 | 22,53 | 22,61 | 23,47 | 23,62 |
| <i>CARNE DE VACUNO</i> | 7,98 | 8,15 | 8,05 | 7,71 | 7,40 | 7,45 | 7,69 | 7,88 |
| <i>CARNE DE OVINO-CAPRINO</i> | 1,04 | 1,00 | 1,01 | 0,98 | 0,97 | 0,91 | 0,91 | 0,88 |
| <i>CARNE TOTAL</i> | 43,62 | 44,81 | 45,28 | 45,00 | 44,40 | 45,09 | 46,58 | 47,47 |

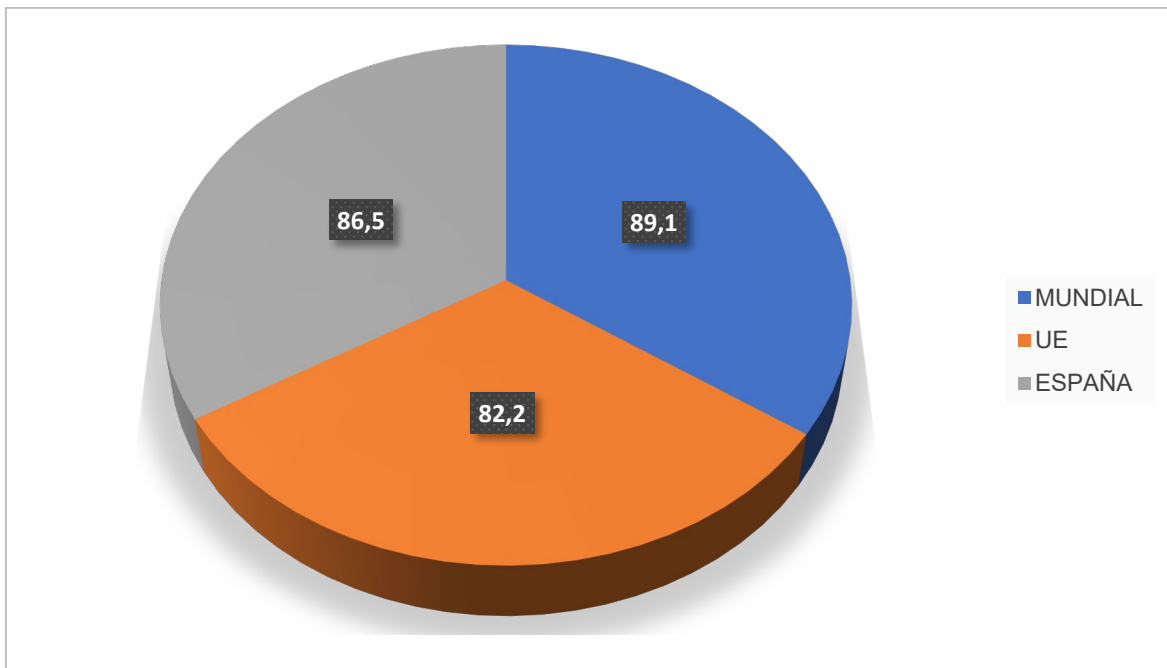


Figura 4. Porcentaje de carne de pollo dentro del total de carne de aves de corral a nivel mundial, en la UE y en España (FAOSTAT 2018).

Introducción y Antecedentes

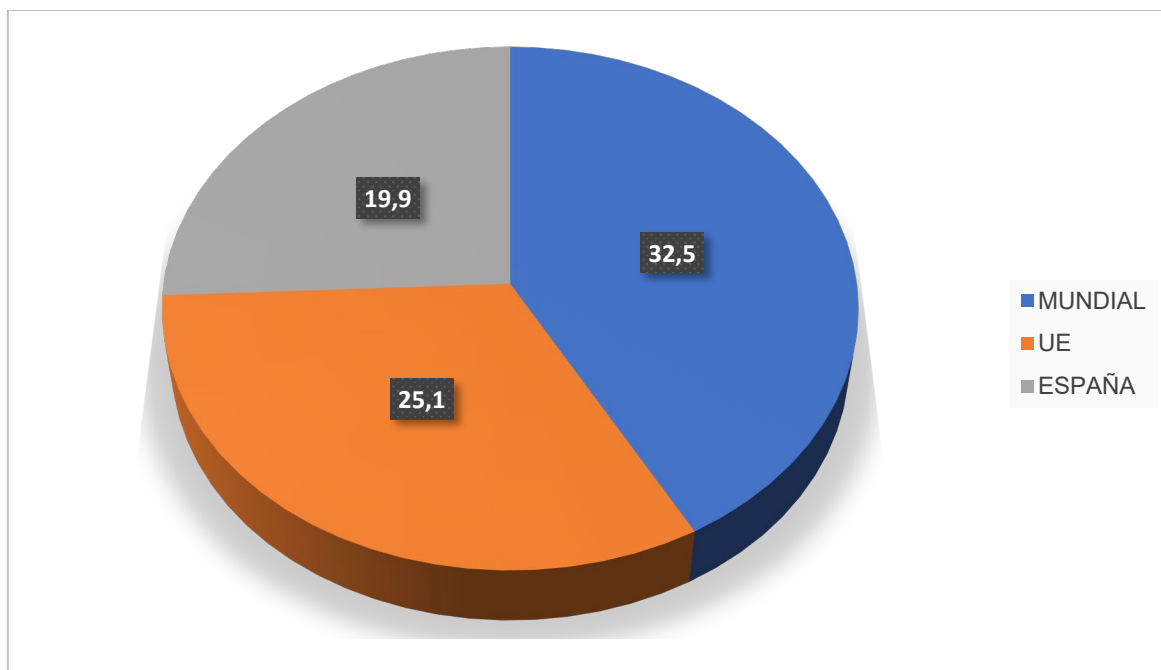


Figura 5. Porcentaje de producción de carne de pollo dentro del total de la carne producida a nivel mundial, en la UE y en España (FAOSTAT, 2018).

En España la producción de carne de ganado porcino es la primera actividad cárnica (Tabla 3) y representa el 63,8% de la producción total de carne en el año 2016. España se consolida en estos últimos años como el cuarto mayor productor de carne de porcino del mundo y primer productor dentro de la Unión Europea, con una producción del 16,71%.

Tabla 3. Producción de carne en España (FAOSTAT, 2018).

| PRODUCCIÓN ESPAÑA (MILLONES DE TONELADAS) | AÑOS | | | | | | | |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | 2015 | 2016 |
| <i>CARNE DE AVES DE CORRAL</i> | 1,21 | 1,25 | 1,36 | 1,37 | 1,28 | 1,37 | 1,37 | 1,43 |
| <i>CARNE DE POLLO</i> | 1,18 | 1,12 | 1,21 | 1,19 | 1,12 | 1,21 | 1,20 | 1,23 |
| <i>CARNE DE PORCINO</i> | 3,29 | 3,37 | 3,47 | 3,47 | 3,43 | 3,56 | 3,85 | 3,95 |
| <i>CARNE DE VACUNO</i> | 0,60 | 0,61 | 0,60 | 0,59 | 0,58 | 0,59 | 0,63 | 0,63 |
| <i>CARNE DE OVINO-CAPRINO</i> | 0,13 | 0,14 | 0,14 | 0,13 | 0,13 | 0,12 | 0,12 | 0,12 |
| <i>CARNE TOTAL</i> | 5,31 | 5,44 | 5,66 | 5,65 | 5,50 | 5,72 | 6,06 | 6,20 |

La segunda actividad cárnica mayoritaria en España es la carne de aves de corral, con una producción de 1,43 millones de toneladas, dentro de ellas la producción de carne de pollo supone un 82,2% de la producción de aves de corral y un 25,1% de la producción total de carne, como puede observarse en las Figuras 4 y 5 (FAOSTAT, 2018).

La mayor parte de la producción de carne de pollo se concentra en cuatro comunidades autónomas: Cataluña, con el 28,7% del total nacional, Comunidad Valenciana, con un 16,9% del total, Andalucía, con un 15,8%, y Galicia, con un 13,1%.

La evolución productiva de la carne de pollo tiende a la estabilización en torno al millón de toneladas, con un ligero déficit de abastecimiento que se cubre, fundamentalmente, con importaciones procedentes de los países del entorno comunitario (MAPA, 2020).

La carne de vacuno ocuparía el tercer lugar con el 10% de la producción nacional seguida por la carne de ovino-caprino, con una producción del 1,2%. Estos tipos de carne han sufrido una tendencia descendente en los últimos años (datos del año 2016; FAOSTAT, 2018).

2.4. Consumo de carne

La carne y los productos cárnicos contribuyen significativamente a la ingesta de energía, proteínas e importantes micronutrientes, al menos cuando se consumen con frecuencia, aunque el consumo de los alimentos derivados de animales es muy variable, tanto entre poblaciones como dentro de las mismas (De Smet y Vossen, 2016; McAfee *et al.*, 2010; Millward y Garnett, 2010). El consumo per cápita de carne en España se sitúa en 50,13 kilos por persona y año. Desde el año 2012 se ha producido una disminución constante en la demanda de carne, siendo la carne fresca (incluye: carne de vacuno, carne de pollo, carne de ovino / caprino, carne de cerdo, carne de conejo, otras carnes frescas) la principal responsable de esta disminución (MAPA, 2020).

Desde el año 2012 la carne de pollo y de vacuno son las que más han visto reducido su consumo, aunque el del resto de tipos de carne también ha

Introducción y Antecedentes

disminuido en este periodo. El consumo per cápita de carne fresca durante el año 2016 fue de 37,11 kilos por persona y año, permaneciendo estable respecto a 2015 (FAOSTAT, 2018; MAPA, 2020).

Mientras que el consumo de carne per cápita en los países desarrollados es alto, aproximadamente 76 kg por persona y año, en los países en desarrollo el consumo de carne per cápita es de aproximadamente 33 kg/persona y año. Se estima que la demanda de los alimentos derivados de animales y la carne en particular tendrá en las próximas décadas una tendencia creciente, sobre todo en los países en vías de desarrollo, mientras que en los países desarrollados el consumo de carne podría estancarse o incluso disminuir (De Smet y Vossen, 2016; FAO, 2009). El crecimiento demográfico constante y el aumento de los ingresos generan una mayor demanda de carne, pero al mismo tiempo dejan un espacio limitado para la expansión de la producción pecuaria. En consecuencia, hacer el máximo uso de los recursos alimentarios existentes es cada vez más importante. La carne de aves de corral está cobrando cada día mayor importancia para satisfacer esta demanda (FAO, 2014).

2.5. Calidad de la carne de pollo

La producción a nivel industrial de aves de corral es diversa; hay varios sistemas básicos de producción: canales y subproductos, huevos de mesa y ovoproductos. Se utilizan varias especies para la producción industrial, en función del producto final que se desea obtener. En España destacan, por su importancia, los pollos de engorde de la especie *Gallus gallus* (Farrell, 2013).

Dicha producción se basa en la selección de líneas puras en base a criterios de producción específicos como productividad, calidad y resistencia a las enfermedades, que varían en función del tipo de producción (Vaarst *et al.*, 2015).

2.5.1. Composición nutricional de la carne de pollo

La carne de aves de corral comprende una porción sustancial de la dieta española. De hecho, el consumo de aves de corral ha aumentado de manera

constante, siendo más elevado su consumo que el de la carne de vacuno (FAO/STAT, 2018). Este aumento en el consumo se puede atribuir a la buena aptitud tecnológica que presentan estos tipos de carne, lo cual permite la elaboración de productos cárnicos diversos. Además, su bajo contenido en grasa (si se consume sin piel) y su fácil digestibilidad convierten al pollo en un alimento apto para cualquier tipo de dieta de adelgazamiento o dirigida a ancianos y niños (Bohrer, 2017).

La carne de pollo tiene como componente mayoritario, en un 70%, aproximadamente, al agua; además se considera una fuente de proteínas de alta calidad debido a su contenido en aminoácidos esenciales. Puede considerarse una carne magra, sobre todo cuando se consume sin piel, donde reside una parte importante de la grasa. Es una carne blanda y de muy buena digestibilidad, presenta un perfil lipídico más saludable que el de otros tipos de carne, por contener una mayor proporción de ácidos grasos insaturados frente a los saturados. Además, es una excelente fuente de varios minerales y vitaminas (ácido fólico, B12) y no contiene hidratos de carbono. Asimismo, posee elevadas cantidades de hierro y de zinc, aunque su contenido es menor que en el caso de la carne roja (Milićević *et al.*, 2014; Pereira y Vicente, 2013). Las actuales recomendaciones nutricionales aconsejan el consumo de 3 a 4 raciones a la semana de carnes magras, alternando el consumo entre distintos tipos, entre los que está el pollo.

A pesar de que su consumo ha aumentado en los últimos años, la presencia de microorganismos patógenos y alterantes en este tipo de carne sigue siendo un motivo de preocupación desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria.

2.5.1. Carne de pollo y seguridad alimentaria. Epidemiología

Los brotes alimentarios más frecuentes relacionados con la carne de pollo se producen por la acción de varios microorganismos patógenos, entre los que se encuentran *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes*. Las poblaciones bacterianas en las canales de pollo están determinadas por la microbiota del tracto gastrointestinal de las aves en la granja, así como de las

Introducción y Antecedentes

bacterias que se agregan cuando se maneja el ave durante su sacrificio y procesado (Heredia y García, 2018; Thames y Sukumaran, 2020).

En 2018 los Estados Miembros de la Unión Europea notificaron 91.857 casos confirmados de salmonelosis. La tasa de notificación de la UE estaba en el mismo nivel que en los últimos cinco años. Durante el período 2012-2016 no se ha podido demostrar una tendencia clara en la evolución de los casos de salmonelosis humana (siete Estados Miembros informaron de una tendencia creciente y cuatro de una tendencia decreciente). En la Figura 6 se muestra la evolución del número de casos de salmonelosis en España según datos del Sistema de Información Microbiológica (SIM).

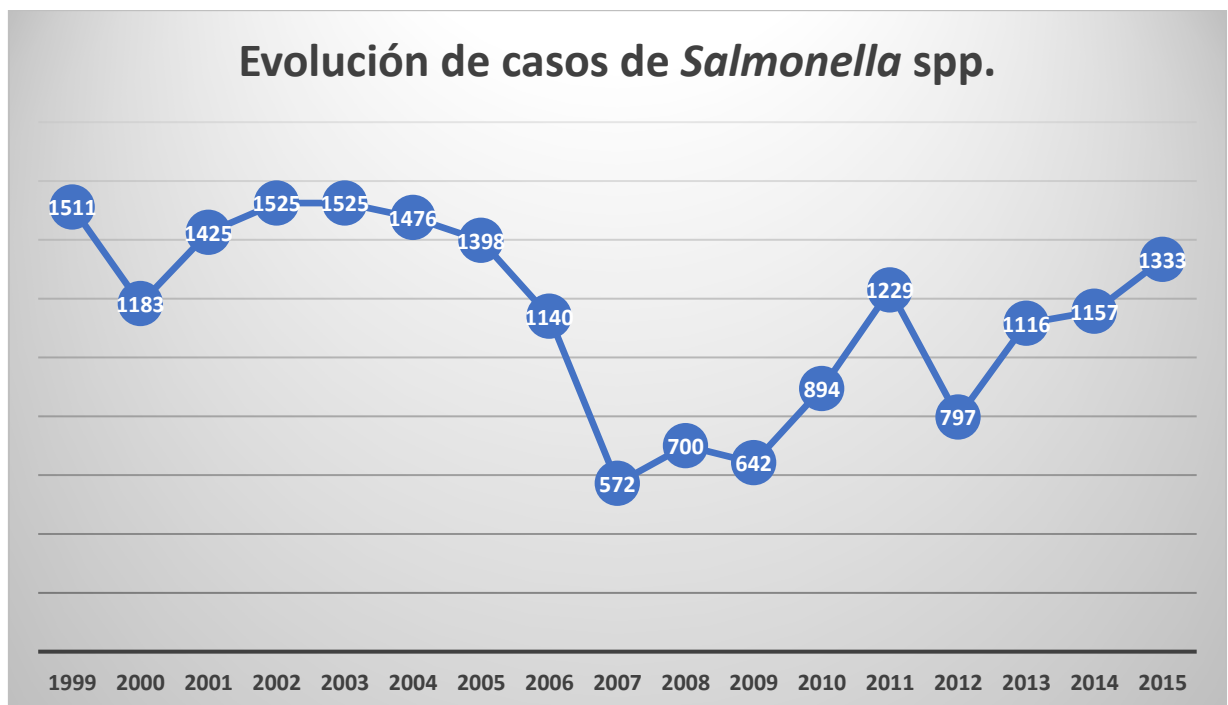


Figura 6. Evolución de los casos de *Salmonella* notificados al Sistema de Información Microbiológica (SIM, 2016).

Los cinco serotipos notificados con mayor frecuencia en casos de salmonelosis humana en la Unión Europea durante 2016 fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante monofásica 1,4,[5],12:i:-, *S. Infantis* y *S. Newport* (Figura 7).

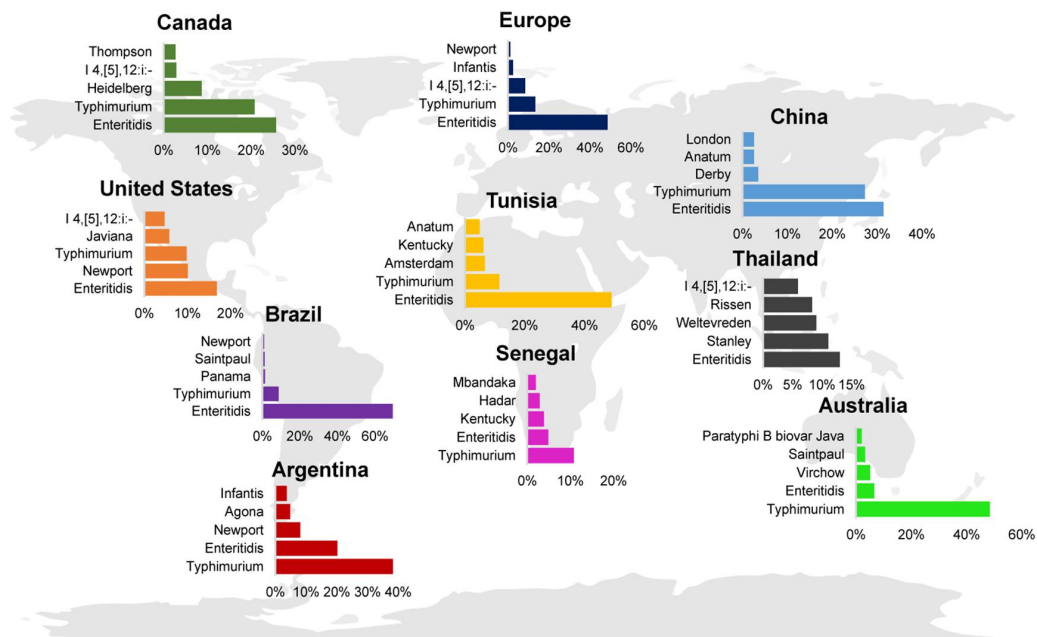


Figura 7. Distribución global de los cinco serovares principales asociados con la enfermedad clínica humana. Los gráficos de barras representan los 5 principales serovares no tifoideos (NTS, es decir, el serovar *S. Typhi* fue excluido) (Cheng *et al.*, 2019).

Los casos de *S. Enteritidis* se asociaron mayoritariamente con gallinas ponedoras, pollos de engorde y carne de pollo de engorde. *S. Typhimurium* se detectó en mayor proporción en cerdos y carne de cerdo y en menor medida en carne y aves de corral. Los casos provocados por la variante monofásica de *S. Typhimurium* se mantuvieron estables y se asociaron principalmente al cerdo y su carne.

Los casos de salmonelosis humana provocados por *S. Infantis*, el cuarto serovar más común en humanos, también se mantuvieron estables. Se detectó principalmente a lo largo de la cadena de producción de pavos y pollos de engorde. Este serovar representa un importante problema de Salud Pública debido a sus altos niveles de resistencia a múltiples fármacos. *S. Newport*, el quinto serovar más frecuente entre los casos de infecciones humanas dentro de la Unión Europea, fue mayoritariamente aislado en pavos, carne de pavo y bovino.

Introducción y Antecedentes

Los datos de monitorización de 2016 relacionados con el cumplimiento de los alimentos con los criterios de seguridad alimentaria de *Salmonella* mostraron que, como en los años anteriores, se informó el nivel más alto de incumplimiento para determinadas categorías de carne destinadas a ser consumidas cocinadas (carne separada mecánicamente, carne picada y preparados y productos cárnicos de aves de corral).

El control de *Salmonella* en los alimentos se basa principalmente en datos que se derivan de la notificación obligatoria de los estados miembros según el Reglamento 2073/2005 de la UE sobre criterios microbiológicos que es de aplicación desde el 1 de enero de 2006 (DOUE nº L338, 22-12-2005). En general, los datos recogidos por la EFSA para el cumplimiento de los criterios microbiológicos de *Salmonella* permiten hacer resúmenes descriptivos a nivel de la Unión Europea, y también permiten la monitorización de las tendencias de la Unión Europea (EFSA-ECDC, 2017).

Aunque los resultados de los estudios tanto europeos como nacionales indican la efectividad de las medidas de control de *Salmonella*, este patógeno continúa siendo una de las causas principales de enfermedades gastrointestinales de transmisión alimentaria, además de observarse que no todos los serotipos responden igual que *S. Enteritidis* ante las medidas de control. Es necesaria una continua vigilancia y estudio de los diferentes serotipos de *Salmonella*, así como la búsqueda de nuevas estrategias que permitan un mejor control de estas infecciones.

3. Antimicrobianos usados en la industria alimentaria

La disponibilidad y el uso de antimicrobianos en la Industria Alimentaria son fundamentales para la salud y la productividad, ya que estos compuestos se emplean con el fin de mejorar la eficiencia de los sistemas y de garantizar la calidad y seguridad de los productos, evitando así la aparición de enfermedades de origen alimentario, al contribuir a la seguridad alimentaria y el bienestar animal. No obstante, existe una creciente preocupación a nivel mundial por la aparición de resistencias a los antimicrobianos, debido a que pueden disminuir

o invalidar los beneficios que dichos compuestos producen (OMS, 2016; Rodríguez-Sauceda, 2011).

Los antimicrobianos alimentarios son compuestos químicos que retardan el crecimiento o causan la muerte de los microorganismos, aumentando así tanto la vida útil del producto como su seguridad. Los blancos principales de los agentes antimicrobianos son los microorganismos productores de intoxicaciones e infecciones alimentarias y los microorganismos alterantes de los alimentos, cuyos productos metabólicos finales o enzimas causan malos olores, sabores desagradables, problemas de textura, cambios de coloración o riesgo sanitario (Davidson *et al.*, 2015).

El concepto de antimicrobiano se usa ampliamente y se utiliza de manera general para hacer referencia al conjunto de agentes o sustancias que ejercen su acción frente a los microorganismos, podemos clasificarlos en: antibióticos, fungicidas y biocidas.

En la Tabla 4 se muestran los principales compuestos antimicrobianos empleados en la Industria Agroalimentaria.

3.1. Compuestos biocidas

El término biocida se refiere, en términos generales, a todos los productos químicos (desinfectantes y antisépticos, fungicidas, alguicidas, raticidas e insecticidas), y agentes físicos biológicos (bacteriófagos y bacterias) que se utilizan para inactivar organismos patógenos (Paul *et al.*, 2019). Los biocidas se han utilizado de manera empírica durante siglos de diversas formas, como, por ejemplo, el uso de recipientes de cobre y plata para el almacenamiento de agua potable, o de vinagre, sal y especias para conservar el pescado y la carne. Hoy en día existe una amplia gama de compuestos que muestran diferentes niveles de actividad (Russell, 2002) y se han vuelto muy populares en el control no específico de microorganismos en una variedad amplia de condiciones ambientales, que van desde la Industria Alimentaria hasta el saneamiento, lo cual ha generado mucha preocupación sobre el uso extensivo de biocidas, ya que la adaptación bacteriana tras la exposición a biocidas puede aumentar la resistencia a los antibióticos (Fernández Márquez *et al.*, 2017; Ortega Morente *et al.*, 2013).

3.1.1. Definición e Importancia

Los biocidas se definen como sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios físicos, químicos o biológicos.

3.1.2. Biocidas de uso alimentario: fosfato trisódico (FTS), nitrito sódico (NS) e hipoclorito sódico (HIP)

En el presente trabajo de investigación se abordan dos aditivos alimentarios, el fosfato trisódico y el nitrito sódico, y un compuesto desinfectante, el hipoclorito sódico. Los **aditivos alimentarios** pueden definirse como sustancias que se pueden añadir los alimentos de manera intencionada para mantener o mejorar su inocuidad, su frescura, su sabor, su textura o su aspecto. Algunos de ellos se llevan empleando desde hace siglos para conservar alimentos, como ocurre con la sal (en carnes, como el tocino, y en los pescados secos), el azúcar (en las mermeladas) y el dióxido de azufre (en el vino). La utilización de aditivos alimentarios solamente está justificada si responde a una necesidad tecnológica, no induce a error al consumidor y se emplean con una función tecnológica bien definida, como la de conservar la calidad nutricional de los alimentos o mejorar su estabilidad. Se consideran aditivos alimentarios los aromatizantes, preparaciones de enzimas y otros aditivos (conservantes, colorantes y edulcorantes) (FAO, 2017; Inetianbor *et al.*, 2015). La autorización de un aditivo alimentario requiere una evaluación de su seguridad, la cual es realizada por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), en base al Reglamento (CE) N° 1333/2008 (y sus modificaciones posteriores), el cual regula el uso de estos antimicrobianos en la Unión Europea (OJEU, 2008).

Tabla 4. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (Capita y Alonso-Calleja, 2013; SCENIHR, 2009).

| |
|---|
| <p>Antibióticos: sustancias activas usadas a dosis bajas para tratar infecciones en seres humanos, animales o plantas, inhibiendo el crecimiento (agentes bacteriostáticos) o destruyendo (agentes bactericidas) las bacterias sensibles (toxicidad selectiva); dichas sustancias pueden ser de origen natural (p. ej., penicilina), semisintético (p. ej., metilicina) o sintético (p. ej., sulfamidas). Los antibióticos se emplean también en animales productores de alimentos con el objetivo de prevenir o controlar enfermedades infecciosas y, en algunos países, como promotores del crecimiento, para mejorar el índice de conversión del pienso y la ganancia media diaria de peso.</p> |
| <p>Fungicidas: compuestos químicos empleados para destruir o impedir el crecimiento de los hongos responsables de enfermedades (p. ej., tiabendazol).</p> |
| <p>Biocidas: término general que hace referencia a sustancias activas y a preparaciones que contienen una o más sustancias activas, en la forma en que son suministradas al usuario, destinadas a destruir, contrarrestar, detener la acción de, o ejercer un control sobre cualquier organismo nocivo (amplio espectro) por medios físicos, químicos o biológicos.</p> |
| <p>Aditivos de piensos: sustancias usadas para reducir la presencia de microorganismos patógenos en los piensos y preservar éstos de la alteración microbiana (p. ej., ácido cítrico).</p> |
| <p>Aditivos de alimentos: sustancias usadas para controlar los microorganismos patógenos presentes en los alimentos y prolongar su vida útil protegiéndolos frente al deterioro causado por los microorganismos (p. ej., nitrito sódico).</p> |
| <p>Descontaminantes: biocidas aplicados a la superficie de alimentos frescos (principalmente carne y vegetales) para mejorar su seguridad y retrasar su alteración. Actúan inactivando o inhibiendo el crecimiento de los microorganismos patógenos y alterantes (p. ej., fosfato trisódico).</p> |
| <p>Desinfectantes: biocidas usados para mejorar la higiene a lo largo de la cadena alimentaria. Se aplican habitualmente al aire, aguas residuales, equipos, contenedores, tuberías u otras superficies (incluyendo las manos de los manipuladores) asociadas con la producción, transporte y almacenamiento de alimentos y bebidas (incluyendo agua de bebida). Los desinfectantes se emplean también en producción animal para: 1) limpiar y desinfectar los alojamientos de los animales, así como los vehículos y jaulas utilizados durante su transporte, 2) crear barreras (pediluvios localizados a la entrada de las explotaciones ganaderas, desinfección de materiales durante los brotes de enfermedades infecciosas), 3) desinfectar la superficie de los animales (baños de pezones o limpieza de ubres) y 4) preservar productos específicos, como huevos de peces o semen. Algunos ejemplos de desinfectantes incluyen hipoclorito sódico, compuestos de amonio cuaternario, etanol o formaldehído.</p> |

Introducción y Antecedentes

El **fosfato trisódico** (FTS; Na_3PO_4) es un aditivo alimentario (E-339 iii) empleado en diferentes grupos de alimentos (frutas, carne, lácteos, etc.) como agente regulador del pH, emulsionante y estabilizante, quelante y humectante. Actúa como antioxidante además de presentar un efecto sinérgico con la nisina potenciando su efecto quelante y antimicrobiano (Carocho *et al.*, 2018). La causa del efecto bactericida del fosfato trisódico (FTS) en la carne de ave no se conoce exactamente, pero se cree que puede ser el resultado de la combinación de varios factores. En primer lugar, el elevado pH de las soluciones que forma (Thames y Sukumaran, 2020), desorganizando las moléculas de ácidos grasos de la membrana celular, permitiendo la fuga de fluidos intracelulares. En segundo lugar, su considerable fuerza iónica, que puede provocar autólisis bacteriana. Su capacidad para remover las películas de grasa y su efecto surfactante o detergente contribuye también a la acción antimicrobiana del FTS cuando se usa para la descontaminación de canales de aves y mamíferos (Foley *et al.*, 2008).

El **nitrito sódico** (NS; NaNO_2) es un aditivo alimentario (E-250) ampliamente usado en productos cárnicos para mejorar las propiedades organolépticas (color y sabor) de los productos curados, disminuye la oxidación de los lípidos e inhibe el crecimiento bacteriano (Horsch *et al.*, 2014). Es conocido su uso en el control del crecimiento de *Clostridium botulinum*; sin embargo, deben controlarse de forma estricta sus niveles ya que hay riesgos asociados a su uso, como la formación de nitrosaminas y compuestos potencialmente cancerígenos (Riel *et al.*, 2017). La cantidad máxima autorizada durante la elaboración de los productos cárnicos oscila, dependiendo del producto, entre 100 y 180 mg/kg, siendo la dosis residual máxima permitida de 50-175 mg/kg (OJEU, 2008).

El mecanismo de acción del nitrito se describe a continuación. Cuando se encuentra en un medio ácido, se forma una mezcla compleja de óxido de nitrógeno y ácido nitroso, es decir, el nitrito se protona en condiciones ácidas para generar ácido nitroso, el cual es inestable y se descompone espontáneamente para producir óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). El efecto antimicrobiano del nitrito acidificado se atribuye al óxido de nitrógeno formado, el cual causa alteración y/o inactivación del ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y lípidos de membrana. Además, en condiciones ácidas, la

forma aniónica del ácido nitroso puede disminuir drásticamente el contenido de adenosín trifosfato (ATP) intracelular de los microorganismos al inhibir la enzima glucolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Así, el ácido nitroso puede atravesar por difusión pasiva la membrana plasmática de la célula bacteriana, y, como consecuencia del pH neutro intracelular, el ácido nitroso quedará retenido dentro de la célula en su forma aniónica. Como mecanismo de defensa, la célula bombea los protones al exterior mediante bombas de expulsión (H^+ -ATPasa). Este mecanismo requiere ATP, lo que conduce a una pérdida de energía que dificulta el crecimiento e incluso la supervivencia bacteriana (Mortensen *et al.*, 2008; Mühlig *et al.*, 2014).

El concepto de **desinfectante** se recoge en la Tabla 4. El Reglamento (UE) N° 528/2012 regula los diferentes aspectos de los desinfectantes en la Unión Europea (OJEU, 2012).

El **hipoclorito sódico** (HS; NaClO) es un agente antimicrobiano de uso frecuente y ampliamente utilizado en la industria alimentaria, ya que es un biocida eficaz para el tratamiento de la contaminación microbiana, es fácil de manejar, económico y efectivo en la inactivación de los microorganismos (Guo *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2016). Este compuesto es conocido comúnmente como “lejía” y se define como “las soluciones de hipoclorito alcalino, tal y como se producen por la industria, incluyan o no los aditivos necesarios para su puesta en el mercado, siendo su contenido en cloro activo no inferior a 35 gramos por litro ni superior a 100 gramos por litro” (BOE, 1993). La concentración de hipoclorito de sodio comúnmente utilizada para la mayoría de los productos varía de 50 a 200 ppm (Guo *et al.*, 2020).

El HS está aprobado para su uso en el Espacio Económico Europeo (EEE) y Suiza para usos diversos, entre los que se incluyen la desinfección de áreas de alimentos y piensos (tipo de producto 4). Según el Reglamento Europeo (UE) 2017/1273, el cloro activo liberado por HS está aprobado como sustancia activa para uso en biocidas de los tipos 1 (biocidas para la higiene humana), 2 (desinfectantes para áreas privadas y salud pública), 3 (biocidas para la higiene veterinaria), 4 (desinfectantes de zonas de alimentos y piensos) y 5 (desinfectante de agua potable), cuando la concentración de cloro activo en la

Introducción y Antecedentes

solución acuosa es $\leq 18\%$ (es decir, ≤ 180.000 ppm) (Capita *et al.*, 2019; ECHA, 2019).

El hipoclorito sódico presenta las siguientes propiedades: actúa como un solvente orgánico degradando los ácidos grasos, transformándolos en sales de ácidos grasos (jabón) y glicerol (alcohol), lo cual reduce la tensión superficial de la solución (reacción de saponificación). Por otra parte, neutraliza los aminoácidos formando agua y sal (reacción de neutralización). Con la liberación de iones hidroxilo, tiene lugar una reducción de pH. El ácido hipocloroso, una sustancia presente en la solución de hipoclorito sódico, cuando está en contacto con tejido celular actúa como un solvente, liberando cloro, el cual, combinado con el grupo amino de las proteínas, forma las cloraminas (reacción de cloración) las cuales interfieren en el metabolismo celular. El cloro liberado, al ser un oxidante fuerte, va a provocar una acción antimicrobiana inhibiendo las enzimas bacterianas. El ácido hipocloroso (HOCl) en combinación con los iones hipoclorito (OCl^-) provoca la degradación e hidrólisis de aminoácidos (Estrela *et al.*, 2002).

La actividad antimicrobiana del hipoclorito de sodio se basa en su pH elevado (acción de iones hidroxilo), y exhibe un mecanismo de acción similar al hidróxido de calcio. Estos valores de pH elevado interfieren en la integridad de la membrana citoplasmática, provocando una inhibición enzimática irreversible, alteraciones biosintéticas en el metabolismo celular y destrucción de fosfolípidos debida a la peroxidación lipídica. La reacción de cloración de aminoácidos da lugar a la formación de cloraminas que interfieren en el metabolismo celular. La oxidación promueve la inhibición enzimática irreversible de bacterias reemplazando hidrógeno por cloro. Esta inactivación enzimática se puede observar tras producirse la reacción del cloro con los grupos amino (NH_2^-) y la oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilo ($-\text{SH}$) de las enzimas bacterianas (cisteína).

Por lo tanto, el hipoclorito de sodio presenta actividad antimicrobiana actuando sobre enzimas esenciales para la célula, promoviendo la inactivación irreversible originada por los iones hidroxilo y por la reacción de cloración (Estrela *et al.*, 2003) y dando lugar a una oxidación proteica de las bacterias originando su muerte (Gomes *et al.*, 2016). La contaminación de la carne con determinadas

bacterias suele producirse durante su procesado en el matadero y, para prevenir tales contaminaciones, se suele utilizar hipoclorito de sodio. Sin embargo, el cloro puede reaccionar con la materia orgánica, por lo que su eficacia antimicrobiana se reduce en gran medida (Guo *et al.*, 2020; Hatanaka *et al.*, 2020).

3.1.3. Mecanismos de acción de los biocidas.

A diferencia de los antibióticos, que actúan sobre un lugar diana específico, la mayoría de los biocidas tienen más de un sitio de acción, aunque cuando se utilizan a bajas concentraciones o a concentraciones subinhibitorias la acción del biocida puede reducirse a un único lugar de acción. Si un antimicrobiano se limita a un solo sitio diana y la célula bacteriana mediante un proceso adaptativo bloquea el acceso a ese sitio diana, entonces la resistencia puede surgir (Ortega Morente *et al.*, 2013).

Las bacterias pueden adaptarse rápidamente a diferentes condiciones ambientales y sobrevivir a la exposición a diferentes compuestos antimicrobianos, tales como antibióticos y biocidas, mediante la acción de diversos mecanismos de resistencia. El incremento de la tolerancia a los compuestos biocidas y antibióticos puede estar mediado, principalmente, por el aumento de expulsión de los compuestos mediante las bombas de expulsión, la penetración reducida debido a cambios en la permeabilidad de la membrana y / o producción de biopelículas (Schug *et al.*, 2020).

La comprensión de los mecanismos de acción de los biocidas se ha convertido en un reto importante debido a la posibilidad de que los microorganismos puedan adquirir susceptibilidad reducida a estos compuestos, especialmente cuando se emplean de forma inadecuada, y a la posible vinculación entre la resistencia a antibióticos y a los biocidas (Davidson y Harrison, 2002; Poole, 2002, 2005). La efectividad de los biocidas está relacionada con varios factores tales como su concentración, período de contacto, pH, temperatura, la presencia de materia orgánica, la naturaleza, cantidad, ubicación y condición del microorganismo (bacterias, esporas, levaduras y mohos, protozoos) entre otros, destacando la concentración como

Introducción y Antecedentes

un factor de primordial importancia, habiéndose sugerido que la frecuencia de exposición de las bacterias a dosis subinhibitorias de estos compuestos está directamente relacionada con el incremento de su tolerancia frente a ellos (Russell, 2003). El uso incorrecto de los biocidas está suponiendo un motivo creciente de preocupación en el contexto de la Seguridad Alimentaria. Por otro lado, se ha constatado que las bacterias tienen dificultades para adquirir tolerancia a los biocidas debido a que estos compuestos actúan sobre diferentes *target* o lugares diana en la célula bacteriana (Braoudaki y Hilton, 2004), precisamente lo contrario a lo que ocurre con los antibióticos, que suelen tener un único mecanismo de acción, lo que facilita el desarrollo de resistencias.

Sin embargo, a concentraciones bajas o subinhibitorias, la acción del biocida puede verse limitada a un solo lugar diana y si la célula bacteriana bloquea el acceso a ese *target* durante el proceso de adaptación de la misma, entonces puede surgir resistencia, aunque existe un cierto grado de controversia sobre la capacidad de las bacterias para adquirir resistencia frente a los biocidas, siendo, además, muy limitados los estudios realizados en relación con los compuestos de uso alimentario.

Los mecanismos generales de acción de un biocida se pueden definir en función de la estructura bacteriana contra la que ejercen su actividad principal. Se debe tener en cuenta que un biocida puede desarrollar su actividad en uno o en los tres niveles de interacción en los que las células bacterianas van a producir su actividad antimicrobiana (Ortega Morente *et al.*, 2013). Los tres niveles de interacción se describen a continuación:

a) Interacción con componentes celulares externos.

Existen varios biocidas que pueden interactuar con los componentes celulares externos no afectando a la viabilidad celular. Cuando se produce la interacción del biocida con la célula bacteriana tiene lugar un cambio en la hidrofobicidad celular, es decir, hace que la membrana externa sea menos hidrófoba, lo cual aumenta la posibilidad de que el biocida alcance la membrana citoplasmática o el material citoplásmico provocando la lisis celular. Las bacterias Gram-negativas son generalmente menos sensibles a los biocidas que las bacterias Gram-positivas debido a su membrana externa (Andersen, 2016a). No obstante, existe una gama de sustancias, como los compuestos catiónicos

(como clorhexidina y cloruro de benzalconio) que actúan específicamente sobre la pared bacteriana y la membrana externa, dañándola y favoreciendo la permeabilidad de estos compuestos hasta los lugares diana en la membrana citoplasmática y dentro del citoplasma celular (Gilbert y Moore, 2005).

b) Interacción con la membrana citoplásmica.

La membrana citoplasmática se considera como el principal lugar diana para los biocidas. Se compone de una bicapa fosfolipídica con proteínas integradas, es semipermeable y regula la transferencia de solutos y metabolitos dentro y fuera del citoplasma celular. La interacción con la membrana puede dar lugar a la rotura física de la misma, a la disipación de la fuerza motriz del protón y a la inhibición de la actividad enzimática asociada a la membrana (Andersen, 2016; Ortega Morente *et al.*, 2013).

c) Interacción con constituyentes citoplasmáticos.

El citoplasma bacteriano contiene ácidos nucleicos, ribosomas y varias enzimas con diferentes funciones. Dichos componentes quizá no sean sitios diana primarios para los biocidas, que deben penetrar en la célula para alcanzar los constituyentes citoplasmáticos. Algunos biocidas pueden interactuar con estos componentes celulares, causando un daño reversible o irreversible, pudiendo llegar a provocar la alteración de la estructura fisicoquímica del citoplasma (Andersen, 2016).

d) Interacción con otros componentes celulares.

Varias clases de biocidas van a reaccionar con distintos constituyentes del citoplasma celular aparte de los ácidos nucleicos y los ribosomas, mientras que otros son altamente inespecíficos y van a afectar a una amplia variedad de moléculas celulares. Por ejemplo, los agentes alquilantes y oxidantes son productos químicos altamente reactivos que interactúan con la célula bacteriana (Ortega Morente *et al.*, 2013).

3.1.4. Tolerancia bacteriana a los biocidas

La respuesta bacteriana frente a la acción de los biocidas está esencialmente determinada por la naturaleza del agente químico, así como por el tipo de microorganismo implicado. Existen otros factores que pueden ejercer un efecto considerable sobre la actividad del agente antibacteriano, como la

Introducción y Antecedentes

temperatura de contacto, el pH ambiental y la presencia de materia orgánica. Las estrategias microbianas desarrolladas para resistir los efectos de los antimicrobianos incluyen la formación de biopelículas o biofilms, la reducción de la permeabilidad celular, la expresión incrementada de bombas de expulsión, la modificación o superproducción de los lugares diana o receptores y la adquisición de rutas metabólicas alternativas a las inhibidas por el antimicrobiano.

La resistencia bacteriana frente a la acción de los biocidas es básicamente de dos tipos: ***intrínseca***, es una propiedad natural (innata) controlada por cromosomas de la célula bacteriana; esta propiedad permite a las bacterias eludir la acción del biocida, o ***adquirida***, que puede surgir cuando las bacterias han sido expuestas a concentraciones gradualmente crecientes de un biocida. La tolerancia a los biocidas puede producirse a través de la mutación o amplificación de un gen endógeno o por adquisición de determinantes genéticos tales como plásmidos y transposones (Ortega Morente *et al.*, 2013).

El uso de compuestos biocidas puede favorecer la expresión de mecanismos de resistencia a antibióticos, así como favorecer el incremento en la capacidad de formación de biofilm, cuando se emplean en unas condiciones determinadas (Capita *et al.*, 2014; Molina-González *et al.*, 2014). Dicho incremento de la tolerancia bacteriana a los biocidas supone un importante motivo de preocupación en el contexto de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, ya que puede favorecer la persistencia de microorganismos patógenos e indeseables a lo largo de la cadena de producción de alimentos.

Los mecanismos a través de los cuales el uso de los biocidas podría contribuir al incremento de la resistencia a antibióticos son los siguientes (Capita y Alonso-Calleja, 2013):

a) Resistencia cruzada. Este fenómeno ocurre cuando un compuesto antimicrobiano selecciona (por presión selectiva) un gen que expresa mecanismos de resistencia comunes a diferentes grupos de antimicrobianos. Los principales mecanismos implicados en la resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos son la modificación de las cubiertas celulares y la producción de bombas de expulsión.

Por otro lado, cuando la adaptación a un antimicrobiano modifica la respuesta fisiológica de la bacteria provocando una reducción temporal de la susceptibilidad a varios antimicrobianos no relacionados, se produce la **protección cruzada o adaptación cruzada** (Alonso-Hernando *et al.*, 2009). En este sentido, se han llevado a cabo numerosos estudios para inducir respuestas de adaptación cruzada, habiéndose demostrado que la adaptación a un biocida puede conferir susceptibilidad reducida a otros biocidas diferentes (Soumet *et al.*, 2016; Wales y Davies, 2015). La expresión incrementada de bombas de expulsión inespecíficas y/o las modificaciones en la permeabilidad de las membranas son los mecanismos potencialmente responsables de la adaptación cruzada entre biocidas. Estos mecanismos de adaptación cruzada son dependientes del tipo de biocida y de la variabilidad entre cepas (Braoudaki y Hilton, 2004).

b) Co-resistencia. En este caso un antimicrobiano selecciona un gen que confiere resistencia a dicho compuesto, y este gen está físicamente unido a otro gen que expresa mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos. Ambos genes están incluidos en elementos genéticos mayores (plásmidos, transposones, integrones) y son transferidos y expresados de forma conjunta (Chapman, 2003; Paul *et al.*, 2019).

c) El empleo de un biocida puede seleccionar **clones** de células que son resistentes tanto a biocidas como a antibióticos como consecuencia de las características específicas de las cepas. Estas variantes clonales se consideran responsables de los cambios en la prevalencia de la resistencia a antibióticos en algunos microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, por ejemplo, *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium DT 104 (Gilbert y McBain, 2003).

d) Las situaciones de estrés, incluyendo la exposición a dosis subinhibitorias de antimicrobianos, pueden aumentar la capacidad de las bacterias para reparar su ADN mediante la activación de la respuesta **SOS**. Se trata de un mecanismo muy distribuido entre las bacterias encaminado a corregir el daño a los ácidos nucleicos, reparando o evitando las regiones lesionadas (Podlesek y Žgur Bertok, 2020).

e) Adquisición de mecanismos de protección. La tolerancia a los biocidas puede surgir a través de una mutación, mediante la amplificación de un gen

Introducción y Antecedentes

cromosómico endógeno o mediante la adquisición de determinantes genéticos extracromosómicos, tales como plásmidos y transposones (Goudarzi y Navidinia, 2019; Ortega Morente *et al.*, 2013; Russell, 1997). La tolerancia adquirida tiene lugar cuando se exponen las bacterias a concentraciones gradualmente crecientes de un biocida.

Los mecanismos principales mediante los cuales se puede generar resistencia o tolerancia a los biocidas en las bacterias se resumen a continuación:

a) Impermeabilidad. El fenómeno de la impermeabilidad celular presenta una mayor relevancia en la resistencia de las micobacterias y bacterias Gram-negativas, ya que los lugares diana para los biocidas se localizan a menudo dentro de la célula, y particularmente a nivel de la membrana citoplasmática o dentro del citoplasma. La estructura de la pared de las bacterias Gram-negativas, y específicamente la presencia de una cubierta externa, a menudo son responsables de la impermeabilidad de estos microorganismos a los agentes antimicrobianos (Ortega Morente *et al.*, 2013; Denyer y Maillard, 2002).

Varios autores sugieren que la tolerancia adquirida a los biocidas en bacterias Gram-negativas puede provocar cambios en la permeabilidad de la membrana celular, incluidos cambios en la hidrofobicidad superficial, etc. (Davies y Wales, 2019; McDonnell y Russell, 1999; Tattawasart *et al.*, 1999).

b) Alteración del lugar diana. A diferencia de los antibióticos, que tienen lugares de acción muy específicos dentro de la célula bacteriana, los biocidas parecen afectar a múltiples componentes celulares y, por lo tanto, las mutaciones en el sitio diana son raras en organismos tolerantes a los biocidas. Una excepción parece ser la resistencia al triclosán en *Escherichia coli*, que se efectúa por mutaciones en el gen *fabI* que codifica la proteína reductasa transportadora enoyl-acil de biosíntesis de ácidos grasos (McDonnell y Russell, 1999; Ortega Morente *et al.*, 2013).

c) Eflujo (bombas de expulsión). Existe una gran cantidad de proteínas integrantes de la membrana y asociadas a las mismas que están involucradas en el bombeo de antibióticos, biocidas y otras sustancias fuera de la célula microbiana (Goudarzi y Navidinia, 2019; Poole, 2005).

3.2. Antibióticos

El descubrimiento de la penicilina, en 1928, por Alexander Fleming, constituye uno de los acontecimientos más importantes del siglo XX, ya que dio lugar al comienzo de la revolución de la era de los antibióticos, que mayoritariamente se descubrieron durante la “edad de oro” de los mismos (Figura 8). Hoy en día, las principales actividades para el desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos se han centrado en importantes modificaciones de los medicamentos naturales ya existentes, en la re-ingeniería y en la síntesis química completa, si ésta es rentable. La introducción de los antibióticos en la práctica clínica revolucionó el tratamiento y el manejo de las enfermedades infecciosas. Antes de la introducción de los antibióticos, estas enfermedades eran la principal causa de morbilidad y mortalidad en poblaciones humanas. El efecto de los antibióticos sobre las bacterias patógenas se ha considerado como uno de los mayores éxitos en la historia de la medicina (Adejeji, 2016; Aminov, 2016); sin embargo, en la actualidad nos encontramos frente a una crisis mundial debido al alarmante aumento de la resistencia a los antibióticos por parte de los microorganismos patógenos (Aminov, 2016), debido al uso irracional de los mismos, al tratamiento prolongado para combatir enfermedades provocadas por bacterias multirresistentes y al tratamiento profiláctico frente a diversas infecciones, que han dado lugar a la emergencia de la resistencia (Munir *et al.*, 2020). El empeño por aprovechar, de manera exacerbada, las ventajas que ofrecían los antibióticos, hizo que surgiera, de manera inesperada, lo que sería el siguiente gran desafío en el control de las enfermedades infecciosas humanas: la aparición de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos (Cloutier, 1995; Tenover, 2006).

Introducción y Antecedentes

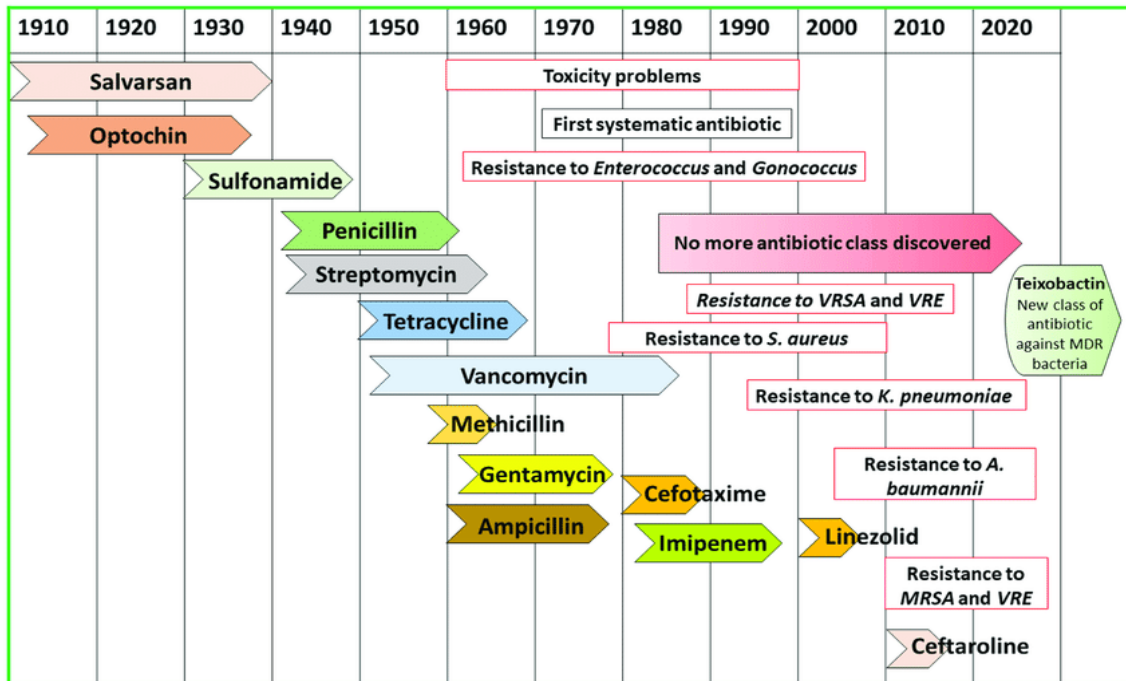


Figura 8. Descubrimiento de antibióticos y desarrollo de resistencias, panorama de los siglos XX y XXI (Munir *et al.*, 2020).

3.2.1. Definición y mecanismos de acción

Los antibióticos son sustancias activas usadas a dosis bajas para tratar infecciones en seres humanos, animales o plantas, inhibiendo el crecimiento (agentes bacteriostáticos) o destruyendo (agentes bactericidas) las bacterias sensibles (toxicidad selectiva); dichas sustancias pueden ser de origen natural (p. ej., penicilina), semisintético (p. ej., meticilina) o sintético (p. ej., sulfamidas).

Los antibióticos se pueden clasificar en base a su mecanismo o espectro de acción. Hay cinco mecanismos de acción principales (Tabla 5, Figuras 9 y 10) (Kapoor *et al.*, 2017; Wright, 2010):

- 1) Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- 2) Inhibición de la síntesis de la membrana celular.
- 3) Inhibición de la síntesis proteica.
- 4) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.
- 5) Inhibición de la síntesis del ácido fólico.

Tabla 5. Principales antibióticos y mecanismos de acción antimicrobiana (Adaptada de Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Dowling *et al.*, 2017; Guilhelmelli *et al.*, 2013; Tenover, 2006).

| Grupo de antimicrobianos | Modo general de acción | Compuestos | Lugar diana | Principales mecanismos de resistencia |
|--|--|---|---|--|
| Aminociclitoles | Inhibidores de la síntesis proteica | Espectinomicina, apramicina | ARNr 16S | Modifican la integridad de la membrana celular |
| Aminoglicósidos | Inhibidores de la síntesis proteica | Estreptomina, kanamicina, gentamicina, amikacina, tobramicina, neomicina | Subunidad ribosómica 30S | Inactivación enzimática Eflujo (bombas de expulsión) Disminución de la permeabilidad celular Modificación del lugar diana |
| Ansamicina | Inhibidores de la síntesis del ARNm | Rifampicina | Subunidad β del ARN-polimerasa | Modificación enzimática |
| B-lactámicos | Inhibidores de la síntesis de la pared celular | Penicilinas (penicilina, ampicilina, ticarcilina) Inhibidores β -lactamasa (amoxicilina-ácido clavulánico, etc.) Cefalosporinas (cefalotina, cefazolina, cefoxitina, cefotaxima, etc.) Carbapenem (imipenem) | Proteínas de anclaje de penicilinas | Inactivación enzimática Disminución de la permeabilidad celular Modificación del lugar diana |
| Inhibidores de la ruta del folato | Inhibidores de la síntesis de ADN | Sulfonamidas, trimetoprim-sulfametoxazol | Enzimas implicadas en la síntesis del ácido fólico | Superproducción del lugar diana Modificación del lugar diana Adquisición de rutas metabólicas alternativas |
| Glucopéptidos | Inhibidores de la síntesis de la pared celular | Teicoplanina | Unidades de peptidoglicano (dipéptido D-alanil-D-alanina terminal del peptidoglicano) | Modificación del lugar diana |
| Macrólidos | Inhibidores de la síntesis proteica | Eritromicina, azitromicina | Subunidad ribosómica 50S | Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Expresión incrementada de bombas de expulsión |

Introducción y Antecedentes

| | | | | |
|--------------------------------------|--|---|---|---|
| Tetraciclinas | Inhibidores de la síntesis proteica | Tetraciclina, doxiciclina | Subunidad ribosómica 30S | Expresión incrementada de bombas de expulsión Inactivación enzimática Modificación del lugar diana |
| Quinolonas y Fluoroquinolonas | Inhibidores de la síntesis de ADN | Ácido nalidixico, ciprofloxacina, enrofloxacina | Topoisomerasa II (ADN girasa), topoisomerasa IV | Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Reducción de la permeabilidad celular Expresión incrementada de bombas de expulsión |
| Fenicoles | Inhibidores de la síntesis proteica | Cloranfenicol | Subunidad ribosómica 50S | Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Reducción de la permeabilidad celular Expresión incrementada de bombas de expulsión |
| Otros | Inhibidores de la síntesis de la pared celular | Fosfomicina, nitrofurantoina | Inhibición enzimática en la formación de peptidoglicano | |

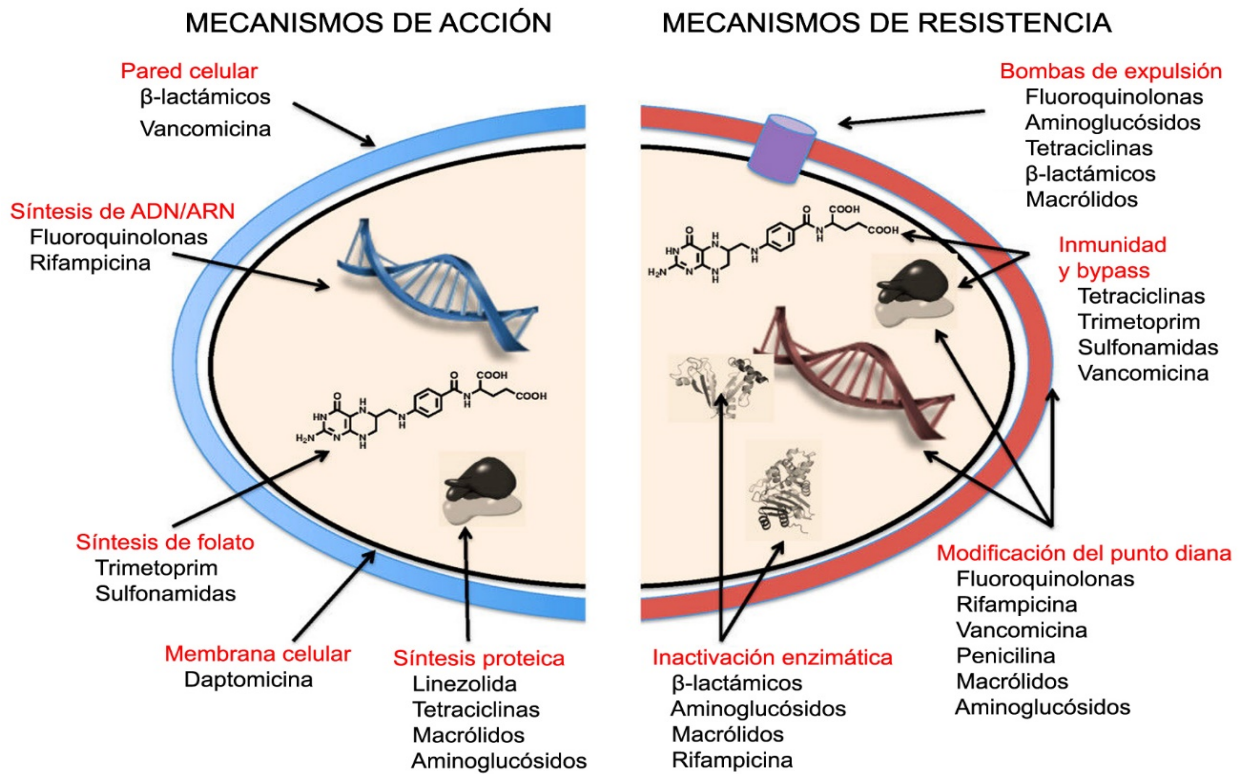


Figura 9. Mecanismos de acción y mecanismos de resistencia asociados a los principales antibióticos (Buzón-Durán *et al.*, 2017; Wright, 2010).

a) Interferencia en la síntesis de la pared celular.

Dentro de este grupo de compuestos se incluyen los antibióticos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactamos) y los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina). La resistencia a los antibióticos β -lactámicos normalmente la confieren enzimas que hidrolizan los antibióticos conocidas como β -lactamasas (Peterson y Kaur, 2018). Los antibióticos del grupo de los β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular por interferencia con las enzimas requeridas para la síntesis de la capa de peptidoglicano, comprometiendo la resistencia de la pared celular y provocando la destrucción de la bacteria por lisis celular (Livermore, 1995).

Por otra parte, los glucopéptidos como la vancomicina y la teicoplanina se unen al extremo terminal de las unidades precursoras de la cadena de peptidoglicano, impidiendo el ensamblaje del polímero y la síntesis de una pared

Introducción y Antecedentes

celular estable. La resistencia a estos antibióticos es principalmente el resultado de la expresión de enzimas que modifican covalentemente los antibióticos, ya sea por acetilación, fosforilación o adenilación (Munita y Arias, 2016; Wright, 2003). Al final, como en el caso de los antibióticos β -lactámicos, se produce lisis celular.

b) Interferencia en la síntesis de la membrana celular.

Hay una serie de agentes con capacidad de desorganización de la membrana celular y que, al interactuar específicamente con la misma, conducen a cambios en la permeabilidad y extrusión de componentes celulares. Además, algunos agentes antibacterianos que inhiben otras funciones de la célula afectan, también, a la membrana cuando están presentes en altas concentraciones.

Las polimixinas y los polienos son agentes antimicrobianos que ejercen su acción a nivel de la membrana celular. Las dos únicas polimixinas desarrolladas comercialmente, B y E (colistina), poseen una actividad restringida a los microorganismos Gram-negativos, ligándose a la membrana fosfolípida y produciéndose, como resultado de esta unión, la ruptura de la membrana celular. Por otra parte, los polienos son un gran grupo de agentes estructuralmente relacionados, la mayoría de los cuales son demasiado tóxicos como para ser usados con fin terapéutico (Pang *et al.*, 2019; Sefton, 2002).

c) Inhibición de la síntesis proteica.

Existen varias clases de antibióticos que ejercen su acción inhibiendo la síntesis de las proteínas e interaccionando con el ribosoma. Dichas interacciones son muy específicas e implican en su mayoría al ARNr. Entre los antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas se incluyen aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas y ácido fúscico, los cuales actúan a nivel de los ribosomas, estructuras clave en la síntesis proteica. Al unirse al ribosoma se detiene la transducción, inhibiéndose de esta forma la síntesis proteica. Los aminoglucósidos y las tetraciclinas actúan en la subunidad ribosómica 30S y el cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas y ácido fusídico ejercen su acción sobre la subunidad ribosómica 50S. De todos los agentes inhibidores de la síntesis proteica, los aminoglucósidos son los únicos con actividad bactericida, poseyendo, los demás, sólo actividad bacteriostática (Calvo y Martínez-Martínez, 2009; Sefton, 2002).

d) Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos.

Entre los antibióticos que afectan al metabolismo de los ácidos nucleicos y además presentan buena toxicidad selectiva, se encuentran las quinolonas (ácido nalidíxico y derivados, como la ciprofloxacina) y la rifampicina. Las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas II (ADN-girasa) y IV, las cuales son enzimas encargadas de controlar el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN, así como del corte, unión y separación de las hebras de ADN, necesarias para los procesos de síntesis y de partición del cromosoma a las células hijas cuando la bacteria se divide. Ambas son enzimas tetraméricas compuestas por dos subunidades A y dos subunidades B, codificadas respectivamente por los genes *gyrA* y *gyrB* en el caso de la ADN-girasa, y *parC* y *parE* en el caso de la topoisomerasa IV (Pang *et al.*, 2019).

Por otra parte, la rifampicina tiene actividad bactericida frente a microorganismos Gram-negativos. Actúa inhibiendo la síntesis del ARN (ácido ribonucleico) ribosómico y mensajero al bloquear a la ARN polimerasa, impidiendo así el inicio del proceso de transcripción, hay que tener en cuenta que carece de efecto antimicrobiano si el proceso de transcripción ya se ha iniciado (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

e) Inhibición de la síntesis del ácido fólico.

Las sulfamidas son análogos del ácido para-aminobenzoico, y por lo tanto van a competir por la enzima dihidropteroatosintetasa, impidiendo así la formación del ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. De este grupo uno de los antibióticos más usados en la práctica clínica es el sulfametoxazol (asociado a trimetoprim) (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).

La acción conjunta, habitualmente usada en la práctica clínica, de trimetoprim y sulfametoxazol, conocida como co-trimoxazol, bloquea algunas de las etapas en la ruta metabólica que conduce a la síntesis de ácido fólico, lo cual va a desencadenar la inhibición de la síntesis de ADN. La acción conjunta de sulfamidas

Introducción y Antecedentes

y trimetoprim en las bacterias sensibles es sinérgica y presenta actividad bactericida (Fernández-Villa *et al.*, 2019).

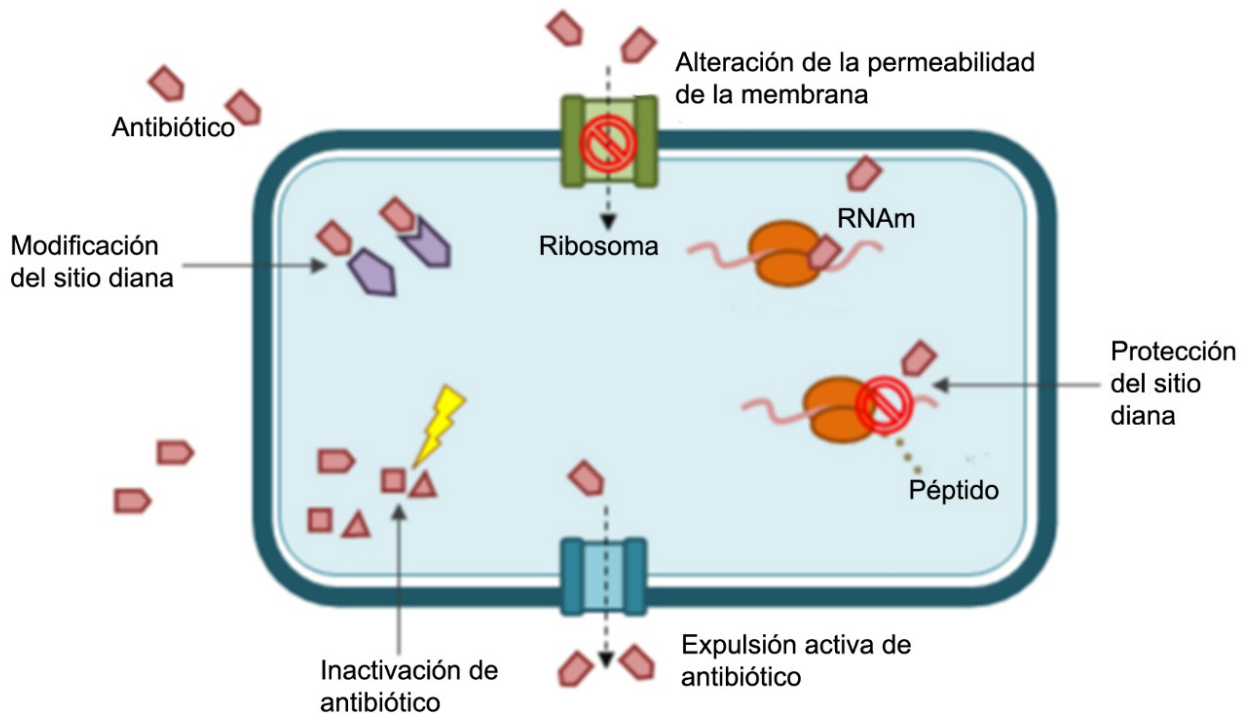


Figura 10. Mecanismos de resistencia a agentes antimicrobianos (Adaptada de Yao y Moellering, 2005).

3.2.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos puede definirse desde el punto de vista microbiológico como la presencia de un mecanismo de resistencia determinado genéticamente (adquirido o mutado) que permite clasificar al patógeno fenotípicamente como resistente o susceptible en función de unos límites estándar establecidos para cada antibiótico (MacGowan y Macnaughton, 2017).

Esta resistencia a los antibióticos en microorganismos patógenos humanos existía antes del uso de antibióticos por el hombre, pero su prevalencia era baja. Los estudios realizados con bacterias obtenidas en los años previos al descubrimiento de los antibióticos o con bacterias de poblaciones humanas que no habían sido expuestas a ellos ponen de manifiesto dicha resistencia. A nivel mundial, se ha producido un importante aumento en la prevalencia de la resistencia a antibióticos, provocado por el uso masivo de los mismos (Alós, 2015).

Las bacterias pueden manifestar resistencia a los antibióticos mediante varios mecanismos, los cuales se hacen extensivos a una amplia variedad de géneros bacterianos. Algunas de estas especies bacterianas presentan resistencia innata a una o más clases de agentes antimicrobianos. En algunos casos, todas las cepas de esa especie bacteriana son igualmente resistentes a todos los miembros de esas clases antibacterianas. En aquellos casos en los que la resistencia es adquirida, las poblaciones de bacterias inicialmente susceptibles se convierten en resistentes a un agente antibacteriano, proliferan y se propagan bajo presión selectiva provocando la diseminación de la resistencia, lo cual va a suponer un grave problema (Tenover, 2006).

Los microorganismos han desarrollado determinadas estrategias para evadir la acción de los antibióticos, tales como la formación de biofilm, la inducción de cambios en la permeabilidad de la superficie celular, la expresión incrementada de bombas de expulsión, la inactivación enzimática del compuesto antes de que alcance el lugar diana, la modificación o superproducción del lugar diana o la adquisición de rutas metabólicas alternativas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

1) **Biofilms.**

Un biofilm es un agregado organizado de microorganismos que viven dentro de una matriz orgánica polimérica extracelular (EPS) que ellos mismos sintetizan. Estas agregaciones que dan lugar a poblaciones complejas de microorganismos crecen adheridas a superficies (vivas o inertes). Los biofilms pueden estar formados por una única especie microbiana o presentar un abanico de especies diferentes. Las bacterias que forman parte de los biofilms expresan propiedades diferentes a las de las células planctónicas, como por ejemplo una resistencia incrementada a biocidas y a antibióticos a través de diferentes mecanismos (Tabla 6) (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Yin *et al.*, 2019).

La formación de biofilms es un proceso complejo y dinámico, en el que las comunidades organizadas de microorganismos están encerradas en una matriz de EPS que engloba a las células microbianas; dicha formación da lugar a una estrategia adaptativa de los microorganismos que permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente y supone la aparición de un

Introducción y Antecedentes

nuevo concepto de “bacteria” como organismo unicelular que puede ser capaz de formar estructuras complejas con interrelaciones entre sus individuos que están muy próximas al comportamiento de los organismos pluricelulares (Yin *et al.*, 2019). La formación de biofilm va a proporcionar a las bacterias cuatro ventajas importantes: (1) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (2) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (3) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (4) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm.

El mecanismo de formación de los biofilms es muy complejo, dependiendo de numerosos factores tanto intrínsecos al microorganismo como propios del medio que lo rodea. Este hecho hace que sea muy difícil generalizar en cuanto a las características específicas de estas comunidades bacterianas y por lo tanto complica su comprensión. Sin embargo, una consecuencia de la formación de estas estructuras es que los métodos habituales de control y eliminación (desinfectantes, antibióticos, etc.) de las formas libres (planctónicas) de las bacterias se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm (Donlan y Costerton, 2002).

El proceso de formación de biofilm (Figura 11) consta de una etapa inicial donde tiene lugar la adherencia sobre la superficie. En bacterias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son elementos importantes para que tenga lugar la etapa de adherencia primaria. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas, sin embargo, no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram-positivas inmóviles como los estafilococos, los estreptococos y las micobacterias son capaces de formar biofilm. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a lo que ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar. A continuación, las bacterias comienzan a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (*mushrooms*) entre

las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria (alginato en *Pseudomonas aeruginosa*, celulosa en *S. Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae* (Ledebøer y Jones, 2005; Sabalza *et al.*, 2017). Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm (Maruzani *et al.*, 2019).

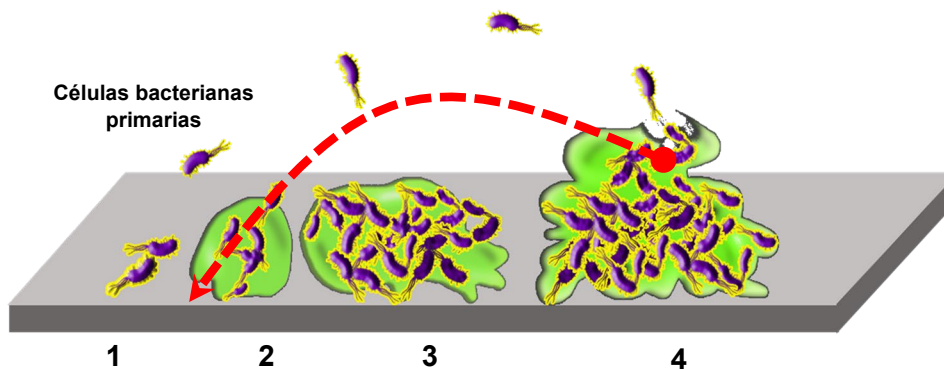


Figura 11. Esquema de las diferentes etapas de la formación de biofilms de células bacterianas.

1: adherencia; 2: crecimiento; 3: maduración; 4: dispersión.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. La liberación de las bacterias desde el biofilm es el proceso que menos se conoce (Lasa y Leiva, 2005). En el proceso de liberación son varios los factores que pueden contribuir al desprendimiento del biofilm: enzimas que degradan la matriz, los niveles de nutrientes y las señales de *quorum-sensing*. Así mismo, las fuerzas mecánicas asociadas con el flujo de fluidos también se han investigado como agentes potenciales para eliminar las bacterias adsorbidas de las superficies (Jang *et al.*, 2017).

Hoy día sabemos que los biofilms no son una rareza, sino que más bien representan una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza y su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de la vida humana, con múltiples implicaciones tanto sanitarias como tecnológicas. Estas

Introducción y Antecedentes

repercusiones son especialmente importantes en el ámbito de la Industria Alimentaria, donde su control y eliminación puede representar un problema. Para conseguir controlar este problema, cada industria debería involucrarse en la investigación y desarrollar su propia tecnología, dependiendo de las variables inherentes a sus procesos (Domínguez *et al.*, 2010).

Tabla 6. Mecanismos asociados con el incremento de la resistencia a biocidas y antibióticos de las bacterias de los biofilms (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

- Disminución de la difusión de las moléculas activas a través del biofilm debido a la matriz polimérica extracelular.
 - Elevada concentración de bacterias en el biofilm.
 - Modificación del estado fisiológico: disminución del metabolismo y del ritmo de crecimiento. Las poblaciones que crecen más lentamente son más resistentes.
 - Alteración de la permeabilidad de la membrana por el descenso de la síntesis de porinas.
 - Inducción de operones de multi-resistencia y de la síntesis de bombas de expulsión.
 - Superproducción de enzimas capaces de degradar los compuestos antimicrobianos.
-

2) Cambios en la permeabilidad celular.

La forma más común de resistencia a los antibióticos se debe a la estructura y composición de las membranas bacterianas, que pueden actuar como barreras, ya sea de forma natural o a través de mecanismos de resistencia adquiridos. Esta barrera limita la cantidad de antimicrobiano que entra en la célula, disminuyendo así la eficacia de la concentración antimicrobiana. Se han publicado varios trabajos sobre la disminución de la eficacia del biocida después de producirse cambios en las proteínas de la membrana bacteriana (Winder *et al.*, 2000), en la composición de ácidos grasos (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2008), fosfolípidos (Boeris *et al.*, 2007), o lipopolisacáridos de las membranas bacterianas. Por ejemplo, la resistencia de *E. coli* a antibióticos β -lactámicos puede producirse por cambios en las porinas de la membrana externa (IFT, 2006).

Existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias, y en especial en la cantidad del peptidoglicano. Las bacterias Gram-negativas,

además de una capa pequeña de peptidoglicano, presentan unas estructuras de membrana consistentes en lipopolisacáridos y lipoproteínas anclados al peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas (*outer membrane porins*, OMP). Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia intrínseca de algunas enterobacterias se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, con las mutaciones que tienen lugar por la alteración de la forma y el número de las ya existentes, lo cual va a influir en la permeabilidad a los antibióticos, provocando diversos tipos de resistencia a través de la membrana (Cabrera *et al.*, 2007).

3) Bombas de expulsión.

Las bombas de expulsión representan el mecanismo de resistencia a biocidas más frecuente, y contribuyen a la expulsión al exterior de sustratos naturales como metabolitos intermediarios, moléculas de señalización intercelular, etc. (Webber y Piddock, 2003). Las bombas de expulsión son generalmente de expresión constitutiva y se encuentran codificadas en el cromosoma bacteriano, aunque se han descrito también en plásmidos (Piddock, 2006). Los genes y proteínas de las bombas de expulsión están presentes tanto en bacterias susceptibles a antibióticos como en bacterias resistentes a los mismos. Algunos sistemas pueden ser inducidos por sus sustratos para que una cepa aparentemente susceptible pueda reproducir una bomba y se vuelva resistente. La resistencia a los antimicrobianos provocada por una mutación en la bomba de expulsión se debe a uno de dos mecanismos: o bien (i) aumenta la expresión de la proteína de la bomba de expulsión o bien (ii) la proteína contiene una sustitución de aminoácidos, lo cual va a favorecer que la proteína sea más eficiente en la exportación. En cualquier caso, la concentración intracelular del sustrato antimicrobiano se reduce y el organismo se vuelve menos susceptible a ese agente. Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar una gama de compuestos estructuralmente diferentes (incluidos los antibióticos de múltiples familias) (Piddock, 2006).

Hay 5 familias principales de sistemas de flujo –bombas de expulsión– (Figura 12) que pueden provocar la disminución de la sensibilidad a los diferentes

Introducción y Antecedentes

agentes antimicrobianos: familia RND (“*Resistance Nodulation-Cell Division*”), familia MSF (“*Major Facilitator Superfamily*”), familia SMR (“*Staphylococcal multiresistance*”), familia MATE (“*Multidrug and Toxic compound Extrusion*”) y familia de transportadores ABC (“*ATP binding cassette*”). Todas estas familias están presentes en bacterias Gram-negativas (Putman *et al.*, 2000).

Finalmente, señalar que muchas bacterias han adquirido resistencia a diferentes clases de antibióticos no relacionados (bacterias multi-resistentes). El principal mecanismo de esta multi-resistencia es la presencia de bombas de expulsión inespecíficas, capaces de excretar un amplio rango de compuestos tóxicos para la bacteria, incluyendo antibióticos y biocidas. Existen varios tipos de transportadores, el **transportador simple** que cataliza el eflujo a través de la membrana citoplasmática (MC) en bacterias Gram-positivas, energizado por gradientes de protones (MSF–SMR) o bien por hidrólisis de ATP (ABC), el **transportador simple** en bacterias Gram-negativas que excretan los sustratos hacia el espacio periplásmico (MSF-SMR). El **transportador multicompuesto** tipo RND en bacterias Gram-negativas, energizado por gradiente de protones y estructura tripartita con canales de membrana externa (canal ME) y proteínas de fusión periplásmica. El **transportador multicompuesto** tipo MSF en bacterias Gram-negativas y el **transportador multicompuesto** tipo ABC energizado por hidrólisis de ATP (Marchetti *et al.*, 2011).

El sistema de transporte RND es el usado con mayor frecuencia por algunas bacterias, el cual posee un papel crucial en la resistencia intrínseca a antibióticos utilizados clínicamente como los β -lactámicos (excepto imipenem), fluoroquinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina y trimetoprim (Munita y Arias, 2016)

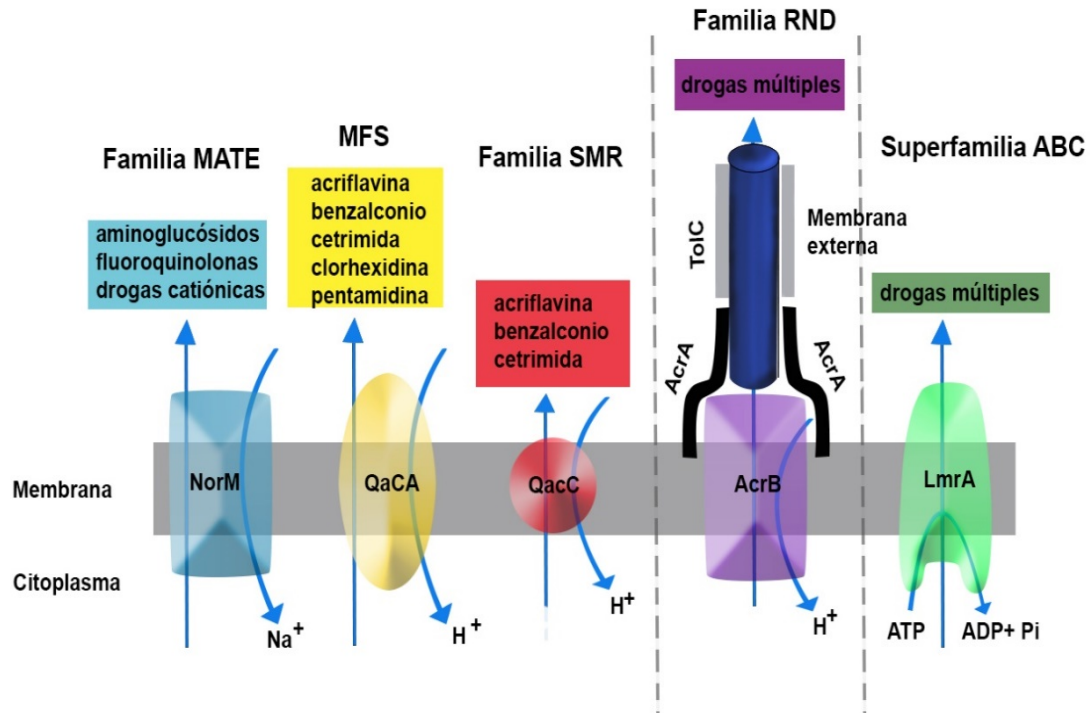


Figura 12. Comparación de las cinco familias de las bombas de expulsión (Adaptada de Piddock, 2006).

4) Inactivación enzimática.

A través de la evolución de los microorganismos se han ido seleccionando verdaderos mecanismos de defensa frente a los efectos tóxicos de los antimicrobianos y otros fármacos. Uno de estos mecanismos involucra la producción de enzimas hidrolíticas capaces de inactivar directamente al antimicrobiano en cuestión como es el ejemplo de las β -lactamasas, en las que se produce la hidrólisis del anillo β -lactámico, o bien enzimas que transforman la molécula en un derivado sin actividad intrínseca, como ocurre con las enzimas que fosforilan o acetilan los aminoglucósidos (Marchetti *et al.*, 2011).

Se ha observado también este mecanismo de resistencia en el caso de diferentes biocidas (p. ej., algunas sales, parabenos o aldehídos) (Committee on Emerging and Identified Health Risks, 2009)

Introducción y Antecedentes

5) Modificación o superproducción de los lugares diana.

Se produce la modificación del receptor intracelular cuando el *target* o lugar diana del antibiótico es alterado o modificado en la bacteria, lo cual va a provocar una pérdida del sitio de unión y, en consecuencia, se pierde el efecto antibacteriano del compuesto. Algunos ejemplos de este mecanismo consisten en la modificación de las proteínas de anclaje de las penicilinas (PBP), observadas en ciertos tipos de resistencia a estos antibióticos, alteraciones ribosómicas que pueden producir resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, macrólidos o tetraciclinas, y modificaciones de la enzima ADN-girasa, que dan lugar a la resistencia a las fluoroquinolonas (Alanis, 2005).

6) Adquisición de rutas metabólicas alternativas.

Algunos grupos de antibióticos actúan sobre enzimas que participan en determinadas rutas metabólicas. Las bacterias resistentes son capaces de desarrollar una vía metabólica nueva para eludir la acción del antimicrobiano. Las sulfonamidas y el trimetoprim van a interferir con la biosíntesis bacteriana del ácido fólico, que es una vitamina esencial para los microorganismos. Las sulfonamidas son análogos estructurales del *para*-aminobenzoato (PABA), necesario para la síntesis de dihidropteroato sintetasa, enzima que participa en la producción de 7, 8-dihidropteroato (una etapa clave en la síntesis de folato). De esta forma, las sulfamidas producen una inhibición competitiva de la síntesis de ácido fólico. El trimetoprim, por su parte, inhibe de forma selectiva la enzima dihidrofolato reductasa, evitando así la transformación de dihidrofolato en tetrahidrofolato (un derivado del ácido fólico). Al final en ambos casos se frena la síntesis de ADN. La resistencia de las bacterias a estos antibióticos se basa en la adquisición de la capacidad para sintetizar dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa modificadas, con una afinidad reducida por las sulfonamidas y el trimetoprim, respectivamente (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

3.2.3. Bases genéticas de la resistencia a antibióticos.

Las bacterias presentan una versatilidad genética notable que les permite responder frente a una amplia gama de amenazas ambientales, entre las que se incluyen la presencia de moléculas de antibióticos que pueden poner en peligro su existencia. Las bacterias que comparten el mismo nicho ecológico con los

organismos productores de antimicrobianos han desarrollado diversos mecanismos para resistir el efecto de la molécula antibiótica dañina y, en consecuencia, su resistencia intrínseca les permite prosperar en su presencia. Desde una perspectiva evolutiva, las bacterias utilizan dos factores genéticos principales para adaptarse a la acción de los antibióticos, a) mutaciones en genes asociados a menudo con el mecanismo de acción del compuesto, y b) adquisición de ADN desconocido que codifica determinantes de resistencia a través de la transferencia horizontal de genes (Munita, 2016).

La **resistencia intrínseca o natural** (innata) es la capacidad de un microorganismo para resistir la actividad de un compuesto antimicrobiano particular al poseer unos genes determinados en su cromosoma; dicha resistencia está relacionada con la fisiología general o la anatomía de un microorganismo. Un ejemplo es la resistencia natural de las bacterias Gram-negativas a la vancomicina. Algunas especies de bacterias poseen resistencia intrínseca a una o más clases de compuestos antimicrobianos como es el caso de *Salmonella enterica*, la cual presenta este tipo de resistencia frente a la bencilpenicilina, oxacilina, antibióticos macrólidos excepto azitromicina, rifampicina, lincosamidas, estreptograminas, glicopéptidos y ácido fusídico (Stock y Wiedemann, 2000). Cuando las especies bacterianas presentan este tipo de resistencia natural a uno o más antimicrobianos, todas las cepas de esa misma especie presentan una resistencia similar a los mismos (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Dowling *et al.*, 2017; Tenover, 2006).

Este tipo de resistencia se denomina también insensibilidad o insusceptibilidad, ya que tiene lugar en organismos que nunca han sido susceptibles al compuesto (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Dicha insensibilidad natural puede deberse a la ausencia de lugares diana para el antimicrobiano, a la dificultad del compuesto para acceder al interior de la célula bacteriana, o a la expulsión del compuesto mediante bombas de expulsión (Giguère *et al.*, 2006).

La **resistencia adquirida** tiene lugar cuando las bacterias originalmente susceptibles alcanzan un mayor o menor grado de resistencia a un agente antimicrobiano. Este tipo de resistencia puede ser debida a diferentes mecanismos, como la síntesis de enzimas que inactivan el compuesto (p. ej., β -lactamasas que confieren resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos), la modificación mutacional del *target* o lugar diana (p.ej., modificaciones en la ADN topoisomerasa,

Introducción y Antecedentes

que confiere resistencia a quinolonas), la impermeabilidad de la superficie celular (p. ej., pérdida de las proteínas porinas de la membrana externa que confiere resistencia al carbapenem) o la expulsión del compuesto al medio extracelular (p. ej., bombas de expulsión que confieren resistencia a la penicilina). La mayoría de los microorganismos resistentes a los antibióticos han emergido como resultado de modificaciones genéticas, conseguidas mediante mutaciones espontáneas ventajosas o por la adquisición de material genético por transferencia horizontal desde otras células (Cabrera *et al.*, 2007; Capita y Alonso-Calleja, 2013).

a) Mutaciones.

La variación de las tasas de mutación en respuesta a factores ambientales es una antigua predicción de la genética de poblaciones y ha sido confirmada por diferentes estudios en las poblaciones bacterianas. Los diferentes tipos de estrés inducen diferentes tipos de mutaciones, lo que respalda la opinión de que el aumento de la tasa de mutación bajo estrés es una respuesta adaptativa. Un inconveniente de la adaptación mutacional es que las mutaciones suelen ser perjudiciales y su acumulación en una población puede disminuir la aptitud. De hecho, las poblaciones bacterianas con altas tasas de mutación se adaptan rápidamente a un entorno determinado, pero a largo plazo son superadas por los no mutantes. Esta pérdida de aptitud a largo plazo puede contribuir a explicar la emergencia evolutiva de estrategias no mutacionales que adoptan las poblaciones bacterianas para hacer frente a los desafíos ambientales (Urdaneta *et al.*, 2019).

La resistencia por mutación se produce con una frecuencia baja (del 1% al 2%) y al azar, según el tipo de bacterias y las características ambientales. La contribución del antibiótico es seleccionar los mutantes que aparecen en la población bacteriana sensible. La elevada tasa de replicación de las bacterias implica que las resistencias se estén generando de forma continua. Como consecuencia de la rareza de estos acontecimientos, la utilización de una combinación de antibióticos parecía poder prevenir la emergencia de mutantes resistentes al no dejar ningún superviviente. En algunos casos, determinadas mutaciones cromosómicas pueden conferir resistencia simultánea a varios antibióticos pertenecientes a familias diferentes, haciendo inútil la aplicación de una terapia antibiótica múltiple. La causa de esta multiresistencia es la mutación que modifica las porinas, afectando así al paso de estos antibióticos a través de la pared

bacteriana y provocando la impermeabilidad de la célula bacteriana. Este tipo de resistencia se da con particular frecuencia en algunas enterobacterias como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia* (Coque *et al.*, 2002). La adquisición de resistencia a un antibiótico es beneficiosa para la bacteria cuando se encuentra en presencia del compuesto, pero implica para ella un “coste biológico”. Esta pérdida de “fitness” bacteriano (definido como la capacidad de la bacteria de sobrevivir o replicarse) que se refleja en una disminución de su velocidad de crecimiento tanto *in vivo* como *in vitro*, respecto a las bacterias sensibles, en ausencia del antibiótico, se refleja también en una disminución en la tasa de transmisión. Sin embargo, en ocasiones se producen, de forma aleatoria, “mutaciones compensatorias” que permiten a la bacteria resistente incrementar su ritmo de crecimiento, de forma que, en ausencia del antibiótico, la bacteria resistente no estaría desfavorecida respecto a la bacteria sensible. Estos mecanismos compensatorios permiten a las bacterias resistentes persistir incluso en ausencia de presión selectiva.

Este “coste biológico” se encuentra entre los factores más importantes que determinan tanto la tasa como el grado de aparición de la resistencia (Kempf y Zeitouni, 2012; Zur Wiesch *et al.*, 2010)

b) Transferencia horizontal.

La transferencia de genes entre bacterias permite una difusión rápida y extensa de la información genética y es el mecanismo principal mediante el cual las bacterias han adquirido mecanismos de resistencia a los antibióticos y de virulencia. Se producen estas transferencias tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas y se califican como horizontales, ya que se dan con independencia de todo mecanismo de reproducción. Cuando el fenómeno se presenta durante la reproducción bacteriana se habla de transferencia génica vertical. Las bacterias son muy eficientes para propagar la resistencia a antibióticos debido a su capacidad para multiplicarse con rapidez, transfiriendo los genes de resistencia a su progenie durante la multiplicación celular. Además, los genes pueden pasar a otras células bacterianas mediante determinadas plataformas genéticas de transferencia horizontal, tales como la transducción, la transformación y la conjugación (Emamalipour *et al.*, 2020) (Figuras 13-14). La transferencia horizontal puede ocurrir en cualquier ambiente, particularmente cuando las cargas bacterianas son altas, por ejemplo, en el suelo, en plantas de tratamiento de aguas residuales, y en

Introducción y Antecedentes

el microbioma intestinal de seres humanos y animales. El intercambio de genes a través de los mecanismos de transferencia horizontal contribuye de manera importante a la difusión global de genes de resistencia a antibióticos (McInnes *et al.*, 2020).

Conjugación. Es el mecanismo más común y con mayor relevancia de transmisión de la resistencia entre bacterias. Este mecanismo normalmente está mediado por plásmidos (fragmentos circulares de ADN) que son más simples que el ADN cromosómico y pueden replicarse independientemente del cromosoma. El mecanismo de transmisión de plásmidos entre bacterias tiene lugar a través de la formación de un “pilus” (una estructura tubular hueca) que se forma entre las bacterias cuando están próximas, conectándolas temporalmente y permitiendo el paso de estos fragmentos de ADN. Mediante este mecanismo se transfiere el ADN de una bacteria donante a una bacteria receptora por medio de un mecanismo que implica un estrecho contacto celular (Alanis, 2005).

Este modo de transferencia ha sido descrito en casi la totalidad de las especies bacterianas y es responsable de la mayoría de transferencias horizontales. Su mecanismo es singular, de modo que uno solo de los dos filamentos de ADN del cromosoma bacteriano se transmite de la bacteria donante a la bacteria receptora. Esta última adquiere la resistencia a través de la hebra transferida mientras que la donante conserva esta misma propiedad a través de la información contenida en la hebra conservada. Ambas bacterias, la donante y la receptora, sintetizan de nuevo la hebra complementaria, de modo que al final de la conjugación cada uno de los microorganismos posee una doble hebra de ADN, lo que amplía notablemente la resistencia. Aunque es posible un amplio espectro de posibilidades de conjugación, la transferencia de un gen de resistencia entre dos géneros patógenos será más eficaz cuanto menor sea la diferencia genética entre las bacterias implicadas. Aun así, se han demostrado transferencias horizontales de genes de resistencia entre bacterias Gram-positivas a las Gram-negativas (Durich, 2000). Los elementos genéticos móviles, como los plásmidos y los elementos integradores y conjugativos, se transfieren de una bacteria a otra. Entre los elementos conjugativos, los plásmidos conjugativos son posiblemente los más relevantes para la propagación de genes de resistencia a antibióticos, ya que tienen el potencial de portar múltiples genes de resistencia y, además, los plásmidos

conjugativos con frecuencia portan genes, distintos de los genes de resistencia a antibióticos, que contribuyen a la aptitud microbiana, por ejemplo, mediante la codificación de nuevas rutas metabólicas, la tolerancia a desinfectantes o metales pesados, como queda representado de forma esquematizada en la Figura 14. Por tanto, los determinantes de la resistencia a los antibióticos pueden co-seleccionarse en una variedad de condiciones, ya que comparten una plataforma genética con otros determinantes de la aptitud bacteriana (McInnes *et al.*, 2020). Los plásmidos son fragmentos circulares de ADN bicatenario de longitud variable que contienen genes de resistencia y poseen la capacidad de replicarse en forma independiente del sistema de duplicación del material genético de la bacteria. Una bacteria puede albergar varios plásmidos y también es posible que un mismo plásmido vehicule varios genes de resistencia, en cuyo caso un solo plásmido puede determinar en un hospedador la resistencia a cinco o seis familias de antibióticos, de modo que permite a la bacteria hacerse multiresistente en una sola etapa (Durich, 2000).

Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que los plásmidos pueden adquirir sucesivamente diferentes genes de resistencia. Esto es posible por la existencia de transposones, que son secuencias de ADN de doble cadena que albergan uno o varios determinantes de resistencia a los antibióticos y pueden ser translocados, como unidades independientes, entre un cromosoma y un plásmido, o entre plásmidos distintos dentro de una bacteria. Estos elementos génicos poseen un sistema de recombinación propio que les permite el intercambio aleatorio entre secuencias no homólogas de ADN, insertando así genes de resistencia en el cromosoma. De hecho, permiten la translocación de los genes de resistencia del cromosoma bacteriano a un plásmido o de un plásmido a otro de tal forma que se amplían enormemente las posibilidades de transferencia de la información. El transposón participa activamente en la diseminación de genes entre bacterias filogenéticamente alejadas (Partridge *et al.*, 2018).

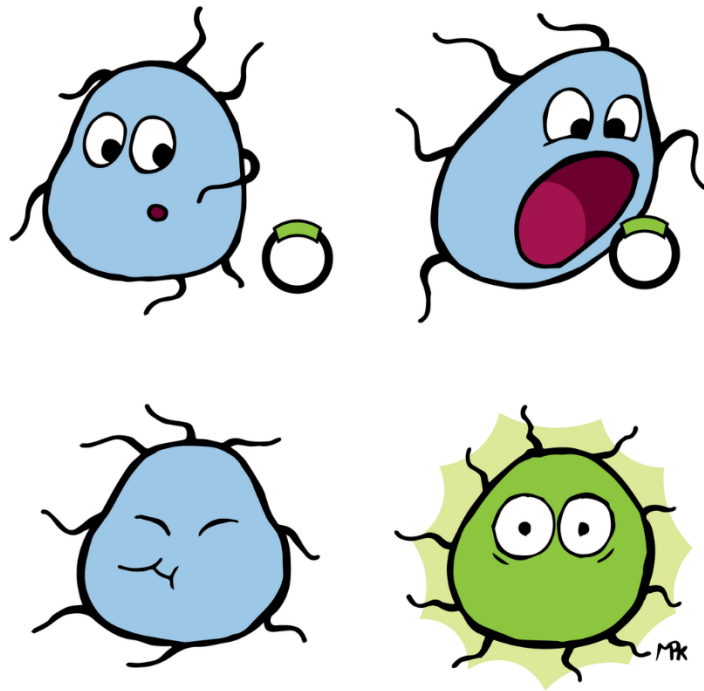


Figura 13. Cuando una bacteria capta un plásmido, los genes en el plásmido pueden darles diferentes fenotipos. Por ejemplo, este plásmido codifica un gen de proteína verde fluorescente que hace que la bacteria sea verde fluorescente (Cómic de Maya Kostman, Cecchetelli, 2019).

Transformación. La transformación es un mecanismo que permite la adquisición y la incorporación de ADN exógeno desnudo. En este caso un fragmento de ADN presente en el medio externo es captado por la bacteria. Cuando las bacterias mueren y su membrana ha sido más o menos destruida liberan fragmentos de ADN que pueden ser captados por otras bacterias. Este modo de transferencia de genes es bastante generalizado y se ha descrito en algunas bacterias Gram-negativas pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Campylobacter*, *Haemophilus* y *Neisseria* y en algunas bacterias Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Bacillus* y *Streptococcus*. Con la excepción notable de *Neisseria* y *Haemophilus*, en los que el ADN sólo penetra en la bacteria en forma de pequeños fragmentos de nucleótidos específicos del género, la transformación permite una mezcla de informaciones genéticas entre bacterias muy distantes en el plano filogenético. A diferencia de otros mecanismos que dependen de parámetros más específicos, la información transmitida por el mecanismo de transformación es

de carácter universal y puede ser asimilada por cualquier bacteria, incluso permite la creación de genes quimeras muy resistentes a los antibióticos (Durich, 2000; McInnes *et al.*, 2020).

Transducción. La transducción es un tercer mecanismo de transferencia genética y ocurre a través del uso de un "vector". Dicho vector es un virus bacteriano, es decir, un bacteriófago que es capaz de transferir un fragmento de ADN de una bacteria a otra. El virus bacteriano, al ingresar en la bacteria susceptible, induce una nucleasa que fragmenta el cromosoma bacteriano a la vez que se forma el ADN vírico y sus proteínas de envoltura. Algunas de estas proteínas incluyen ADN fragmentado bacteriano que al infectar a una nueva bacteria puede introducir algunos nuevos genes, entre ellos los causantes de la resistencia bacteriana a los antibióticos. La transducción es un mecanismo de transferencia muy eficaz, pero debido a la estrecha especificidad de la relación virus-bacteria está limitada a intercambios entre microorganismos filogenéticamente próximos, fundamentalmente pertenecientes al mismo género (Alanis, 2005; McInnes *et al.*, 2020).

Introducción y Antecedentes

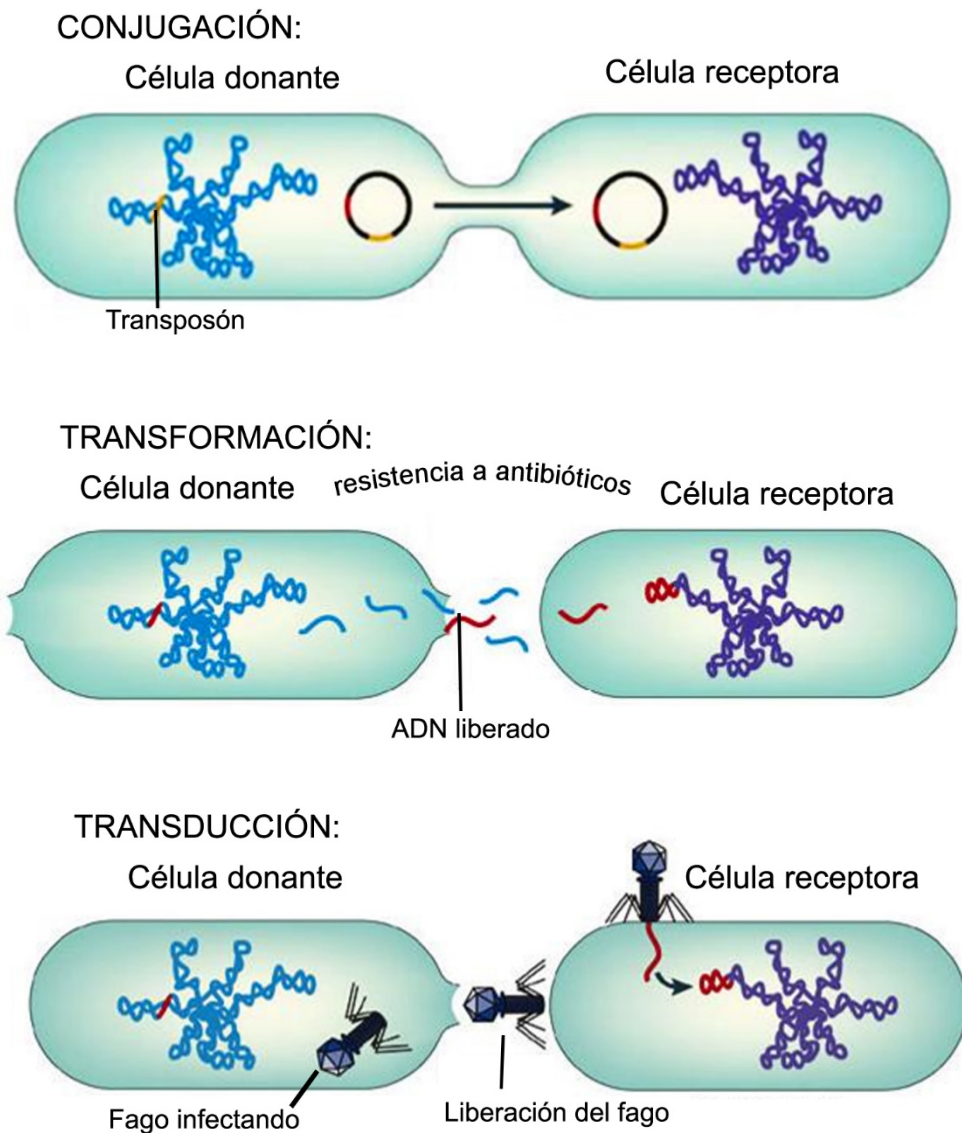


Figura 14. Transferencia horizontal de genes entre bacterias (Adaptada de Furuya y Lowy, 2006).

La mutación, la recombinación y la transferencia horizontal de genes son los mecanismos más importantes de la evolución bacteriana. Las bacterias utilizan sistemas para captar y acumular y movilizar genes de resistencia a antibióticos, tales como: los **integrones** (Figura 15) que son piezas genéticas con capacidad para captar genes que codifican determinantes de resistencia a antibióticos y determinantes con otras funciones; se han diseminado ampliamente entre las especies de la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram-negativas. Los

integrones, en su forma más sencilla, están formados por tres elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (casetes): uno que codifica una integrasa (*intl*), el otro es el lugar de recombinación sitio-específico (*attI*) y, por último, un promotor (*P_{ant}*) para la expresión de los genes casetes integrados. Los genes (exógenos) que se incorporan a los integrones presentan una estructura particular y se han denominado **genes casete**. La integración se produce por un mecanismo de recombinación sitio-específico (Mosquito *et al.*, 2011; Partridge *et al.*, 2018; Sabaté y Prats, 2002), y van a conferir resistencia a una amplia gama de compuestos antibacterianos, tales como antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, trimetoprim, sulfonamidas, fenicoles, tetraciclinas, rifampicina, eritromicina y quinolonas. Se han identificado varios elementos genéticos que participan en la transferencia de genes de resistencia, de los cuales los más conocidos son los plásmidos autotransferibles o movilizables. También se incluyen los transposones conjugativos y no conjugativos (González *et al.*, 2004).

Existen, además, otros sistemas de movilización que favorecen la diseminación de genes de resistencia, como son las islas genómicas, las secuencias de inserción comunes o la movilización mediada por fagos. La estrategia más eficiente y habitual de transferencia genética es el paso de **plásmidos** (moléculas de ADN extracromosómico que replican de forma independiente al cromosoma) o **transposones conjugativos** (secuencias de ADN con gran capacidad de movimiento que pueden moverse entre diferentes partes del genoma bacteriano, pueden localizarse tanto en el cromosoma bacteriano como en los transposones) de una bacteria donante a otra bacteria receptora (Alanis, 2005).

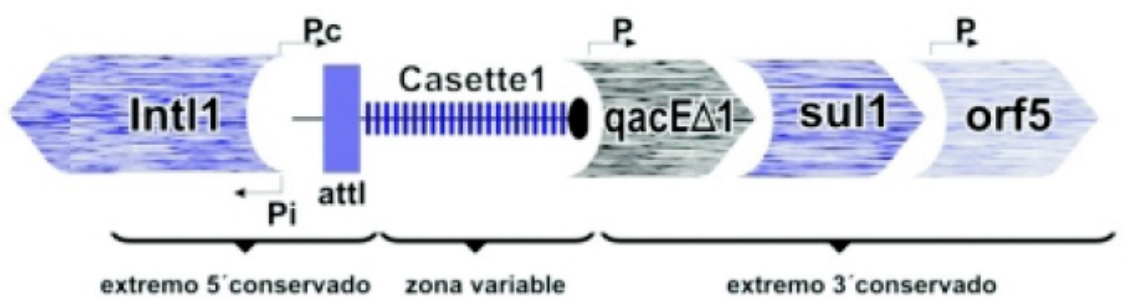


Figura 15. Estructura básica de un integron (Adaptada de Pinilla *et al.*, 2006).

Introducción y Antecedentes

La transferencia horizontal de genes de resistencia dentro del Sistema Alimentario va a suponer un peligro tanto directo como indirecto para el consumidor. El peligro directo está relacionado con la presencia en los alimentos de microorganismos patógenos resistentes, los cuales tienen la capacidad de provocar infección por ingestión o manipulación (Manyi-Loh *et al.*, 2018). El peligro indirecto se debe a la posibilidad de transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones o integrones con genes de resistencia a antibióticos) desde bacterias no patógenas (comensales, probióticas o tecnológicas) hasta bacterias patógenas, transferencia que podría producirse en cualquier punto a lo largo de la cadena alimentaria (Lester *et al.*, 2006). La contribución relativa de cada etapa a este peligro indirecto de momento es casi desconocida, pero aun así los investigadores destacan la importancia del tracto intestinal de seres humanos y animales en la transferencia horizontal de los elementos genéticos involucrados en la resistencia a antibióticos (Capita González, 2013; Li *et al.*, 2010; Rolain, 2013).

3.2.4. Causas de la resistencia a antibióticos.

La resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales problemas de Salud Pública del siglo XXI, que amenaza la prevención y el tratamiento eficaces de una gama cada vez mayor de infecciones causadas por bacterias, parásitos, virus y hongos que ya no son sensibles a los medicamentos comunes utilizados para tratarlos. Durante varias décadas, en diversos grados, las bacterias que causan infecciones comunes o graves han desarrollado resistencia a cada nuevo antibiótico que llega al mercado. Ante este escenario, es necesario actuar para evitar una crisis mundial en el sistema sanitario (Prestinaci *et al.*, 2015)

El desarrollo de resistencia a antibióticos es un proceso esencialmente de selección darwiniana (Rosenblatt-Farrell, 2009), que en su mayoría produce ligeras disminuciones en la susceptibilidad a los antibióticos, junto con fenotipos que no se caracterizan precisamente como "resistencia"; y cambios repentinos, desde la total susceptibilidad a la total resistencia, que son impulsados por una amplia gama de mecanismos horizontales de transferencia de genes. Cuando las poblaciones microbianas se someten a un factor de estrés, como puede ser la presencia de un compuesto antimicrobiano, únicamente se va a producir la inactivación de aquellas bacterias que son susceptibles frente a la actividad del antimicrobiano utilizado. Debido a la presión selectiva, las bacterias resistentes van a sobrevivir y

multiplicarse, originando una progenie también resistente. Así, al cabo de un tiempo, la población original habrá sido sustituida por una población de microorganismos resistentes. Cuando los antimicrobianos se usan de forma incorrecta (por ejemplo, a dosis excesivamente bajas) aumentan las probabilidades de que las bacterias sobrevivan y se multipliquen.

El uso de antibióticos (tanto en poblaciones animales como en seres humanos) es un factor crítico para la selección de resistencias. Además, la Industria Alimentaria puede desempeñar un papel clave en la emergencia y diseminación de resistencia a antibióticos, por ejemplo, a través del uso de biocidas (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Los microorganismos resistentes, tanto patógenos como alterantes, pueden transmitirse a los seres humanos por contacto directo o por el consumo de alimentos contaminados. Los alimentos son la vía más importante, desde el punto de vista cuantitativo, de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos y de genes de resistencia de los animales al hombre, especialmente cuando no se respetan unas adecuadas prácticas higiénicas a lo largo de la cadena alimentaria (Van Den Bogaard y Stobberingh, 2000). En los últimos años se han incorporado pocos antibióticos al arsenal terapéutico y existe la necesidad de nuevos compuestos, debido a que los niveles de multiresistencia están aumentando en las bacterias. En casos de salmonelosis humana se ha detectado una alta tasa de resistencia a antibióticos como la ampicilina, sulfonamidas y tetraciclinas, mientras que la resistencia a las cefalosporinas de tercera generación es, en principio, baja. En cepas de *Salmonella* y *Escherichia coli* aisladas de pollos de engorde, pavos de engorde y su carne, la resistencia a la ampicilina, fluoroquinolonas, tetraciclinas y sulfonamidas se ha detectado frecuentemente. En los últimos años se ha detectado resistencia a la colistina, aunque en bajos niveles, en *Salmonella* y *E. coli* en carne de aves de corral y en *Salmonella* procedente de casos clínicos humanos (EFSA-ECDC, 2017, 2019).

Por otro lado, se debe tener presente la relación existente entre la resistencia a los antimicrobianos y la virulencia bacteriana, y la propagación de clones que combinan múltiples resistencias a los antibióticos y presentan un alto nivel de virulencia. También se debe tener en cuenta que los elementos genéticos móviles suelen portar tanto determinantes de resistencia como genes moduladores de la virulencia, lo que favorece la co-selección de ambos rasgos (Carlson *et al.*, 2007;

Introducción y Antecedentes

Doyle y Erickson, 2006; Giraud *et al.*, 2017). Todo incremento de la virulencia en bacterias patógenas va a suponer un peligro adicional, pudiendo afectar negativamente al resultado del tratamiento.

Un motivo especial de preocupación lo constituye el marcado incremento que en los últimos años ha experimentado la prevalencia de cepas multirresistentes y, sobre todo, de microorganismos panresistentes (con resistencia a todos los antibióticos disponibles), que suponen uno de los principales desafíos sanitarios del Siglo XXI.

4. Justificación y objetivos

La carne de aves de corral es el producto cárnico de mayor producción a nivel mundial y la segunda actividad cárnica mayoritaria en España, destacando la carne de pollo, que representa aproximadamente el 90% del total de la misma. Constituye, además, uno de los alimentos más consumidos a nivel mundial (FAOSTAT, 2018). Todo esto motiva que tanto para el Consumidor, como para la Industria y la Administración sea de vital importancia un estricto control de la calidad microbiológica, fisicoquímica y sensorial. Las poblaciones bacterianas en las canales de pollo están determinadas por el tipo de poblaciones de bacterias en el tracto gastrointestinal de las aves en la granja, así como de las bacterias que se agregan cuando se maneja el ave antes de su sacrificio y durante el faenado (Heredia y García, 2018; Thames y Sukumaran, 2020).

La presencia de *Salmonella*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes*, tanto en aves como en sus canales, causa preocupación desde el punto de vista productivo y desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria, ya que son los responsables de la mayoría de los brotes que se producen y declaran.

Para el control de *Salmonella* en los alimentos se emplean los datos derivados de la notificación obligatoria de los Estados Miembros según el Reglamento 2073/2005 de la UE sobre criterios microbiológicos. Estos datos son comunicados a la EFSA en relación con el cumplimiento de los criterios microbiológicos de *Salmonella*, lo cual permite hacer resúmenes descriptivos y monitorizar las tendencias a nivel de la Unión Europea (EFSA-ECDC, 2017).

La salmonelosis es una de las infecciones alimentarias más importantes en Europa, donde alcanzó en el año 2018 una ratio de 20,1 casos por cada 100.000 habitantes (91.857 casos confirmados) (EFSA-ECDC, 2019). Siendo los cinco serovares notificados más relevantes *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante monofásica 1,4,[5],12:i:-, *S. Infantis* y *S. Newport* (Cheng *et al.*, 2019).

La resistencia a los antibióticos constituye un problema creciente y de gran importancia en todo el mundo. La dificultad para tratar las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos implica unos costes adicionales considerables para los servicios de salud, además de tener un impacto importante en términos de morbilidad y mortalidad (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Las infecciones por salmonelas cursan como una gastroenteritis autolimitada, si bien el tratamiento antibiótico es requerido en casos graves, en pacientes inmunodeprimidos, con factores predisponentes de riesgo o en edades avanzadas (Nadi *et al.*, 2020). En este escenario, las cepas de *Salmonella* que presentan resistencia a antibióticos suponen un problema importante para la Salud Pública, al quedar invalidados como opción terapéutica muchos de los antibióticos que se usan de forma habitual en la práctica clínica.

Resulta preocupante el incremento de aislamientos de *Salmonella enterica* resistentes a algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento, en particular amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas. Además, es frecuente la aparición de multirresistencias (EFSA-ECDC, 2017). Los genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos, en bacterias filogenéticamente no relacionadas, demuestran ser idénticos, incluso en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (González *et al.*, 2004). La diseminación de este tipo de resistencias de manera horizontal está mediada por elementos genéticos móviles, como plásmidos, transposones e integrones.

El empleo de tratamientos antimicrobianos o descontaminantes es frecuente para reducir los niveles de microorganismos patógenos o alterantes en la carne o en la industria alimentaria. Algunos de los más frecuentemente empleados son el fosfato trisódico, el nitrito sódico y el hipoclorito sódico.

Investigaciones recientes sugieren que existe un vínculo directo entre la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos, ya que los mecanismos

Introducción y Antecedentes

que contribuyen a ambos, son similares; por ejemplo, los cambios en la permeabilidad celular o la síntesis de las bombas de expulsión (Alonso-Calleja *et al.*, 2015; Alonso-Hernando *et al.*, 2010; Capita *et al.*, 2014, 2019; Ortega Morente *et al.*, 2013). En esta línea, estudios previos realizados en enterobacterias (*Escherichia coli* y *Salmonella enterica*) ponen de manifiesto que la exposición repetida a dosis subinhibitorias de desinfectantes desencadena una adaptación de las poblaciones bacterianas a los biocidas, al tiempo que modifica el patrón de resistencia a los antibióticos de las cepas (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Capita y Alonso-Calleja, 2013; Capita *et al.*, 2013, 2019; Humayoun *et al.*, 2018; Sheridan *et al.*, 2012). Los biocidas tales como los compuestos de amonio cuaternario, la clorhexidina, o el fosfato trisódico, entre otros, se usan ampliamente para prevenir la contaminación bacteriana en la Industria Alimentaria, en entornos clínicos y agrícolas. Sin embargo, la eliminación de estas bacterias transmitidas por los alimentos es difícil debido a la dificultad de alcanzar en todas las zonas las dosis adecuadas de los desinfectantes como consecuencia de una limpieza insuficiente antes de la desinfección (Gadea *et al.*, 2016; Mavri y Smole Možina, 2013). Bajo tales condiciones, las bacterias están expuestas regularmente a concentraciones subletales de desinfectantes, y esto puede contribuir a la adaptación de bacterias inicialmente susceptibles (Mavri y Smole Možina, 2013).

Durante el proceso de la adaptación bacteriana a los biocidas pueden darse de forma conjunta múltiples mecanismos, tales como la modificación de la estructura y composición de la membrana celular, los cambios en la fluidez de la membrana, la formación de biopelículas, la adquisición de genes que codifican para la síntesis de bombas de expulsión o la sobreexpresión de las bombas de expulsión y la biodegradación (Gadea *et al.*, 2016, 2017).

Entre los mecanismos de resistencia microbiana que se pueden generar destaca, en *Salmonella*, la formación de biofilm, cuya repercusión es especialmente importante en el ámbito de la Industria Alimentaria, ya que si fallan los mecanismos de control y eliminación estas estructuras pueden representar un problema. Por ello, cada industria debería involucrarse en la investigación y desarrollo de su propia tecnología dependiendo de las variables inherentes a sus procesos (Domínguez *et al.*, 2010).

Por todo ello, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral fue evaluar la influencia de la exposición de *Salmonella enterica* a concentraciones crecientes subinhibitorias de tres biocidas de uso habitual en la industria alimentaria, el fosfato trisódico, el nitrito sódico y el hipoclorito sódico, sobre la emergencia de resistencias a antibióticos y sobre algunos de los posibles mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias ante tales circunstancias, como la formación de biofilms, la modificación de su hidrofobicidad superficial o la expresión incrementada de bombas de expulsión activa.

Para la consecución de este objetivo general, se han establecido los siguientes **objetivos específicos**:

- Realizar una caracterización fenotípica y genotípica de resistencia a diversos antibióticos y determinar el perfil de virulencia en una colección de cepas de *Salmonella enterica* aisladas de carne de ave.
- Seleccionar las cepas que resultaron ser más relevantes por poseer un mayor número de resistencias o por pertenecer a alguno de los serotipos implicados con mayor frecuencia en casos de salmonelosis humana, y someterlas a concentraciones subinhibitorias de los biocidas para determinar cómo estos tratamientos afectan a sus perfiles fenotípicos y genotípicos de resistencia, y a sus factores de virulencia.
- Por último, determinar, en diferentes serotipos de *Salmonella enterica*, el efecto de la adaptación y/o exposición a los biocidas sobre los mecanismos de resistencia, tales como la capacidad de formación de biofilm, cambios en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y la actuación de las bombas de expulsión, además de determinar cómo estos tratamientos influyen sobre su cinética de crecimiento.

5. BIBLIOGRAFÍA

Achtman, M., Wain, J., Weill, F.X., Nair, S., Zhou, Z., Sangal, V., Krauland, M.G., Hale, J.L., Harbottle, H., Uesbeck, A., Dougan, G., Harrison, L.H., Brisse, S., 2012. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathogens* **8** (6), e1002776. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002776>

Adedeji, W., 2016. The Treasure Called Antibiotics. *Annals of Ibadan Postgraduate Medicine* **14** (2), 56–57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5354621/>

Alanis, A.J., 2005. Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* **36** (6), 697–705. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.06.009>

Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.012>

Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology* **137** (2-3), 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.022>

Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 2009. Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *Journal of Microbiology* **47** (2), 142–146. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0237-5>

Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. (2009). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20** (12), 1108–1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>

Alós, J.I., 2015. Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **33** (10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>

Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R., Bernardo, A.,

2008. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella* Typhimurium in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *International Journal of Food Microbiology* **123** (3), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.015>

Aminov, R., 2017. History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology* **133**, 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001>

Andersen, E.V.M., 2016. Bacterial Resistance to Biocides, pp. 603–616. In: Lelieveld, H.L.M., Holah, J.G.D. (eds.), *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*. Woodhead Publishing (Elsevier), Amsterdam. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100155-4.00039-X>

Andino, A., Hanning, I., 2015. *Salmonella enterica*: Survival, colonization, and virulence differences among serovars. *The Scientific World Journal* **2015**, 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>

Ashton, P.M., Nair, S., Peters, T.M., Bale, J.A., Powell, D.G., Painset, A., Tewolde, R., Schaefer, U., Jenkins, C., Dallman, T.J., De Pinna, E.M., Grant, K.A., 2016. Identification of *Salmonella* for public health surveillance using whole genome sequencing. *PeerJ* **4**, e1752. <https://doi.org/10.7717/peerj.1752>

Azimi, T., Zamirnasta, M., Sani, M.A., Dallal, M.M.S., Nasser, A., 2020. Molecular mechanisms of *Salmonella* effector proteins: A comprehensive review. *Infection and Drug Resistance* **13**, 11–26. <https://doi.org/10.2147/IDR.S230604>

Aziz, S.A.A., Abdel-Latef, G.K., Shany, S.A.S., Roubay, S.R., 2018. Molecular detection of integron and antimicrobial resistance genes in multidrug resistant *Salmonella* isolated from poultry, calves and human in Beni-Suef governorate, Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences* **7** (4), 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.06.005>

Baumler, A.J., Heffron, F., 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDEF*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Bacteriology* **177** (8), 2087–2097. <https://doi.org/10.1128/jb.177.8.2087-2097.1995>

Bertani, B., Ruiz, N., 2018. Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus* **8** (1), 1–33. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0001-2018>

BOE- *Boletín Oficial del Estado*-, 1993. Real Decreto 349/1993, de 5 de marzo, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Lejías aprobada por el Real Decreto 3360/1983, de 30 de noviembre. *BOE* nº **94** (20-04-

Introducción y Antecedentes

1993), 11575–11578.

Boeris, P.S., Domenech, C.E., Lucchesi, G.I., 2007. Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *Journal of Applied Microbiology* **103** (4), 1048–1054. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03346.x>

Bohrer, B.M., 2017. Review: Nutrient density and nutritional value of meat products and non-meat foods high in protein. *Trends in Food Science and Technology* **65**, 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.04.016>

Braoudaki, M., Hilton, A.C., 2004. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (1), 73–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.73-78.2004>

Buzón Durán, L. (2017). Resistencia a antibióticos y capacidad para formar *biofilm* en cepas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a la metilina) y *Salmonella* de origen alimentario. Tesis Doctoral por “Compendio de Publicaciones”. Calificación: Sobresaliente *cum laude* por unanimidad. PREMIO EXTRAORDINARIO de Doctorado. Directores: Dres. Carlos Alonso Calleja y Rosa Capita González. Universidad de León, León.

Cabral, J.P.S., 2010. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **7** (10), 3657–3703. <https://doi.org/10.3390/ijerph7103657>

Cabrera, E.C.M.S., Gomez, F.R.B.S., Zúñiga, E.A., 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes. *Colombia Medica* **38** (2), 149–158.

Calvo, J., Martínez-Martínez, L., 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **27** (1), 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>

Cao, G., Allard, M., Strain, E., Stones, R., Zhao, S., Brown, E., Meng, J., 2014. Genetic diversity of *Salmonella* pathogenicity islands SPI-5 and SPI-6 in *Salmonella* Newport. *Foodborne Pathogens and Disease* **11** (10), 798–807. <https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1784>

Capita González, R., 2013, *Papel de la Industria Alimentaria en el control de la resistencia bacteriana a los antibióticos*. Discurso de Toma de Posesión en la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León (AVETCyL). Universidad de

León, León. ISBN: 978-84-9773-655-8.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53** (1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>

Capita, R., Álvarez-Fernández, E., Fernández-Buelta, E., Manteca, J., Alonso-Calleja, C. (2013). Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry. *Food Microbiology* **34** (1), 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.011>

Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (4), 1268–1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>

Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C., 2019. Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**, 15905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>

Carlson, S.A., Sharma, V.K., McCuddin, Z.P., Rasmussen, M.A., Franklin, S.K., 2007. Involvement of a *Salmonella* genomic island 1 gene in the rumen protozoan-mediated enhancement of invasion for multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* **75** (2), 792–800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00679-06>

Carocho, M., Morales, P., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science and Technology* **71**, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>

CDC- Centers for Disease Control and Prevention-, 2013. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2011. Atlanta, Georgia (USA).

Chahales, P., Thanassi, D.G., 2015. Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum* **3** (5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0018-2013>

Chapman, J.S., 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51** (4), 271–

Introducción y Antecedentes

276. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00044-1](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00044-1)

Cheng, R.A., Eade, C.R., Wiedmann, M., 2019. Embracing diversity: Differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal *Salmonella* as a foodborne pathogen. *Frontiers in Microbiology* **10**, 1368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01368>

Clouthler, S.C., Collinson, S.K., Kay, W.W., 1994. Unique fimbriae-like structures encoded by sefD of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella enteritidis*. *Molecular Microbiology* **12** (6), 893–903. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01077.x>

Cloutier, M.J., 1995. Antibiotics: Mechanisms of Action and the Acquisition of resistance - when magic bullets lose their magic. *American Journal of Pharmaceutical Education* **59**, 167–172. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.491.2900&rep=rep1&type=pdf>

Collinson, S.K., Liu, S.L., Clouthier, S.C., Banser, P.A., Doran, J.L., Sanderson, K.E., Kay, W.W., 1996. The location of four fimbrin-encoding genes, agfA, fimA, sefA and sefD, on the *Salmonella enteritidis* and/or *S. Typhimurium* XbaI-BlnI genomic restriction maps. *Gene* **169** (1), 75–80. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00763-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00763-6)

Coque, T.M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J.C., Baquero, F., Cantón, R., 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46** (2), 500–510. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.500-510.2002>

Costa, L.F., Paixão, T.A., Tsolis, R.M., Bäumler, A.J., Santos, R.L., 2012. Salmonellosis in cattle: Advantages of being an experimental model. *Research in Veterinary Science* **93**, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.03.002>

Davidson, P.M., Cekmer, H.B., Monu, E.A., Techathuvanan, C., 2015. The use of natural antimicrobials in food: An overview, pp. 1–27. In: Taylor, T.M. (Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Woodhead Publishing (Elsevier), Amsterdam.

Davidson, P.M., Harrison, M.A., 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology* **56** (11), 69–78.

Davies, R., Wales, A., 2019. Antimicrobial Resistance on Farms: A Review Including Biosecurity and the Potential Role of Disinfectants in Resistance Selection. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **18** (3), 753–774. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12438>

De Smet, S., Vossen, E., 2016. Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science* **120**, 145–156. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.04.008>

Demczuk, W., Soule, G., Clark, C., Ackermann, H.W., Easy, R., Khakhria, R., Rodgers, F., Ahmed, R., 2003. Phage-based typing scheme for *Salmonella enterica* serovar Heidelberg, a causative agent of food poisonings in Canada. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (9), 4279–4284. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4279-4284.2003>

Denyer, S.P., Maillard, J.-Y., 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* **92** (1), 25S-45S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.7.x>

Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., Bonnet, R., 2020. Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology* **11**, 2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>

Domínguez, L., Badiola, J.J., Cepeda, A., Más, A., Rodríguez, E., Zurera, G., Téllez, S., 2010. AESAN biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria. *Revista del Comité Científico AESAN* **12** (1), 37–61.

Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15** (2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>

Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2006. Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science* **74** (1), 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.009>

Durich, J.O., 2000. Resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos. *Medicina Clínica* **36** (10), 367–370.

Echeverz, M., García, B., Sabalza, A., Valle, J., Gabaldón, T., Solano, C., Lasa, I., 2017. Lack of the PGA exopolysaccharide in *Salmonella* as an adaptive trait for survival in the host. *PLOS Genetics* **13** (5), e1006816.

Introducción y Antecedentes

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006816>

EFSA-ECDC -*European Food Safety Authority - European Centre for Disease Prevention and Control*-, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* **13** (1), 1–165. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>

EFSA-ECDC -*European Food Safety Authority - European Centre for Disease Prevention and Control*-, 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* **15** (12), 1–228. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

EFSA-ECDC -*European Food Safety Authority- European Centre for Disease Prevention and Control*-, 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal* **17** (12), 1–276. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

Egan, A.J.F., Errington, J., Vollmer, W., 2020. Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nature Reviews Microbiology* **18** (8), 446–460. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0366-3>

Emamalipour, M., Seidi, K., Zununi Vahed, S., Jahanban-Esfahlan, A., Jaymand, M., Majdi, H., Amoozgar, Z., Chitkushev, L.T., Javaheri, T., Jahanban-Esfahlan, R., Zare, P., 2020. Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 229. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00229>

Estrela, C., Estrela, C.R.A., Barbin, E.L., Spanó, J.C.E., Marchesan, M.A., Pécora, J.D., 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal* **13** (2), 113–117. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402002000200007>

Estrela, C., Ribeiro, R.G., Estrela, C.R.A., Pécora, J.D., Sousa-Neto, M.D., 2003. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal* **14** (1), 58–62. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402003000100011>

FAOSTAT -*Food and Agriculture Organization of the United Nations*- (2018). Base de datos estadísticos de producción-cantidad de ganadería primaria. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QL> . Fecha de último acceso: 9 de diciembre de 2020.

FAO-WHO -*Food and Agriculture Organization- World Health Organization*-, 2017. *Evaluation of certain contaminants in food*, WHO Technical Report Series. FAO, Rome.

Farrell, D., 2013. *Poultry Development Review, The role of poultry in human nutrition*. FAO, Rome.

Fernández-Villa, D., Aguilar, M.R., Rojo, L., 2019. Folic acid antagonists: Antimicrobial and immunomodulating mechanisms and applications. *International Journal of Molecular Sciences* **20** (20), 4996. <https://doi.org/10.3390/ijms20204996>

Fernández-Márquez, M.L., Grande-Burgos, M.J., López-Aguayo, M.C., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R., 2017. Characterization of biocide-tolerant bacteria isolated from cheese and dairy small-medium enterprises. *Food Microbiology* **62**, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.008>

Ferrari, R.G., Panzenhagen, P.H.N., Conte-Junior, C.A., 2017. Phenotypic and genotypic eligible methods for *Salmonella* Typhimurium source tracking. *Frontiers in Microbiology* **8**, 2587. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02587>

Figuroa Ochoa, I.M., Verdugo Rodríguez, A., 2005. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología* **47** (1–2), 25–42.

Foley, S.L., Johnson, T.J., Ricke, S.C., Nayak, R., Danzeisen, J., 2013. *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77** (4), 582–607. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00015-13>

Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science* **86** (14), E149–E162. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0464>

Fookes, M., Schroeder, G.N., Langridge, G.C., Blondel, C.J., Mammina, C., Connor, T.R., Seth-Smith, H., Vernikos, G.S., Robinson, K.S., Sanders, M., Petty, N.K., Kingsley, R.A., Bäumlér, A.J., Nuccio, S.P., Contreras, I., Santiviago, C.A., Maskell, D., Barrow, P., Humphrey, T., Nastasi, A., Roberts, M., Frankel, G., Parkhill, J., Dougan, G., Thomson, N.R., 2011. *Salmonella bongori* Provides Insights into the Evolution of the *Salmonellae*. *PLoS Pathogens* **7** (8), e1002191. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002191>

Furuya, E.Y., Lowy, F.D., 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology* **4** (1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>

Gadea, R., Fernández-Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E., 2016. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods:

Introducción y Antecedentes

Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International* **85**, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.033>

Gadea, R., Fernández-Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E., 2017. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology* **63**, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.037>

Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G., Lansing, E., 2004. *Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., Bergey's Manual Trust. Springer-Verlag, New York. <https://doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>

Gilbert, P., McBain, A.J., 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **16** (2), 189–208. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.189-208.2003>

Gilbert, P., Moore, L.E., 2005. Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology* **99** (4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>

Giner-Lamia, J., Vinuesa, P., Betancor, L., Silva, C., Bisio, J., Soletto, L., Chabalgoity, J.A., Puente, J.L., Soncini, F.C., García-Vescovi, E., Flores, G., Pedraza, J., Yim, L., García, C., Astocondor, L., Ochoa, T., Hinostroza, N., Graciela Pucciarelli, M., Hernández-Alvarez, A., Del Moral, V., García-Del Portillo, F., 2019. Genome analysis of *Salmonella enterica* subsp. diarizonae isolates from invasive human infections reveals enrichment of virulence-related functions in lineage ST1256. *BMC Genomics* **20**, 99. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5352-z>

Giraud, E., Rychlik, I., Cloeckert, A., 2017. Editorial: Antimicrobial resistance and virulence common mechanisms. *Frontiers in Microbiology* **8**, 310. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00310>

Godlewska, R., Wiśniewska, K., Pietras, Z., Jagusztyn-Krynicka, E.K., 2009. Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: Function, structure, role in pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis: Minireview. *FEMS Microbiology Letters* **298** (1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01659.x>

Gomes, I.B., Simões, M., Simões, L.C., 2016. The effects of sodium hypochlorite against selected drinking water-isolated bacteria in planktonic and

sessile states. *Science of the Total Environment* **565**, 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.136>

González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., Domínguez, M., 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile* **132**, 619–626.

Goudarzi, M., Navidinia, M., 2019. Overview perspective of bacterial strategies of resistance to biocides and antibiotics. *Archives of Clinical Infectious Diseases* **14**(2), e65744. <https://doi.org/10.5812/archcid.65744>

Grimont, P.A.D., Weill, F.-X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur. Paris.

Groisman, E.A., Blanc-Potard, A.-B., Uchiya, K., 1999. Pathogenicity Islands and the Evolution of *Salmonella* Virulence, pp. 127–150. In: Kaper, J.B., Hacker, J. (eds.), *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Guerra, B., Soto, S., Helmuth, R., Mendoza, M.C., 2002. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46** (9), 2977–2981.
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.9.2977-2981.2002>

Guilhelmelli, F., Vilela, N., Albuquerque, P., Derengowski, L. da S., Silva-Pereira, I., Kyaw, C.M., 2013. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Frontiers in Microbiology* **4**, 353. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00353>

Gunn, J.S., Marshall, J.M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R.C., Ryan, E.T., 2014. *Salmonella* chronic carriage: epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends in Microbiology* **22** (11), 648–655.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.06.007>

Guo, L., Sun, Y., Zhu, Y., Wang, B., Xu, L., Huang, M., Li, Y., Sun, J., 2020. The antibacterial mechanism of ultrasound in combination with sodium hypochlorite in the control of *Escherichia coli*. *Food Research International* **129**, 108887.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108887>

Hacker, J., Carniel, E., 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO Reports* **2** (5), 376–381.

Introducción y Antecedentes

<https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve097>

Hatanaka, N., Awasthi, S.P., Goda, H., Kawata, H., Uchino, Y., Kubo, T., Aoki, S., Hinenoya, A., Yamasaki, S., 2020. Chlorous acid is a more potent antibacterial agent than sodium hypochlorite against *Campylobacter*. *Food Control* **111**, 107046. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107046>

Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology* **294**, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>

Heredia, N., García, S., 2018. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition* **4** (3), 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>

Herrera-León, S., McQuiston, J.R., Usera, M.A., Fields, P.I., Garaizar, J., Echeita, M.A., 2004. Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **42** (6), 2581–2586. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.6.2581-2586.2004>

Herrero-Fresno, A., Olsen, J.E., 2018. *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host – A mini-review. *Food Microbiology* **71**, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.04.016>

Horsch, A.M., Sebranek, J.G., Dickson, J.S., Niebuhr, S.E., Larson, E.M., Lavieri, N.A., Ruther, B.L., Wilson, L.A., 2014. The effect of pH and nitrite concentration on the antimicrobial impact of celery juice concentrate compared with conventional sodium nitrite on *Listeria monocytogenes*. *Meat Science* **96** (1), 400–407. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.07.036>

Humayoun, S.B., Hiott, L.M., Gupta, S.K., Barrett, J.B., Woodley, T.A., Johnston, J.J., Jackson, C.R., Frye, J.G., 2018. An assay for determining the susceptibility of *Salmonella* isolates to commercial and household biocides. *PLoS ONE* **13** (12): e0209072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209072>

Hurley, D., McCusker, M.P., Fanning, S., Martins, M., 2014. *Salmonella*-host interactions - modulation of the host innate immune system. *Frontiers in Immunology* **5**, 481. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00481>

Hurtado-Escobar, G.A., Grépinet, O., Raymond, P., Abed, N., Velge, P., Virlogeux-Payant, I., 2019. H-NS is the major repressor of *Salmonella* Typhimurium Pef fimbriae expression. *Virulence* **10** (1), 849–867. <https://doi.org/10.1080/21505594.2019.1682752>

IFT (IFT Experts Report Panellist), 2006. Resistance: Implications for the Food System. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5** (3), 71–137. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00004.x>

Inetianbor, J.E., Yakubu, J.M., Ezeonu, S.C., 2015. Effects of Food Additives and Preservatives on Man- a Review. *Asian Journal of Science and Technology* **6** (2), 1118–1135.

Jajere, S.M., 2019. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World* **12** (4), 504–521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

Jang, H., Rusconi, R., Stocker, R., 2017. Biofilm disruption by an air bubble reveals heterogeneous age-dependent detachment patterns dictated by initial extracellular matrix distribution. *NPJ Biofilms and Microbiomes* **3**, 6. <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0014-5>

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A., 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* **33** (3), 300–305.

Kaufman, G. 2011. Antibiotics: mode of action and mechanisms of resistance. *Nursing Standard (Royal College of Nursing (Great Britain))* **25** (42), 49–55. <https://doi/10.7748/ns.25.42.49.s52>. PMID: 21826872.

Kaur, J., Jain, S.K., 2012. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its pathogenesis. *Microbiological Research* **167** (4), 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.08.001>

Kempf, I., Zeitouni, S., 2012. Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: Analyse et conséquences. *Pathologie Biologie* **60** (2), 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.10.013>

Khan, C.M.A., 2014. The Dynamic Interactions between *Salmonella* and the Microbiota, within the Challenging Niche of the Gastrointestinal Tract. *International Scholarly Research Notices* **2014**, 846049. <https://doi.org/10.1155/2014/846049>

Kim, M., Park, S.Y., Ha, S. Do, 2016. Synergistic effect of a combination of ultraviolet-C irradiation and sodium hypochlorite to reduce *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel and eggshell surfaces. *Food Control* **70**, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.003>

Kintz, E., Heiss, C., Black, I., Donohue, N., Brown, N., Brown, N., Davies,

Introducción y Antecedentes

M.R., Azadi, P., Baker, S., Kaye, P.M., van der Woude, M., 2017. *Salmonella enterica* Serovar Typhi Lipopolysaccharide O-Antigen Modification Impact on Serum Resistance and Antibody Recognition. *Infection and Immunity* **85** (4), e01021-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.01021-16>

Knuff-Janzen, K., Tupin, A., Yurist-Doutsch, S., Rowland, J.L., Finlay, B.B., 2020. Multiple *Salmonella*-pathogenicity island 2 effectors are required to facilitate bacterial establishment of its intracellular niche and virulence. *PLoS ONE* **15** (6), e0235020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235020>

Kurtz, J.R., Goggins, J.A., McLachlan, J.B., 2017. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters* **190**, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.07.006>

Lamas, A., Miranda, J.M., Regal, P., Vázquez, B., Franco, C.M., Cepeda, A., 2018. A comprehensive review of non-enterica subspecies of *Salmonella enterica*. *Microbiological Research* **206**, 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>

Lasa, I., Del Pozo, J.L., Penadés, J.R., Leiva, J., 2005. Bacterial biofilms and infection. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* **28** (2), 163–176.

Ledeboer, N.A., Jones, B.D., 2005. Exopolysaccharide Sugars Contribute to Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium on HEp-2 Cells and Chicken Intestinal Epithelium **187** (9), 3214–3226. <https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3214>

Lelièvre, V., Besnard, A., Schlusshuber, M., Desmasures, N., Dalmaso, M., 2019. Phages for biocontrol in foods: What opportunities for *Salmonella* spp. control along the dairy food chain? *Journal of Food Microbiology* **78**, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.10.009>

Lester, C.H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T.L., Monnet, D.L., Hammerum, A.M., 2006. In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50** (2), 596–599. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.2.596-599.2006>

Livermore, D.M., 1995. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **8** (4), 557–584. <https://doi.org/10.1128/cmr.8.4.557-584.1995>

Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J.A., Franco, D., 2018. Main groups of microorganisms of relevance for food safety and

stability: General aspects and overall description, pp. 53–107. In: Barba, F.J., Sant'Ana, A.S., Orlie, V., Koubaa, M. (eds.), *Innovative Technologies for Food Preservation: Inactivation of Spoilage and Pathogenic Microorganisms*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts (USA). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>

Lou, L., Zhang, P., Piao, R., Wang, Y., 2019. *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1) and Its Complex Regulatory Network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **9**, 270. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00270>

Ly, K.T., Casanova, J.E., 2007. Mechanisms of *Salmonella* entry into host cells. *Cellular Microbiology* **9** (9), 2103–2111. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00992.x>

MacGowan, A., Macnaughton, E., 2017. Antibiotic resistance. *Medicine* **45**, 622–628. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.958>

Maldonado, R.F., Sá-Correia, I., Valvano, M.A., 2016. Lipopolysaccharide modification in gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiology Reviews* **40** (4), 480–493. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>

Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., Okoh, A., 2018. Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules* **23** (4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España), 2020. Avícola de carne. En: <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/avicola-de-carne/> (fecha último acceso 15-12-2020).

Marchetti, M., Errecalde, J., Mestorino, N., 2011. Resistencia bacteriana a Los antimicrobianos ocasionada por bombas de Eflujo. Impacto en la Multirresistencia. *Analecta Veterinaria* **31** (2), 40–53. En http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/11280/Documento_completo.pdf?sequence=1 (fecha último acceso 21-12-2020).

Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., Finlay, B.B., 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection* **2** (2), 145–156. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)

Martínez, N., 2007. *Virulencia, resistencia y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de Salmonella enterica*. Tesis Doctoral, Universidad de

Introducción y Antecedentes

Oviedo, Oviedo.

Maruzani, R., Sutton, G., Nocerino, P., Marvasi, M., 2019. Exopolymeric substances (EPS) from *Salmonella enterica*: polymers, proteins and their interactions with plants and abiotic surfaces. *Journal of Microbiology* **57** (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8353-y>

Mavri, A., Smole-Možina, S., 2013. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *International Journal of Food Microbiology* **160** (3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.006>

McAfee, A.J., McSorley, E.M., Cuskelly, G.J., Moss, B.W., Wallace, J.M.W., Bonham, M.P., Fearon, A.M., 2010. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Science* **84** (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.029>

McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **12** (1), 147–179.

McGhie, E.J., Brawn, L.C., Hume, P.J., Humphreys, D., Koronakis, V., 2009. *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Current Opinion in Microbiology* **12** (1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.12.001>

McInnes, R.S., McCallum, G.E., Lamberte, L.E., van Schaik, W., 2020. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in the human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology* **53**, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.02.002>

Meloni, E., Colucci, A.M., Micoli, F., Sollai, L., Gavini, M., Saul, A., Di Cioccio, V., MacLennan, C.A., 2015. Simplified low-cost production of O-antigen from *Salmonella* Typhimurium Generalized Modules for Membrane Antigens (GMMA). *Journal of Biotechnology* **198**, 46–52. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.020>

Milićević, D., Vranić, D., Mašić, Z., Parunović, N., Trbović, D., Nedeljković-Trailović, J., Petrović, Z., 2014. The role of total fats, saturated/unsaturated fatty acids and cholesterol content in chicken meat as cardiovascular risk factors. *Lipids in Health and Disease* **13** (1), 42. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-13-42>

Millward, D.J., Garnett, T., 2010. Plenary lecture 3 - Food and the planet: Nutritional dilemmas of greenhouse gas emission reductions through reduced intakes of meat and dairy foods. *Proceedings of the Nutrition Society* **69** (1), 103–118. <https://doi.org/10.1017/S0029665109991868>

Misra, S., Sharma, V., Srivastava, A.K., 2015. Bacterial Polysaccharides: An Overview, pp. 81–108. In: Ramawat, K.G., Mérillon, J.-M. (eds.), *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology*. Springer, Switzerland, <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0>

Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R., 2014. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**, 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>

Morales-López, S., Yepes, J.A., Prada-Herrera, J.C., Torres-Jiménez, A., 2019. Review *Enterobacteria* in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. *The Journal of Infection in Developing Countries* **13** (4), 265–273. <https://doi.org/10.3855/jidc.11216>

Mortensen, H.D., Jacobsen, T., Koch, A.G., Arneborg, N., 2008. Intracellular pH homeostasis plays a role in the tolerance of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to acidified nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (15), 4835–4840. <https://doi.org/10.1128/AEM.00571-08>

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J.L., Ochoa, T.J., 2011. Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* **28** (4), 648–656. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2011.284.430>

Mühlig, A., Behr, J., Scherer, S., Müller-Herbst, S., 2014. Stress response of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to acidified nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (20), 6373–6382. <https://doi.org/10.1128/AEM.01696-14>

Munir, M.U., Ahmed, A., Usman, M., Salman, S., 2020. Recent advances in nanotechnology-aided materials in combating microbial resistance and functioning as antibiotics substitutes. *International Journal of Nanomedicine* **15**, 7329–7358. <https://doi.org/10.2147/IJN.S265934>

Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* **4** (2), 10:1128. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A., 2017. Enterobacteriaceae, pp. 258- 272. In: *Medical Microbiology*. Elsevier , Philadelphia.

Introducción y Antecedentes

Nadi, Z.R., Salehi, T.Z., Tamai, I.A., Foroushani, A.R., Sillanpaa, M., Soltan-Dallal, M.M., 2020. Evaluation of antibiotic resistance and prevalence of common *Salmonella enterica* serovars isolated from foodborne outbreaks. *Microchemical Journal* **155**, 104660. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104660>

OJEU -*Official Journal of the European Union*-, 2012. Reglamento (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012 relativo a la comercialización y el uso de los biocidas. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L167**, 1–123.

OJEU -*Official Journal of the European Union*-, 2008. Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. *Diario Oficial de la Unión Europea* **L354**, 16–33.

Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande-Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A., 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **162** (1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B.R., Lin, T.J., Cheng, Z., 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances* **37** (1), 177–192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>

Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., Jensen, S.O., 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **31** (4), 00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>

Paul, D., Chakraborty, R., Mandal, S.M., 2019. Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **174**, 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.083>

Pereira, P.M. de C.C., Vicente, A.F. dos R.B., 2013. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* **93** (3), 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.018>

Peterson, E., Kaur, P., 2018. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology* **9**, 2928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>

Petsong, K., Benjakul, S., Chaturongakul, S., Switt, A.I.M., Vongkamjan, K.,

2019. Lysis profiles of *Salmonella* phages on *Salmonella* isolates from various sources and efficiency of a phage cocktail against *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium*. *Microorganisms* **7**, 100. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7040100>

Piddock, L.J., 2006. Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clinical Microbiology* **19** (2), 382–402. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.382>

Pinilla, G., Muñoz Molina, L., Gallego, E.A., Chavarro B., B., Fandiño, J., 2006. Presencia de integrones Clase 1 en aislamientos de *Staphylococcus epidermidis* de las unidades de neonatología del Instituto Materno Infantil de Bogotá. *Nova* **4** (6), 55–59. <https://doi.org/10.22490/24629448.361>

Podlesek, Z., Žgur Bertok, D., 2020. The DNA Damage Inducible SOS Response Is a Key Player in the Generation of Bacterial Persister Cells and Population Wide Tolerance. *Frontiers in Microbiology* **11**, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01785>

Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56** (1), 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>

Poole, K., 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology (Symposium Supplement)* **92** (1), 55–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.8.x>

Popoff, M.Y., Bockemühl, J., Gheesling, L.L., 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **155** (7), 568–570. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.04.005>

Porwollik, S., Boyd, E.F., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E., McClelland, M., 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology* **186** (17), 5883–5898. <https://doi.org/10.1128/JB.186.17.5883-5898.2004>

Prestinaci, F., Pezzotti, P., Pantosti, A., 2015. Antimicrobial resistance: A global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health* **109** (7), 309–318. <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>

Putman, M., van Veen, H.W., Konings, W.N., 2000. Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64** (4), 672–693. <https://doi.org/10.1128/mnbr.64.4.672-693.2000>

Raffatellu, M., Chessa, D., Wilson, R.P., Tükel, Ç., Akçelik, M., Bäumlner, A., 2006. Capsule-Mediated Immune Evasion: a New Hypothesis Explaining Aspects of Typhoid Fever Pathogenesis. *Infection and Immunity* **74** (1), 19–27.

Introducción y Antecedentes

<https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.19>

Reeves, M.W., Evins, G.M., Heiba, A.A., Plikaytis, B.D., Farmer, J.J.I., 1989. Clonal Nature of *Salmonella* Typhi and Its Genetic Relatedness to Other *Salmonellae* as Shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *Journal of Clinical Microbiology* **27** (2), 313–320.

Riel, G., Boulaaba, A., Popp, J., Klein, G., 2017. Effects of parsley extract powder as an alternative for the direct addition of sodium nitrite in the production of mortadella-type sausages – Impact on microbiological, physicochemical and sensory aspects. *Meat Science* **131**, 166–175.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.05.007>

Rodríguez Saucedo, E.N., 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* **7**, 153–170.
<https://doi.org/10.35197/rx.07.01.2011.14.er>

Rosenblatt-Farrell, N., 2009. The landscape of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* **117** (6), A244–A250.
<https://doi.org/10.1289/ehp.117-a244>

Russell, A.D., 2003. Biocide use and antibiotic resistance: The relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infectious Diseases* **3** (12), 794–803. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00833-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00833-8)

Russell, A.D., 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology (Symposium Supplement)* **92**(1), 121–135. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x>

Russell, A.D., 1997. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology* **83** (2), 155–165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00198.x>

Ryan, M.P., O'Dwyer, J., Adley, C.C., 2017. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. *BioMed Research International* **2017**, 3782182.
<https://doi.org/10.1155/2017/3782182>

Rychlik, I., Gregorova, D., Hradecka, H., 2006. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology* **112** (1), 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.030>

Sabaté, M., Prats, G., 2002. Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **20** (7), 341–345.

[https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(02\)72813-9](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(02)72813-9)

Santos, A.C. de M., Santos, F.F., Silva, R.M., Gomes, T.A.T., 2020. Diversity of Hybrid- and Hetero-Pathogenic *Escherichia coli* and Their Potential Implication in More Severe Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10**, 339.

<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00339>

SCENIHR- *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*-, 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. SCENIHR, Brussels.

Schmidt, H., Hensel, M., 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews* **17** (1), 14–56.

<https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14>

Schug, A.R., Bartel, A., Scholtzek, A.D., Meurer, M., Brombach, J., Hensel, V., Fanning, S., Schwarz, S., Feßler, A.T., 2020. Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Veterinary Microbiology* **248**, 108791. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108791>

Sefton, A.M., 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: Their clinical relevance in the new millennium. *Drugs* **62** (4), 557–566.

<https://doi.org/10.2165/00003495-200262040-00001>

Sheridan, À., Lenahan, M., Duffy, G., Fanning, S., Burgess, C., 2012. The potential for biocide tolerance in *Escherichia coli* and its impact on the response to food processing stresses. *Food Control* **26** (1), 98–106.

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.018>

Silva, C., Puente, J.L., Calva, E., 2017. *Salmonella* virulence plasmid: Pathogenesis and ecology. *Pathogens and Disease* **75** (6), 2012–2016.

<https://doi.org/10.1093/femspd/ftx070>

Soumet, C., Méheust, D., Pissavin, C., Le Grandois, P., Frémaux, B., Feurer, C., Le Roux, A., Denis, M., Maris, P., 2016. Reduced susceptibilities to biocides and resistance to antibiotics in food-associated bacteria following exposure to quaternary ammonium compounds. *Journal of Applied Microbiology* **121** (5), 1275–1281.

<https://doi.org/10.1111/jam.13247>

Stock, I., Wiedemann, B., 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* **16** (3), 211–217.

[https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00204-1)

Tattawasart, U., Maillard, J.Y., Furr, J.R., Russell, A.D., 1999. Comparative

Introducción y Antecedentes

responses of *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibacterial agents. *Journal of Applied Microbiology* **87** (3), 323–331. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00811.x>

Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* **34** (5), S3–S10. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>

Thames, H.T., Sukumaran, A.T., 2020. A review of *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler meat: Emerging challenges and food safety measures. *Foods* **9** (6), 776. <https://doi.org/10.3390/foods9060776>

Thomson, N.M., Ferreira, J.L., Matthews-Palmer, T.R., Beeby, M., Pallen, M.J., 2018. Giant flagellins form thick flagellar filaments in two species of marine γ -proteobacteria. *PLoS ONE* **13** (11), e0206544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206544>

Thorns, C.J., Turcotte, C., Gemmell, C.G., Woodward, M.J., 1996. Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella enteritidis*. *Microbial Pathogenesis* **20** (4), 235–246. <https://doi.org/10.1006/mpat.1996.0022>

Tindall, B.J., Grimont, P.A.D., Garrity, G.M., Euzéby, J.P., 2005. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55** (1), 521–524. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63580-0>

Urdaneta, V., Hernández, S.B., Casadesús, J., 2019. Mutational and non mutational adaptation of *Salmonella enterica* to the gall bladder. *Scientific Reports* **9**, 5203. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41600-8>

Vaarst, M., Steinfeldt, S., Horsted, K., 2015. Sustainable development perspectives of poultry production. *World's Poultry Science Journal* **71** (4), 609–620. <https://doi.org/10.1017/S0043933915002433>

Van Asten, A.J.A.M., Van Dijk, J.E., 2005. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **44** (3), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002>

Van Den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **14**, 327–335. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(00\)00145-x](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(00)00145-x)

Velge, P., Wiedemann, A., Rosselin, M., Abed, N., Boumart, Z., Chaussé,

A.M., Grépinet, O., Namdari, F., Roche, S.M., Rossignol, A., Virlogeux-Payant, I., 2012. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *MicrobiologyOpen* **1** (3), 243–258. <https://doi.org/10.1002/mbo3.28>

Virlogeux-Payant, I., Popoff, M.Y., 1996. The Vi antigen of *Salmonella* Typhi. *Bulletin de l'Institut Pasteur* **94** (3), 237–250. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1954.tb00308.x>

Wales, A.D., Davies, R.H., 2015. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics* **4** (4), 567–604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>

Webber, M.A., Piddock, L.J.V., 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51** (1), 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>

Werneburg, G.T., Thanassi, D.G., 2018. Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus* **8** (1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0007-2017>

White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Banser, P.A., Kay, W.W., 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Bacteriology* **185** (18), 5398–5407. <https://doi.org/10.1128/JB.185.18.5398-5407.2003>

WHO- World Health Organization-, 2016. *Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*. WHO, Genève (Ginebra, Suiza).

Winder, C.L., Al-Adham, I.S.I., Abdel Malek, S.M.A., Buultjens, T.E.J., Horrocks, A.J., Collier, P.J., 2000. Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Applied Microbiology* **89** (2), 289–295. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01119.x>

Won, G., Lee, J.H., 2016. Multifaceted immune responses and protective efficacy elicited by a recombinant autolyzed *Salmonella* expressing FliC flagellar antigen of F18+ *Escherichia coli*. *Vaccine* **34** (50), 6335–6342. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.10.066>

Wright, G.D., 2010. Q&A: Antibiotic resistance: Where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology* **8**, 123. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-123>

Wright, G.D., 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology* **7** (5), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.004>

Introducción y Antecedentes

Yin, W., Wang, Y., Liu, L., He, J., 2019. Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences* **20** (14), 3423. <https://doi.org/10.3390/ijms20143423>

Yue, M., Rankin, S.C., Blanchet, R.T., Nulton, J.D., Edwards, R.A., Schifferli, D.M., 2012. Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A model of macro- and microevolution. *PLoS ONE* **7** (6), e38596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038596>

Zur Wiesch, P.S., Engelstädter, J., Bonhoeffer, S., 2010. Compensation of fitness costs and reversibility of antibiotic resistance mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54** (5), 2085–2095. <https://doi.org/10.1128/AAC.01460-09>

Capítulo I

GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y FACTORES DE VIRULENCIA EN CEPAS DE *Salmonella enterica* AISLADAS DE CARNE DE AVE

1. INTRODUCCIÓN

La salmonelosis es una de las infecciones alimentarias más importantes en Europa, donde alcanzó en el año 2018 una incidencia de 20,1 casos por cada 100.000 habitantes (91.857 casos confirmados). La tendencia durante los últimos cinco años de casos de salmonelosis humana se ha estabilizado, si bien es cierto que se registró una tendencia decreciente, estadísticamente significativa, de casos de salmonelosis durante el período 2008-2014 (EFSA-ECDC, 2015). Aunque se ha reducido el número de salmonelosis durante los últimos años, *Salmonella enterica* sigue siendo una de las primeras causas de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (CNE-ISCI, 2017).

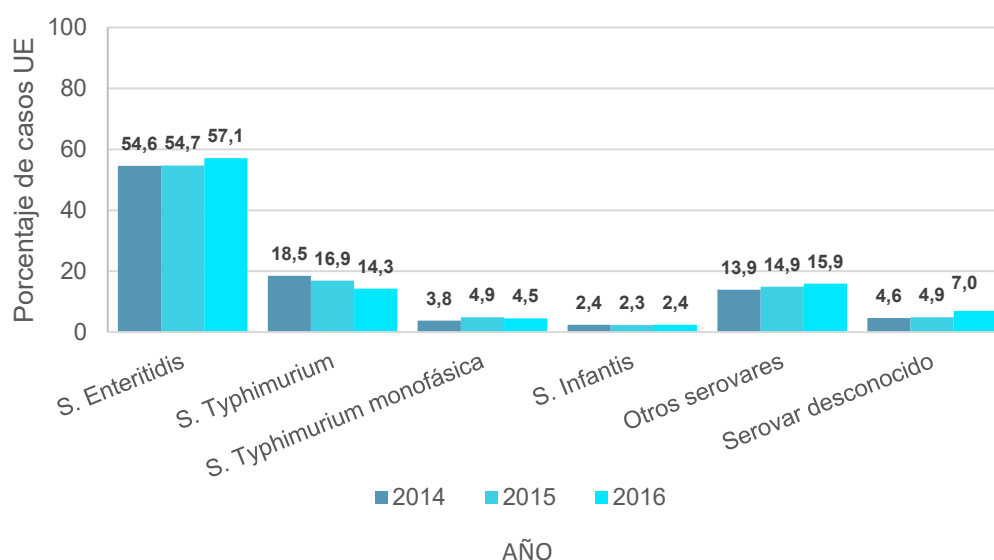


Figura I.1. Porcentaje de casos de salmonelosis en UE en función de los serotipos de *Salmonella enterica* durante el periodo 2014-2016 (Fuente: EFSA-ECDC, 2019).

Como puede apreciarse en la Figura I.1, de los serovares responsables de casos de salmonelosis humana confirmados, en el año 2016 los dos serovares de *Salmonella enterica* más prevalentes fueron *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium, que representaron el 57,1% y el 14,3%, respectivamente.

S. Enteritidis aumentó en comparación con los datos obtenidos en el año 2015 mientras que *S. Typhimurium*, incluyendo la variante monofásica *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:-, disminuyó. Los casos de *Salmonella* Infantis, el cuarto serovar más común, se han mantenido estables durante el periodo 2014-2016 (EFSA-ECDC, 2019).

Capítulo I

Las infecciones alimentarias por *Salmonella* cursan, habitualmente, como una gastroenteritis autolimitante, de manera que el tratamiento antibiótico sólo es requerido en casos graves, en pacientes inmunodeprimidos, con factores predisponentes de riesgo o en edades avanzadas (Nadi *et al.*, 2020). No obstante, es preocupante el incremento de aislamientos de *Salmonella enterica* resistentes a algunos de los antibióticos utilizados para el tratamiento empírico, en particular amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas. Además, es frecuente la aparición de resistencias múltiples. En 2017, el país con un mayor incremento porcentual fue Grecia, debido a que los test de susceptibilidad antimicrobiana se centraron en la variante monofásica de *S. Typhimurium* (EFSA-ECDC, 2017). La resistencia a β -lactámicos en *Salmonella enterica* es debida, principalmente, a la adquisición de enzimas β -lactamasas, siendo TEM-1, PSE-1 y OXA-1 las más frecuentemente detectadas y relacionadas con la resistencia a ampicilina (AMP) y AMC (De Toro *et al.*, 2014, 2010; Güerri *et al.*, 2004; Walsh *et al.*, 2008). Se ha demostrado que los genes que confieren resistencia a ciertos antibióticos, en bacterias filogenéticamente no relacionadas, pueden ser idénticos, incluso en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (González *et al.*, 2004). La diseminación de este tipo de resistencias de manera horizontal está mediada por elementos genéticos móviles o movilizables, como plásmidos, transposones e integrones. Los integrones son sistemas de recombinación específicos de sitio, siendo responsables del reconocimiento, captura y expresión de casetes génicos (Coque-González, 2005; Stalder *et al.*, 2012). Los integrones de clase 1 son los más frecuentemente descritos presentando, habitualmente, los genes *qacE_1* y *sul1* en su región 3'-conservada (3'-CS), aunque también se han descrito integrones no clásicos carentes de dicha región (Sáenz *et al.*, 2004; Stalder *et al.*, 2012). En la actualidad, los integrones de resistencia (IR) son considerados los principales responsables de la acumulación y diseminación de casetes de resistencia en el genoma bacteriano, habiendo despertado un gran interés por su implicación en la resistencia a nuevos antibióticos, como cefalosporinas de amplio espectro, carbapenémicos y quinolonas. También se han relacionado con la selección y dispersión epidémica de clones de determinadas especies bacterianas (*Salmonella enterica*, *Vibrio cholerae*). Resultando así particularmente atractiva la capacidad de los IR para generar estructuras formadas por la asociación de diversos elementos genéticos

de resistencia y/o virulencia (Coque-González, 2005).

La aparición a escala mundial de cepas de *S. Typhimurium* con fenotipo de pentarresistencia ACSSuT (resistencia a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclina), especialmente del fagotipo DT104 y fagotipos relacionados, se ha asociado principalmente con la presencia de los genes *blaPSE-1*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)* localizados en un integrón complejo de clase 1 denominado In104, el cual forma parte de una isla genómica de 43 kb denominada «*Salmonella Genomic Island type 1*» (SGI1). Sin embargo, también se han descrito variantes de la SGI1 surgidas en eventos de recombinación y asociadas a distintos fenotipos de resistencia (De Toro *et al.*, 2014).

Los microorganismos resistentes a antibióticos pueden transmitirse a los seres humanos por contacto directo o por el consumo de alimentos contaminados, los cuales son la vía más importante de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos y de genes de resistencia de los animales al hombre, especialmente cuando no se llevan a cabo unas adecuadas prácticas de higiene a lo largo de la cadena alimentaria (Van Den Bogaard y Stobberingh, 2000).

Recientemente, se ha descrito la relación entre resistencia a antibióticos y virulencia. Los factores de virulencia pueden encontrarse tanto formando parte de islas de patogenicidad como codificados en el cromosoma o en plásmidos (Huehn *et al.*, 2010). Tanto los factores de virulencia como los genes de resistencia a antibióticos pueden estar físicamente unidos en los mismos elementos genéticos móviles, transfiriéndose y expresándose de forma conjunta. Por todo ello, el incremento de la virulencia en bacterias patógenas puede suponer un peligro adicional, llegando a afectar negativamente al resultado del tratamiento farmacológico (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Carlson *et al.*, 2007; Doyle y Erickson, 2006).

El objetivo de este estudio fue llevar a cabo la caracterización fenotípica de resistencia a diversos antibióticos y posteriormente la caracterización genotípica y la determinación del perfil de virulencia en cepas de *Salmonella enterica* aisladas de carne de pollo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cepas

En este estudio se han utilizado 64 aislamientos de *Salmonella enterica* pertenecientes a 16 serotipos diferentes. Las cepas fueron aisladas con anterioridad a partir de carne de pollo y estaban disponibles en nuestro laboratorio. Se ha llevado a cabo una caracterización tanto fenotípica como genotípica de todas las cepas frente a un panel de 16 antimicrobianos. De todas las cepas ensayadas se seleccionaron las que presentaron un mayor número de resistencias para realizar un estudio más amplio de exposición de las mismas frente a un mayor número de antimicrobianos, resultados que se muestran en el Capítulo II de esta Memoria de Tesis Doctoral.

Los serotipos estudiados se detallan a continuación: *Salmonella* Agona (SA₁), *Salmonella* Anatum (SA₂), *Salmonella* Brandenburg (SB), *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Hadar (SH), *Salmonella* Infantis (SI), *Salmonella* Indiana (SI₁), *Salmonella* Poona (SP), *Salmonella* Newport (SN), *Salmonella* London (SL), *Salmonella* Typhimurium (ST), variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5],12:i:-) (S₁), *Salmonella* Kentucky (SK), *Salmonella* Thompson (ST₁), *Salmonella* Derby (SD), y *Salmonella* Virchow (SV). Las cepas se conservaron a -30 °C en Caldo Triptona Soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, England, Reino Unido) con un 20% (v/v) de glicerol. Para la realización de esta parte del trabajo las cepas se mantuvieron a 4±1 °C en placas de Agar Triptona Soja (TSA, Oxoid Ltd., Hampshire, England, Reino Unido).

2.2 Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Las cepas de *Salmonella* fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad frente a un panel de 16 antimicrobianos de importancia clínica utilizando la técnica de difusión por disco en Agar Mueller-Hinton (MHA, Oxoid), descrita por el *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (CLSI, 2015). En la Tabla I.1. se muestran los antibióticos empleados, que fueron los siguientes (Oxoid): ampicilina (10 µg), amikacina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), estreptomina (10 µg), sulfonamidas (300 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25 + 23,75 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) y cloranfenicol (30 µg).

Tabla I.1. Familias de antibióticos utilizados para analizar las 64 cepas de *Salmonella enterica*.

| Familia | Nombre | Abreviatura | Concentración |
|--|-------------------------------|-------------|---------------|
| Antibióticos | Ampicilina | AMP | 10 µg |
| β-lactámicos: Penicilinas | Amoxicilina/ácido clavulánico | AMC | 30 µg |
| Cefalosporinas de 2ª y 3ª generación (espectro extendido) | Cefoxitina | FOX | 30 µg |
| | Cefotaxima | CTX | 30 µg |
| | Ceftazidima | CAZ | 30 µg |
| Monobactamos | Aztreonam | ATM | 30 µg |
| Fenicoles | Cloranfenicol | CHL | 30 µg |
| Aminoglucósidos | Estreptomina | STR | 15 µg |
| | Amikacina | AMK | 30 µg |
| | Gentamicina | GEN | 10 µg |
| | Tobramicina | TOB | 10 µg |
| Quinolonas y Fluoroquinolonas | Ciprofloxacina | CIP | 5 µg |
| | Ácido nalidíxico | NAL | 30 µg |
| Inhibidores de la vía del folato | Trimetoprim/Sulfametoxazol | SXT | 1,25+23,75 µg |
| | Sulfonamidas | SUL | 300 µg |
| Tetraciclina | Tetraciclina | TET | 30 µg |

Las zonas de inhibición se midieron y clasificaron como sensibles, de sensibilidad intermedia o resistentes según las directrices del CLSI (2015).

2.3 Caracterización genotípica

La técnica elegida para realizar la extracción del DNA es relativamente compleja debido a que el método habitual de extracción del DNA en enterobacterias parece no ser muy eficaz para el estudio de *Salmonella*, ya que se obtendría un DNA con abundantes impurezas que no sería óptimo para realizar una posterior secuenciación.

Después de incubar las cepas de *Salmonella enterica* en caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*, Oxoid, England, Reino Unido), se tomó 1 mL del mismo y se centrifugó durante 10 minutos a 7000 rpm. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de agua destilada estéril, realizándose este paso dos veces para eliminar los restos de medio de cultivo. El pellet obtenido en el paso anterior se resuspendió con 500 μ L de una solución tamponada (750 μ L de cloruro de sodio -NaCl- 5M, 2,5 ml de EDTA 0,5 M a pH 7,5, 1 mL de Tris 1M a pH 7,5, y 45,75 mL de agua destilada, para obtener un volumen final de 50 mL), 25 μ L de SDS (dodecilsulfato sódico, Merck, Alemania) al 20% y 1 μ L de lisozima (*Lysozyme from chicken egg white*, Merck, Alemania). Se incubó la mezcla durante una hora a 37 °C para facilitar la disolución de las membranas, evitando así que una cantidad significativa de DNA quede atrapada en los restos celulares.

A continuación, se añadieron 220 μ L de NaCl 5M para prevenir la contaminación de las muestras y 700 μ L de cloroformo, y se agitó suavemente la mezcla, que posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm, se transfirió la fase superior a otro eppendorf y se añadieron 700 μ L de isopropanol frío, que se dejó actuar a -20 °C, facilitando así la precipitación del DNA. Al cabo de una hora, se realizó una nueva centrifugación durante 10 minutos a 10000 rpm, se retiró el sobrenadante y se añadieron 800 μ L de etanol frío al 70%; las muestras se volvieron a centrifugar durante 5 minutos a 10000 rpm, se eliminó el resto de etanol y se dejaron secar al aire libre. Finalmente, se resuspendió el pellet obtenido en 100 μ L de agua destilada estéril. El DNA se conservó en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su empleo.

La cuantificación del DNA extraído se llevó a cabo mediante el *NanoDrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific, Inc., West Palm Beach, FL, EE.UU.). La

concentración óptima de DNA para obtener una buena amplificación debe de estar comprendida entre 200 y 800 ng/ μ L.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España). La mezcla empleada para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que se realizó en tubos de 0,2 mL, contenía 5 μ L de DNA bacteriano, 1X de tampón de reacción incompleto (10X), 1,5 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs (10 mM, GeneAmp, Applied Biosystems; Headquarters Carlsbad, California, EE.UU.), 0,5 mM de cada cebador, 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa (Bioron GmbH, Rheinhorststr, Alemania) y 15 μ L de agua Milli-Q estéril. Para todas las reacciones llevadas a cabo se utilizaron como controles positivos DNA de una cepa con el gen en estudio y como controles negativos DNA de una cepa sin el gen en estudio y otro sin DNA (agua Milli-Q). Los cebadores y las condiciones de la reacción de amplificación para cada uno de los genes estudiados fueron las recomendadas por los autores consultados (Tabla I.2). Para los ensayos se empleó agua de calidad ultrapura (Milli-Q) y todo el material de trabajo permaneció durante 40-60 minutos bajo la luz ultravioleta para evitar la amplificación de DNA contaminante. Se llevó a cabo una electroforesis horizontal en gel de agarosa (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania) en tampón TAE 1X (Tris base, ácido acético glacial y EDTA 0,5 M ajustado a pH 8) para visualizar los amplicones obtenidos como resultado de la reacción en cadena de la polimerasa. Se utilizó *Gel Red Nucleic Acid Stain* (Biotium Inc., Hayward, CA, EE.UU.) para visualizar las bandas de DNA. Una vez preparado y solidificado el gel de agarosa, se cargó con 10 μ L del producto de la PCR previamente mezclado con 2 μ L de colorante de carga. Se incluyó un marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder no Stain; Bioron GmbH, Heidelberg, Alemania). La electroforesis se llevó a cabo a 90 voltios durante el tiempo necesario para la correcta resolución de las bandas. El revelado de los geles se realizó en un transluminador UV (Gel DocTM Ez Imager; Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Los cebadores y condiciones de amplificación utilizados para determinar tanto los genes de resistencia a antibióticos como los factores de virulencia se muestran en la Tabla I.2.

Capítulo I

Tabla I.2. Genes de resistencia a antibióticos y factores de virulencia utilizados para los aislamientos de *Salmonella enterica*.

| GENES Y FACTORES DE VIRULENCIA | REFERENCIA |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>gyrA</i> | Šeputienė <i>et al.</i> (2006) |
| <i>parC</i> | Šeputienė <i>et al.</i> (2006) |
| <i>aadA</i> | Madsen <i>et al.</i> (2000) |
| <i>aac(3)-II</i> | Van de Klundert y Vliegenthart (1993) |
| <i>aac(3)-IV</i> | Van de Klundert y Vliegenthart (1993) |
| <i>strA</i> | Bean <i>et al.</i> (2009) |
| <i>strB</i> | Gebreyes y Altier (2002) |
| <i>cmlA</i> | Sáenz <i>et al.</i> (2004) |
| <i>floR</i> | Ng <i>et al.</i> (1999) |
| <i>intl1</i> | Mazel <i>et al.</i> (2000) |
| <i>intl2</i> | Mazel <i>et al.</i> (2000) |
| <i>rvint1</i> | Lévesque y Roy (1993) |
| <i>qacEΔ1</i> | Mazel <i>et al.</i> (2000) |
| <i>sul1</i> | Mazel <i>et al.</i> (2000) |
| <i>sul2</i> | Maynard <i>et al.</i> (2003) |
| <i>sul3</i> | Perreten y Boerlin (2003) |
| <i>bla_{OXA1}</i> | Steward <i>et al.</i> (2001) |
| <i>bla_{TEM}</i> | Belaouaj <i>et al.</i> (1994) |
| <i>bla_{PSE-1}</i> | Bacci <i>et al.</i> (2012) |
| <i>bla_{SHV}</i> | Pitout <i>et al.</i> (1998) |
| <i>bla_{CMY}</i> | Stapleton <i>et al.</i> (1999) |
| <i>bla_{CTX-M UNIVERSAL}</i> | Batchelor <i>et al.</i> (2005) |
| <i>bla_{CTX-M-3G}</i> | Pagani <i>et al.</i> (2003) |
| <i>bla_{CTXM9}</i> | Coque <i>et al.</i> (2002) |
| <i>tetA</i> | Guardabassi <i>et al.</i> (2000) |
| <i>tetB</i> | Guardabassi <i>et al.</i> (2000) |
| <i>tetC</i> | Aarestrup <i>et al.</i> (2003) |
| <i>tetG</i> | Guardabassi <i>et al.</i> (2000) |
| <i>fimA</i> | Ruiz <i>et al.</i> (2002) |
| <i>aer</i> | Yamamoto <i>et al.</i> (1995) |
| <i>papC</i> | Yamamoto <i>et al.</i> (1995) |
| <i>papGIII</i> | Ruiz <i>et al.</i> (2002) |
| <i>cnf1</i> | Yamamoto <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Hyl</i> | Yamamoto <i>et al.</i> (1995) |

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Resistencia a antibióticos

Las bacterias son capaces de evitar la acción de los agentes antimicrobianos empleando diferentes estrategias: 1) mediante la presencia de enzimas específicas que modifican o inactivan al antibiótico antes o después de introducirse en la bacteria; 2) modificando la permeabilidad de la membrana al antimicrobiano, originada por la pérdida de la función de las porinas, lo que restringe el acceso del antibiótico a la diana bacteriana; 3) empleando un mecanismo de expulsión activa del antibiótico al exterior celular mediante las bombas de expulsión activa; 4) creando una ruta metabólica alternativa; 5) modificando la molécula diana o 6) mediante la superproducción del receptor del antibiótico (Michael *et al.*, 2006a; Van Hoek *et al.*, 2011).

Estos mecanismos de resistencia se pueden llevar a cabo de manera aislada o de forma conjunta para determinar el nivel final de resistencia del microorganismo. Así mismo, dichos mecanismos se pueden alcanzar mediante mutaciones del cromosoma del DNA bacteriano, provocando la alteración de proteínas ya existentes y funcionales, o bien a través de la adquisición de material genético (transferencia horizontal) entre bacterias de la misma o distinta especie (Michael *et al.*, 2006a).

En el caso de *Salmonella enterica*, los mecanismos de resistencia que más relevancia tienen son aquellos que afectan a los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones causadas por este microorganismo, o bien aquellos que puedan tener un interés epidemiológico.

Tal y como puede observarse en la Tabla I.3, todas las cepas ensayadas mostraron resistencia o resistencia intermedia frente a algunos de los antibióticos ensayados.

Capítulo I

Tabla 3. Serotipos de *Salmonella enterica* con resistencia y resistencia intermedia a cada uno de los antibióticos ensayados.

| Antibióticos | ST2 (n=3) | SD (n=1) | SE (n=31) | SV (n=5) | SA1 (n=5) | SI1 (n=5) | SP (n=1) | SI2 (n=1) | SH (n=3) | SB (n=2) | SL (n=2) | SN (n=1) | SA2 (n=1) | S1 (n=1) | SK (n=1) | ST1 (n=1) |
|--------------|--------------------------------|----------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| AMP | 1 ^a | 1 ^b | 3 ^a | 0 | 4 ^a | 1 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^a | 1 ^a | 0 |
| AMC | 1 ^a | 0 | 3 ^b | 0 | 2 ^b | 1 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 1 ^b | 1 ^a | 0 |
| CHL | 1 ^a | 0 | 0 | 0 | 4 ^a | 1 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 0 | 0 | 0 |
| STR | 1 ^a /2 ^b | 1 ^b | 7 ^a /20 ^b | 3 ^a /1 ^b | 4 ^a /1 ^b | 2 ^a /3 ^b | 1 ^b | 1 ^a | 3 ^a | 2 ^a | 2 ^b | 1 ^b | 1 ^b | 1 ^a | 1 ^b | 1 ^a |
| AMK | 1 ^b | 0 | 1 ^a /5 ^b | 1 ^a /1 ^b | 0 | 0 | 1 ^a | 0 | 0 | 1 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b |
| GEN | 1 ^a | 0 | 1 ^a /2 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| TOB | 0 | 0 | 2 ^b | 2 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 0 |
| CIP | 1 ^b | 1 ^b | 3 ^b | 4 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^a | 0 |
| NAL | 3 ^a | 1 ^a | 12 ^a | 3 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 ^a | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 0 | 1 ^a | 1 ^b |
| FOX | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 0 | 0 | 0 |
| CTX | 0 | 0 | 1 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b |
| CAZ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SXT | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| SUL | 1 ^a /1 ^b | 0 | 3 ^a /7 ^b | 2 ^b | 5 ^a | 1 ^a /2 ^b | 1 ^b | 1 ^a | 0 | 2 ^a | 2 ^a | 0 | 0 | 1 ^a | 1 ^b | 0 |
| ATM | 0 | 0 | 1 ^a | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 ^b |
| TET | 1 ^a | 0 | 1 ^a /1 ^b | 0 | 1 ^b | 0 | 0 | 0 | 3 ^a | 2 ^a | 0 | 0 | 1 ^a | 1 ^a | 1 ^a | 1 ^b |

ST2: *Salmonella* Typhimurium, SD: *Salmonella* Derby, SE: *Salmonella* Enteritidis, SV: *Salmonella* Virchow, SA1: *Salmonella* Agona, SI1: *Salmonella* Infantis, SP: *Salmonella* Poona, SI2: *Salmonella* Indiana, SH: *Salmonella* Hadar, SB: *Salmonella* Brandenburg, SL: *Salmonella* London, SN: *Salmonella* Newport, SA2: *Salmonella* Anatum, S1: *Salmonella* 1,4,(5),12:i-, SK: *Salmonella* Kentucky, ST1: *Salmonella* Thompson.

AMP: Ampicilina, TOB: Tobramicina, FOX: Cefoxitina, GEN: Gentamicina, CIP: Ciprofloxacina, CTX: Cefotaxima, CHL: Cloranfenicol, STR: Estreptomina, ATM: Aztreonam, AMK: Amikacina, NAL: Ácido nalidíxico, SUL: Sulfonamidas, SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol, AMC: Amoxicilina-Ácido clavulánico, CAZ: Ceftacídime, TET: Tetraciclina.

^a cepas con resistencia al antibiótico

^b cepas con resistencia intermedia al antibiótico

Se observó resistencia frente a 1, 2, 3, 4, 5 ó 7 antibióticos en el 40,63%, 10,95%, 12,5%, 9,38%, 1,56% y 1,56% de las cepas, respectivamente. Del total de cepas ensayadas, el 76,56% presentaron resistencia, mientras que el 23,44% restante presentó resistencia intermedia frente a algunos de los antibióticos estudiados. En la Figura I.2 puede observarse el porcentaje de cepas con resistencia y resistencia intermedia frente a cada uno de los antibióticos ensayados.

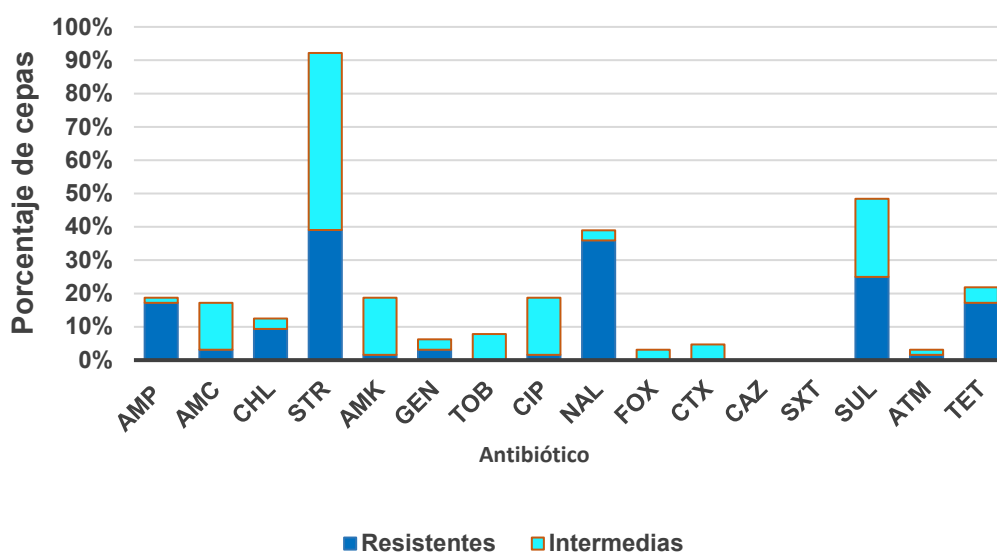


Figura I.2. Porcentaje de aislamientos resistentes a los 16 antibióticos analizados en las 64 cepas de *Salmonella enterica* estudiadas.

Se representan tanto los porcentajes de resistencia como de resistencia intermedia de las cepas. AMP: Ampicilina; TOB: Tobramicina; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; CTX: Cefotaxima; CHL: Cloranfenicol; STR: Estreptomicina; ATM: Aztreonam; AMK: Amikacina; NAL: Ácido nalidíxico; SUL: Sulfonamidas; SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol; AMC: Amoxicilina-Ácido clavulánico; CAZ: Ceftacidime; TET: Tetraciclina.

En este trabajo los porcentajes más altos de resistencia se han obtenido frente a la estreptomicina (39,06% de las cepas), el ácido nalidíxico (35,94%), las sulfonamidas (25%), y la ampicilina y tetraciclina (17,2%). Los porcentajes más altos en cuanto a resistencias intermedias se han obtenido frente a la estreptomicina (53,13%), a las sulfonamidas (23,44%), a la ciprofloxacina, amikacina y amoxicilina-clavulánico (17,2%), teniendo en cuenta que para este último antibiótico, según el CLSI (2019), hay que considerar de manera conjunta tanto los valores de resistencia como de resistencia intermedia. Los

Capítulo I

resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los obtenidos en el trabajo realizado por De Toro *et al.* (2014) en el que analizaron 114 aislamientos de *Salmonella enterica* de origen humano y obtuvieron los porcentajes más altos de resistencias frente a las sulfonamidas, tetraciclinas, ampicilina y estreptomina. Hai *et al.* (2020) analizaron 160 serotipos aislados de los intestinos y huevos de pollo en los que probaron la susceptibilidad de las cepas frente a 16 antimicrobianos, obteniendo un mayor número de cepas resistentes para determinados antibióticos, como el ácido nalidíxico, la ampicilina y las tetraciclinas. Del mismo modo, Carramiñana *et al.* (2004) analizaron 133 aislamientos de *Salmonella* obtenidos de canales de pollo, heces o tanque de escaldado, obteniendo los porcentajes de resistencia más elevados para las sulfonamidas (sulfadiazina), aminoglucósidos (neomicina y estreptomina) y tetraciclinas, corroborando estos resultados la tendencia de los obtenidos en nuestro estudio. Además, en otros trabajos realizados previamente en el noroeste de España con alimentos de origen animal, se han observado cepas bacterianas resistentes a los grupos de antibióticos señalados (Alonso-Hernando *et al.*, 2009, 2012; Álvarez-Fernández *et al.*, 2012a, b, 2013; Capita, 2007; Capita *et al.*, 2007, 2019a, b, c, 2020; Castaño-Arriba *et al.*, 2020; Cordero *et al.*, 2019; González-Gutiérrez *et al.*, 2020; Guerrero-Ramos *et al.*, 2016a, b).

En la Tabla I.4 se pueden observar los diferentes patrones de resistencia obtenidos y el número de cepas y serotipos asociados a cada uno de ellos. Destacan, por su frecuencia, los siguientes patrones: NAL (mostrado por 13 cepas; 20,31% del total), STR y AMP-CHL-STR-SUL (5 cepas en ambos casos; 7,81%), SUL (4 cepas; 6,25%) y STR-NAL, STR-SUL-TET, STR-NAL-TET (3 cepas para cada grupo; 4,69%).

Tabla I.4. Patrones de resistencia obtenidos para 64 cepas de *Salmonella enterica* procedentes de carne de pollo.

| PATRONES DE RESISTENCIA | NÚMERO DE CEPAS | SEROTIPOS de <i>Salmonella enterica</i> |
|-----------------------------|-----------------|--|
| AMK | 1 | <i>Salmonella</i> Poona |
| AMP | 1 | <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| GEN | 1 | <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| NAL | 13 | <i>Salmonella</i> Enteritidis (11) <i>Salmonella</i> Derby (1) <i>Salmonella</i> Typhimurium (1) |
| STR | 5 | <i>Salmonella</i> Enteritidis (3) <i>Salmonella</i> Infantis (1) <i>Salmonella</i> Thompson (1) |
| SUL | 4 | <i>Salmonella</i> Enteritidis (1) <i>Salmonella</i> Agona (1) <i>Salmonella</i> London (2) |
| TET | 1 | <i>Salmonella</i> Anatum |
| AMP-ATM | 1 | <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| AMP-STR | 1 | <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| NAL-GEN | 1 | <i>Salmonella</i> Typhimurium |
| STR-NAL | 3 | <i>Salmonella</i> Virchow (2) <i>Salmonella</i> Enteritidis (1) |
| STR-SUL | 1 | <i>Salmonella</i> Indiana |
| AMK-STR-NAL | 1 | <i>Salmonella</i> Virchow |
| STR-SUL-AMK | 1 | <i>Salmonella</i> Enteritidis |
| STR-SUL-TET | 3 | <i>Salmonella</i> Enteritidis (1) <i>Salmonella</i> Brandenburg (2) |
| STR-NAL-TET | 3 | <i>Salmonella</i> Hadar (3) |
| AMP-CHL-STR-SUL | 5 | <i>Salmonella</i> Infantis (1) <i>Salmonella</i> Agona (4) |
| AMP-STR-SUL-TET | 1 | <i>Salmonella</i> 1,4,[5],12:i:- |
| AMP-AMC-NAL-CIP-TET | 1 | <i>Salmonella</i> Kentucky |
| AMP-AMC-NAL-CHL-STR-SUL-TET | 1 | <i>Salmonella</i> Typhimurium |

AMP: Ampicilina; TOB: Tobramicina; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; CTX: Cefotaxima; CHL: Cloranfenicol; STR: Estreptomina; ATM: Aztreonam; AMK: Amikacina; NAL: Ácido nalidixico; SUL: Sulfonamidas; SXT: Trimetoprim-Sulfametoxazol; AMC: Amoxicilina-Ácido clavulánico; CAZ: Ceftacidime; TET: Tetraciclina.

Capítulo I

En cuanto a los aislamientos de *Salmonella* que presentaron multirresistencia, destacamos una cepa del serotipo *S. Typhimurium*, que mostró resistencia frente a 7 antibióticos, un aislamiento de *S. Kentucky*, frente a 5 antibióticos, y *S. Agona* (4 aislamientos), *S. Infantis* (1 aislamiento) y la variante monofásica de *S. Typhimurium* 1,4,[5],12:i:- (1 aislamiento) frente a 4 antibióticos (Tabla I.4).

Se observaron varios fenotipos de multirresistencia frente a los diversos antibióticos ensayados, dando lugar a varias asociaciones. AMP-CHL-STR-SUL estuvo presente en el 80% de los aislamientos de *Salmonella Agona* y en el 20% de los aislamientos de *Salmonella Infantis*; la asociación STR-NAL-TET estuvo presente en el 100% de los aislamientos de *Salmonella Hadar*; la asociación STR-SUL-TET se observó en el 100% de los aislamientos de *Salmonella Brandenburg* y en el 3,23% de los aislamientos de *Salmonella Enteritidis*. Por último, en cuanto a fenotipos de resistencia se refiere, la asociación STR-NAL se observó en el 40% de los aislamientos de *Salmonella Virchow* y en el 3,23% de los aislamientos de *Salmonella Enteritidis*.

Todos los aislamientos resultaron ser sensibles frente a la ceftazidima y al trimetoprim/sulfametoxazol, mientras que el 4,7% y el 3,13% de los aislamientos presentaron resistencia intermedia frente a las cefalosporinas de tercera y segunda generación utilizadas en este trabajo (cefotaxima y cefoxitina, respectivamente).

En las cepas AMP^R se detectaron los fenotipos de resistencia que se detallan en la Tabla I.5, en la que puede observarse que el porcentaje de co-resistencia de las cepas estudiadas fue un 36,4% para la estreptomina y un 27,3% para el cloranfenicol, sulfonamidas y tetraciclinas. Los valores más bajos de co-resistencia se obtuvieron para la amoxicilina-ácido clavulánico y el ácido nalidíxico, con un 18,2%, y para la ciprofloxacina y aztreonam, con un 9,1%. Estos datos obtenidos son más bajos que los observados por otros autores (De Toro *et al.*, 2014).

Se evaluó el fenotipo de resistencia ACSSuT y AACSTCSu en las cepas AMP^R analizadas en este trabajo, tomando como referencia los estudios de Centeno *et al.* (2018) y González-Torralba *et al.* (2018) donde definen que las

cepas con fenotipo ACSSuT son resistentes a la AMP-CHL-STR-SUL-TET, mientras que las que presentan fenotipo AACSTCSu son, además, resistentes a la AMC. En nuestra investigación se detectó una cepa de *S. Typhimurium* de este último fenotipo, lo que supone un 9,1% de las cepas AMP^R. Estos datos son concordantes con otros trabajos realizados donde se sugiere que la detección de estos fenotipos tuvo lugar en un bajo porcentaje, estando en estos casos asociado a cepas de *S. Typhimurium* (Bou, 2014; De Toro *et al.*, 2014). En el caso de la variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-, se observó el fenotipo de tetra-resistencia ASSuT (AMP-STR-SUL-TET), que ha sido asociado a la SGI-1 en las cepas de este serotipo (Barone *et al.*, 2008; Argüello *et al.*, 2014). Además, hay que señalar la importancia de este serotipo, ya que es considerado como un patógeno emergente, el cual comenzó a surgir a mediados de la década de 1990 y actualmente es el segundo serovar más común en casos clínicos humanos, así como de origen animal y de fuentes alimentarias, siendo responsable del 13,8% de los casos de salmonelosis adquirida dentro de la UE. Este serovar está asociado a todas las matrices alimentarias, si bien los principales orígenes son pollo de engorde, cerdo, gallinas ponedoras, pavo y vacuno, con porcentajes, en el año 2018, del 43,6%, 27,3%, 13,9%, 13,1% y 2,3%, respectivamente (EFSA-ECDC, 2019). Asimismo, ocupó el tercer lugar entre los serotipos de *Salmonella* identificados en seres humanos en la Unión Europea (UE) durante este período (Arai *et al.*, 2018; Cito *et al.*, 2016; Grattarola *et al.*, 2019). En este trabajo se ha obtenido también un fenotipo de tetra-resistencia ACSSu (AMP-CHL-STR-SUL) para *S. Agona* y *S. Infantis*. Hay que destacar la importancia clínica de ambos serovares, ya que se ha demostrado su implicación tanto en infecciones en pollos de engorde como en brotes de salmonelosis humana (Yokoyama *et al.*, 2019). Además, en diferentes estudios llevados a cabo en pollos de engorde y otros animales de consumo humano, así como con canales, estos dos serovares han resultado ser resistentes frente a AMP, CHL, STR y SUL, entre otros compuestos (Da Cunha-Neto *et al.*, 2018). Estos resultados son, por lo tanto, concordantes con los obtenidos en nuestro estudio, incluso presentando el mismo patrón de resistencia, aunque no en todos los casos citados (Michael *et al.*, 2006b; Yang *et al.*, 2020). Sin embargo, se han encontrado estudios en los que tanto *S. Agona* como *S. Infantis* han resultado ser susceptibles frente

Capítulo I

al panel de antibióticos ensayados (Ziyate *et al.*, 2016), algunos de ellos comunes con los empleados en nuestro estudio y que en nuestro caso generaron resistencias en ambos serovares.

En cuanto a la importancia de otro serovar, como es el caso de *S. Kentucky*, Madden *et al.* (2011), en un estudio realizado con carne de pollo, lo definieron como uno de los serotipos más prevalente, siendo detectado incluso en algún caso en personas. En nuestro trabajo de investigación este serotipo ha resultado tener un perfil multirresistente mostrando un patrón pentarresistente (AMP-AMC-NAL-CIP-TET). Yang *et al.* (2020) obtuvieron para este mismo serovar un patrón de resistencia a 9 antibióticos que incluía AMP-NAL-CIP-TET, no encontrando resistencias frente a AMC.

Entre los antibióticos utilizados con mayor frecuencia en el tratamiento de infecciones graves producidas por *Salmonella enterica*, la amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), las cefalosporinas de tercera generación (FOX, CTX, CAZ) y las fluoroquinolonas se encuentran entre los compuestos prescritos con mayor frecuencia, pero la aparición de mecanismos de resistencia a dichos antibióticos está limitando su efectividad como opción terapéutica (Antunes *et al.*, 2006; Nadi *et al.*, 2020; Sirinavin y Garner, 1999); esto supone un importante problema de Salud Pública y de Seguridad Alimentaria. Sin embargo, en nuestro estudio, se ha encontrado una baja prevalencia de resistencia a estos antibióticos, e incluso algunos de ellos han resultado ser eficaces, mostrando las bacterias estudiadas sensibilidad a los mismos. Asimismo, se han obtenido porcentajes muy bajos de resistencia a las fluoroquinolonas, resultando concordante con otros estudios donde se indicó que la resistencia a las mismas resulta todavía infrecuente en *Salmonella enterica*, posiblemente debido al alto coste energético que ello le supone a la bacteria (De Toro *et al.*, 2014; O'Regan *et al.*, 2010). Por otra parte, el incremento de la prevalencia del serotipo *S. Typhimurium* durante los últimos años se asoció a mayores porcentajes de resistencia a AMP y AMC, en detrimento del serotipo *S. Enteritidis*, menos relacionado con fenotipos de multirresistencia (Capita, 2007; Capita *et al.*, 2007; De Toro *et al.*, 2014); resultados similares han sido obtenidos para estos serotipos en nuestro trabajo.

3.2. Genes de resistencia a los antibióticos y factores de virulencia.

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se estudiaron 30 genes de resistencia a antibióticos. En los aislamientos resistentes a la ampicilina (AMP^R), se evaluó la presencia de los genes implicados en la resistencia a β-lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CMY}, *bla*_{CTX-M9}, *bla*_{CTX-MU}, *bla*_{CTX-M-3G}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{PSE-1}, *ampC*), tetraciclina (*tet*(A), *tet*(B), *tet*(G)), aminoglucósidos (*aadA*, *strA*, *strB*, *aac*(3)-II, *aac*(3)-IV), sulfonamidas (*sul1*, *sul2*, *sul3*), cloranfenicol (*cmIA*, *floR*) y quinolonas (*gyrA* y *parC*). La presencia de los genes que codifican para las integrasas de tipo 1, 2 (*intI1*, *intI2*), así como la región conservada 3' -CS de los integrones de clase 1 (*qacE1-sul1*), fueron analizados por PCR. La región variable del integrón (*rvintI1*) fue estudiada también mediante esta técnica. Se estudiaron los factores de virulencia *fimA*, *papC*, *papGIII*, *hly* *cnf1* y *aer* en todas las cepas analizadas. Las prevalencias obtenidas para cada gen analizado pueden observarse en la Figura I.3.

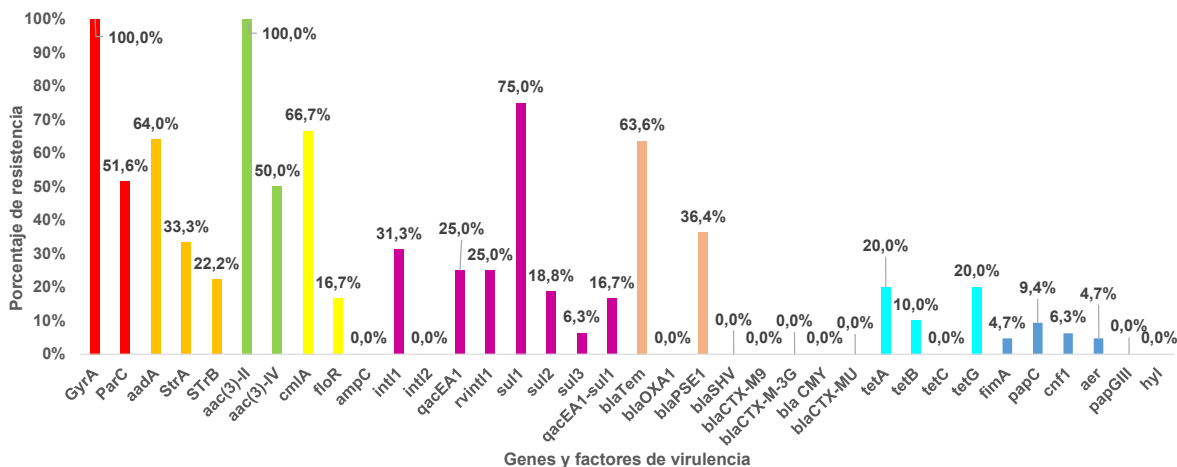


Figura I.3. Porcentaje de genes y factores de virulencia detectados en las 64 cepas de *Salmonella enterica*.

3.2.1. Detección de genes de resistencia a beta-lactámicos

Las β-lactamasas son enzimas con capacidad hidrolítica frente a los antibióticos β-lactámicos, siendo responsables del principal mecanismo de resistencia en bacterias Gram-negativas. Las β-lactamasas de mayor impacto clínico y epidemiológico en hospitales son las de espectro extendido (BLEE),

Capítulo I

las de tipo AmpC y las carbapenemasas (Rada *et al.*, 2019). Las BLEE más diseminadas son las derivadas de las β -lactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M por mutaciones puntuales en los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M}, capaces de alterar la secuencia de aminoácidos del sitio activo de la enzima aumentando su capacidad de hidrólisis para ciertos sustratos, como las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. Los genes codificantes de enzimas tipo BLEE se han detectado en diversas regiones en el ámbito mundial, y el éxito de su diseminación se ha relacionado con la ubicación de los genes (*bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, etc.) en plásmidos móviles, los cuales pueden transferir, a cepas de la misma o diferente especie, resistencia a otros antimicrobianos, por lo tanto, complica la terapia de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE (Cano *et al.*, 2008; Guzmán *et al.*, 2013).

Durante mucho tiempo, las infecciones por cepas productoras de BLEE se asociaron a diferentes factores de origen hospitalario que incrementaban la probabilidad de adquirir una infección. Recientemente, diferentes estudios en aislamientos comunitarios de enterobacterias han demostrado que los pacientes ambulatorios pueden actuar como reservorios de cepas productoras de BLEE, favoreciendo su diseminación (Cano *et al.*, 2008; Herrera-García *et al.*, 2019).

En los últimos años se ha producido un incremento en la frecuencia de cepas productoras de BLEE de la clase CTX-M, que se ha relacionado con el aumento en el uso de ceftriaxona a nivel mundial. Estos hallazgos son motivo de preocupación por la tendencia mundial en la aparición de infecciones adquiridas en la comunidad causadas por cepas productoras de BLEE del tipo CTX-M, cuya propagación se ha asociado a políticas ineficientes en cuanto al empleo de antibióticos a nivel hospitalario y ambulatorio (Blanco *et al.*, 2016; Herrera-García *et al.*, 2019).

En la tabla I.5 se detallan los genes de resistencia detectados en los aislamientos de *Salmonella enterica* AMP^R.

Tabla I.5. Fenotipo y genes de resistencia presentes en las cepas de *Salmonella enterica* AMP^R analizadas.

| FENOTIPOS DE RESISTENCIA | SEROTIPO (Nº CEPAS) | GENES DE RESISTENCIA |
|-----------------------------|---------------------|---|
| AMP | SE (1) | <i>gyrA</i> |
| AMP-ATM | SE (1) | <i>gyrA</i> |
| AMP-STR | SE (1) | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> |
| AMP-STR-CHL-SUL | SI1 (1) | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-int1-qacEΔ1-rvint1-sul1-(qacEΔ1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| | SA1 (4) | <i>gyrA-aadA</i> |
| | | <i>gyrA-parC-aadA</i> |
| | | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-Int1-sul1-bla_{TEM}</i> |
| | | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-Int1-qacEΔ1-rvint1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> |
| AMP-STR-SUL-TET | S1 (1) | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-int1-qacEΔ1-rvint1-sul1-sul2-bla_{TEM}-tetB</i> |
| AMP-AMC-NAL-CIP-TET | SK (1) | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| AMP-AMC-NAL-CHL-STR-SUL-TET | ST2 (1) | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-int1-qacEΔ1-rvint1-sul1-sul2-(qacEΔ1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetG</i> |

En la tabla I.6 pueden observarse los genes de resistencia detectados en los 64 aislamientos de *Salmonella enterica*. Entre los genes analizados codificantes para las β-lactamasas, se detectaron los genes *bla_{TEM}* y *bla_{PSE-1}* en un 64,64% y 36,36%, respectivamente, en las cepas AMP^R. De Toro *et al.* (2014) obtuvieron valores similares a los obtenidos en nuestro estudio para ambos genes. Sin embargo, estos autores detectaron el gen *bla_{oxa-1}*, aunque en un bajo porcentaje. En nuestro caso, los genes *bla_{SHV}*, *bla_{CMY}*, *bla_{CTX-M9}*, *bla_{CTX-MU}*, *bla_{CTX-M-3G}*, *bla_{OXA-1}* no se detectaron en ninguno de los aislamientos analizados. Los serotipos portadores de los genes *bla_{TEM}* y *bla_{PSE-1}* como

Capítulo I

puede observarse en la Tabla I.6 son *S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. 1,4,(5),12:i:-*, *S. Typhimurium* y *S. Kentucky*. Otros autores (Khan *et al.*, 2019; Sin *et al.*, 2020) también han detectado en sus investigaciones genes de resistencia frente a β -lactámicos en varios serotipos de *Salmonella*. Por otro lado, los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{PSE} coexistieron en la misma cepa, en los serotipos anteriormente citados a excepción de *S. Enteritidis*, ya que de los tres aislamientos AMP^R para este serovar solamente se detectó el *bla*_{TEM} para uno de ellos.

En los aislamientos *bla*_{PSE-1} positivos se llevó a cabo la evaluación de la posible presencia de la isla genómica de *Salmonella* (SGI1). Dichos aislamientos positivos en nuestro estudio se correspondieron con las cepas de *S. Infantis*, *S. Agona* (2 cepas), *S. Kentucky* y *S. Typhimurium*. Se observó que *S. Agona* y *S. Infantis* presentaron el fenotipo de multirresistencia ACSSu asociado con los genes de resistencia *bla*_{PSE-1}, *cmiA*, *aadA* y *sul1* en *S. Infantis* y 2 cepas de *S. Agona*. Así mismo, *S. Kentucky* también presentó esos genes de resistencia, pero sin estar relacionado con el fenotipo ACSSu. Por otro lado, *S. Typhimurium* presentó el fenotipo de resistencia ACSSuT asociado con los genes *bla*_{PSE-1}, *floR*, *aadA*, *sul1* y *tetG*. Así, para poder confirmar tanto la presencia de la SGI1 como para determinar la composición de los genes casete que confieren resistencia a los antibióticos β -lactámicos, se debería llevar a cabo la secuenciación de dichas cepas como se ha realizado en otros estudios (Caleja *et al.*, 2011; De Toro *et al.*, 2014; Lei *et al.*, 2020).

3.2.2. Detección de los integrones de resistencia y genes *sul*

Los integrones son elementos genéticos móviles capaces de adquirir y expresar casetes génicos mediante un mecanismo de recombinación sitio-específico. Por sí mismos no son móviles, pero son transferibles a través de transposones o plásmidos conjugativos (Cambray *et al.*, 2010; Stalder *et al.*, 2012; Xu y Chen, 2020). Los integrones de clase 1 son los que presentan una mayor prevalencia, considerándose los principales contribuyentes en el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos en bacterias Gram-negativas (Ghazalibina *et al.*, 2019; Kaushik *et al.*, 2018). Además, los integrones están formados por dos segmentos conservados (5' CS y 3' CS) separados por una

región variable que generalmente contiene uno o más genes casete. El extremo 5' CS contiene el gen de la integrasa (*intI1*), un sitio de recombinación (*attI1*) y un promotor (*Pant*). En su región 3'-conservada (3'-CS) presentan habitualmente los genes *qacEΔ1* y el gen *sul1* que codifica resistencia a las sulfonamidas y una región variable (*rvintI1*) de genes casete, los cuales son móviles, en el centro del integrón, que a menudo codifica la resistencia a los antibióticos (De Toro *et al.*, 2014; González *et al.*, 2004; Xu y Chen, 2020).

En el presente estudio se ha analizado la presencia de integrones en aquellos aislamientos que presentaron resistencia frente a las sulfonamidas (25% del total de las cepas analizadas). Se ha detectado el gen *intI1* en un 31,25% mientras que su región variable apareció en el 25% de las cepas resistentes a las sulfonamidas. Varios estudios han puesto de manifiesto que el gen *intI1* es el más comúnmente detectado en cepas multirresistentes de *Salmonella* (Aziz *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2014; Siriken *et al.*, 2015), localizándose muchos de esos integrones en plásmidos conjugativos, lo que va a favorecer la transmisión a otras bacterias. Asimismo, se han encontrado idénticos genes casete en cepas de origen humano, ambiental y alimentario, lo que permite una diseminación generalizada de la resistencia a múltiples fármacos en *Salmonella* (Kaushik *et al.*, 2018).

El *intI2* no se detectó en ninguno de los aislamientos analizados. Estos resultados coincidieron con los obtenidos en estudios previos (Antunes *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2018; Xu y Chen, 2020). En diferentes estudios se ha puesto de manifiesto que la integrasa de los *intI2* es poco efectiva debido a un codón de parada interno, limitando su capacidad para adquirir y reorganizar nuevos genes casetes, dando lugar a restricciones sobre el espectro y la evolución de los *intI2* (Gillings, 2014; Xu y Chen, 2020).

Los genes *qacE* y *qacEΔ1* son genes que confieren resistencia a los compuestos de amonio cuaternario (QAC) y colorantes tales como el bromuro de etidio. El gen *qacEΔ1* es una variante mutante del gen *qacE*, el cual parece ser parcialmente funcional actuando como transportador de múltiples fármacos. Además, algunos estudios han relacionado la ubicación de este gen en el extremo 3' conservado de los integrones de clase 1 con la facilidad para que esté ampliamente distribuido entre bacterias Gram-negativas

Capítulo I

(Chuanchuen *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2016).

En nuestro estudio, se determinó la presencia exclusivamente del gen *qacEΔ1*, detectándose en el 25% de los aislamientos resistentes a las sulfonamidas. En cuanto al gen *sul1* se encuentra habitualmente asociado con otros genes de resistencia en el *int1*, mientras que el gen *sul2* suele localizarse en un pequeño plásmido no conjugativo (Antunes *et al.*, 2005).

Por otra parte, el plásmido portador del gen *sul3* es conjugativo y se asoció al *int1*, pudiendo reemplazar al gen *sul1* en la región conservada (3'-CS), dando así lugar a una forma atípica del *int1*, lo que explicaría la potencial diseminación de este gen en el futuro (Jiang *et al.*, 2019; Moran *et al.*, 2016; Radhouani *et al.*, 2012). Al igual que en otros estudios, el gen *sul1* se ha observado en un elevado porcentaje (Aziz *et al.*, 2018), detectándose, en nuestro caso, en un 75% de los aislamientos. Además, en aquellos aislamientos que fueron positivos para el gen *sul1* se analizó el gen *qacEΔ1-sul1*, detectándose en el 16,7% de los aislamientos. Ambos han sido relacionados con la resistencia tanto a los compuestos de amonio cuaternario como a las sulfonamidas (Elkenany *et al.*, 2018). Diferentes autores han sugerido que la detección del gen *qacEΔ1-sul1* implicaría que ambos determinantes genéticos estarían físicamente presentes en el mismo integrón (Romero *et al.*, 2017).

Los genes *sul2* y *sul3* se detectaron en un porcentaje más bajo que el gen *sul1*, siendo coincidente con los datos obtenidos por otros autores (Antunes *et al.*, 2005; Argüello *et al.*, 2018). Las combinaciones obtenidas para los genes *sul* son las siguientes: *sul1* (12 cepas resistentes), *sul1+sul2* (3 cepas), *sul1+sul3* (una cepa) y *sul1+sul2+sul3* (una cepa). No es extraño encontrar, además del gen *sul1* de forma individual, dentro de una misma cepa, distintas combinaciones de varios genes *sul* (Antunes *et al.*, 2005). La aparición en aislamientos resistentes a sulfonamidas con uno o más genes *sul* sugiere una asociación significativa entre la presencia del gen *sul* y los perfiles fenotípicos resistentes a la sulfonamida (Xu *et al.*, 2020).

3.2.3. Resistencia a los aminoglucósidos, cloranfenicol y tetraciclinas

En las cepas de *Salmonella* estudiadas resistentes a los aminoglucósidos (STR y GEN), se estudiaron los genes *aadA*, *strA* y *strB* para los aislamientos resistentes a la STR y los genes *aac(3)-II* y *aac(3)-IV* para los que resultaron ser resistentes a la GEN. La familia *aadA* codifica para una aminoglucosido-3''-adeniltransferasa, que confiere resistencia a la estreptomycin mediante adenilación (Chen *et al.*, 2015; Stern *et al.*, 2018). Además, los genes *strA* y *strB* codifican para enzimas fosfotransferasas inactivadoras de estreptomycin, confiriendo resistencia para este antibiótico en un amplio número de bacterias Gram-negativas tales como *Salmonella* (Michael y Schwarz, 2016).

El gen *aadA* se ha detectado en el 64% de las cepas que presentaron resistencia a la estreptomycin. En aquellas cepas que siendo resistentes a la estreptomycin no se detectó el gen *aadA* (Figura I.4), se analizaron los genes *strA* y *strB*, detectándose el gen *strA* en el 33,33%, y el gen *strB* en el 22,22%, de los aislamientos.

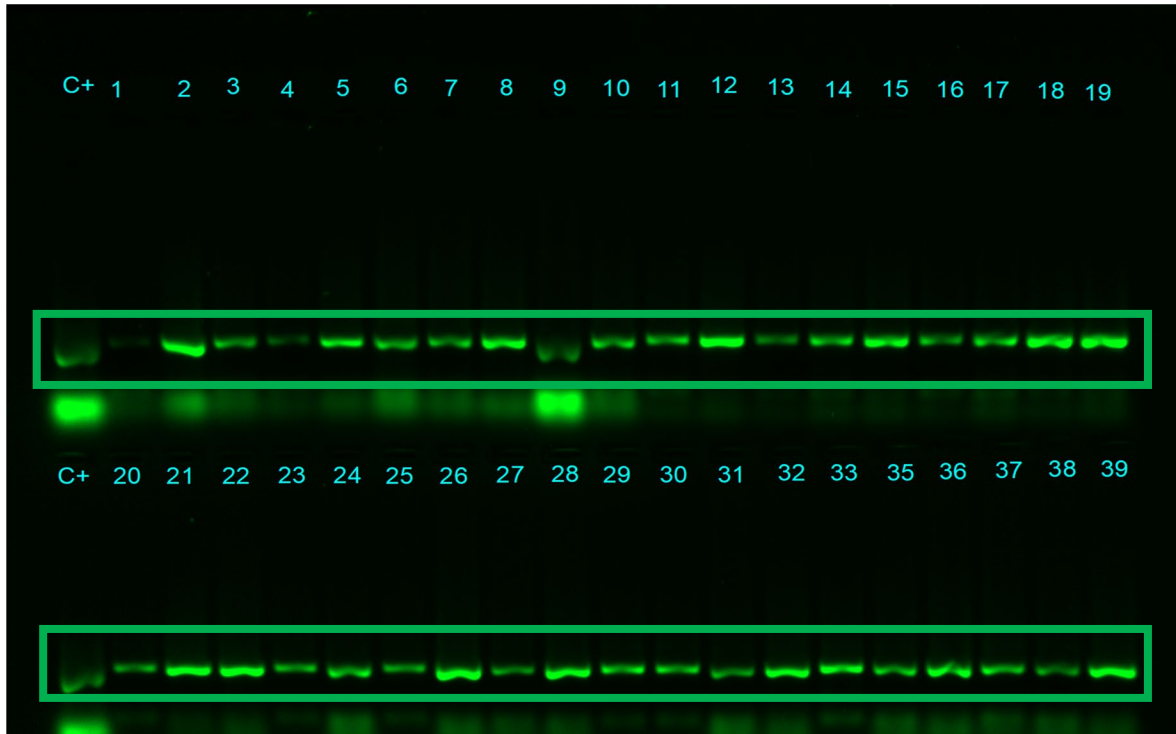


Figura I.4. Imagen del revelado del gen *aadA*.

C+, es el control positivo, 1-39 las amplificaciones de las muestras analizadas. En la zona recuadrada en verde se pueden ver las bandas amplificadas.

Capítulo I

Las enzimas aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC) comprenden cuatro clases de enzimas: AAC (1), AAC (3), AAC (2') y AAC (6'). Estas enzimas utilizan el acetil coenzima A como donante del grupo acetilo en la modificación de aminoglucósidos. Los genes *aac(3)-II* y *aac(3)-IV*, que codifican para las enzimas de esos grupos, presentan como sustrato de acción la TOB y la GEN, entre otros antibióticos de este grupo (Vakulenko y Mobashery, 2003).

En los aislamientos resistentes a la GEN se analizaron los genes *aac(3)-II* y *aac(3)-IV*, detectándose el primero en el 100% de las cepas resistentes a la gentamicina.

Los genes *floR* y *cmlA* se detectaron en un 16,67% y en un 66,67%, respectivamente, en los aislamientos resistentes al cloranfenicol. Estos resultados resultaron sorprendentes, ya que este antibiótico se prohibió en los animales de abasto en la década de los 90 del S. XX debido sus efectos toxicológicos. Sin embargo, los mecanismos de resistencia cruzada y co-resistencia pueden haber contribuido a la persistencia de los genes de resistencia al cloranfenicol a lo largo del tiempo (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Estos genes están ampliamente relacionados y codificados en las bombas de expulsión del cloranfenicol en *Salmonella*, ya que juegan un importante papel en la resistencia adquirida e intrínseca (Abatcha *et al.*, 2018; Yeh *et al.*, 2018). El uso de antibióticos puede provocar una alteración de los genes de resistencia presentes en una comunidad microbiana (resistoma), los cuales pueden persistir durante décadas incluso en ausencia de presión selectiva (Álvarez-Fernández *et al.*, 2013; Lermينياux y Cameron, 2019; Sommer y Dantas, 2011). Por ello, los genes que confieren resistencia al cloranfenicol, y a otros antimicrobianos, pueden seguir presentes en la microbiota de los animales aunque ya no sean empleados (Agga *et al.*, 2019).

Se han descrito diferentes genes *tet* que confieren resistencia a las tetraciclinas en *Salmonella*, siendo las clases más frecuentes A, B, C, D y G. El gen *tet(A)* se ha encontrado frecuentemente en plásmidos, en el cromosoma y a menudo forma parte de un transposón; los genes *tet(B)*, *tet(C)* y *tet(D)* se han detectado en el cromosoma; mientras que el *tet(G)* se ha identificado en la isla genómica 1 de algunos serotipos (Pezzella *et al.*, 2004). Como este tipo

de genes suelen localizarse de forma habitual en plásmidos, esto facilita su transferencia (Abatcha *et al.*, 2018).

En los aislamientos de *Salmonella* resistentes a TET se detectaron un 40% de cepas con presencia de sus genes de resistencia. De estos, un 40% correspondieron con el gen *tet(A)*, siendo el que de forma mayoritaria se suele encontrar en la bibliografía en porcentajes que oscilan entre el 35% y el 84% en distintos serotipos de *Salmonella* (Khan *et al.*, 2019; Pezzella *et al.*, 2004; Sin *et al.*, 2020). Otro 40% se correspondió con el gen *tet(G)*, mientras que el gen *tet(B)* se detectó en el 20% de los casos. Asimismo, de los genes de resistencia a tetraciclinas analizados, el 80% se detectó de manera aislada, estando en un 20% asociado a otro gen *-tet(A)-tet(G)*. Además, en ninguno de los aislamientos resistentes a las tetraciclinas se detectó el gen *tet(C)*, aunque si se ha detectado en estudios realizados por otros autores (Akiyama *et al.*, 2013).

3.2.4. Resistencia a las quinolonas y fluoroquinolonas.

Los aislamientos de *Salmonella* Enteritidis resistentes a las quinolonas, originariamente representadas por el ácido nalidíxico y, más recientemente, por las fluoroquinolonas, aparecen cada vez con más frecuencia tanto en entornos clínicos como ambientales. Este incremento se ha atribuido principalmente a alteraciones genéticas, a las bombas de expulsión, a las alteraciones de la membrana celular bacteriana y a la resistencia adquirida a las quinolonas (Buruk *et al.*, 2016). Las mutaciones en las regiones que determinan la resistencia a las quinolonas de los genes *gyrA* y *parC* alteran la conformación de los sitios activos de las enzimas, evitando la unión y la posterior acción inhibitoria de las quinolonas, iniciando la actividad bactericida atrapando los complejos covalentes proteína-DNA formados por la DNA girasa bacteriana o la topoisomerasa IV (Misra *et al.*, 2016). La DNA girasa y la topoisomerasa IV son dos enzimas importantes que juegan un papel esencial en la replicación del DNA bacteriano y son lugares diana para la actividad inhibitoria de las quinolonas. Tanto la girasa como la topoisomerasa IV son enzimas tetraméricas, cada una codificada por dos pares de genes: *gyrA*, *gyrB* y *parC*, *parE*, respectivamente (Gopal *et al.*, 2016). La alteración del sitio diana

Capítulo I

es el mecanismo de resistencia más común que se encuentra en las cepas de *Salmonella* aisladas en todo el mundo.

Las cepas de *Salmonella* pueden ganar resistencia a las quinolonas a través de una disminución de la expresión de las porinas y/o una mayor expresión de sistemas de expulsión no específicos, sistemas de expulsión energético-dependientes, tales como las bombas AcrAB-TolC. Sin embargo, estos mecanismos producen sólo un bajo nivel de resistencia a las quinolonas y son clínicamente importantes únicamente cuando concurren con alteraciones en las enzimas diana como la DNA girasa (Macías-Farrera *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio para las resistencias presentes frente a NAL y CIP fueron del 34% (23 aislamientos) y del 1,6% (un aislamiento), respectivamente. Estos resultados fueron superiores para ambos antibióticos a los que obtuvieron Cabrera *et al.* (2004), pero también resultaron concordantes con otros estudios como el realizado por Abatcha *et al.* (2018).

Cuando se analizaron los genes *gyrA* y *parC*, en el 100% de los aislamientos apareció el gen *gyrA*, frente a un 51,56% en los que se detectó el gen *parC*.

3.2.5. Factores determinantes de virulencia

Salmonella presenta una serie de mecanismos para poder modular la producción de factores de virulencia en respuesta al estrés ambiental natural. Para poder realizar una infección exitosa en un amplio rango de hospedadores, *Salmonella* utiliza una gran variedad de factores de virulencia, codificados por genes distribuidos a lo largo de su cromosoma y en elementos genéticos móviles (Ritter *et al.*, 2019).

La adhesión a los tejidos del hospedador, mediante fimbrias, adhesinas e invasinas, parece ser uno de los momentos cruciales durante la patogénesis de *Salmonella*. Entre la variedad de adhesinas bacterianas diferentes que existen, las fimbrias de tipo 1 son uno de los orgánulos adhesivos más comunes entre los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, incluidas *Salmonella* spp., siendo importantes factores de virulencia. El grupo fimbrial *fim* es uno de los siete grupos fimbriales más abundantes en el genoma de

Salmonella (Yue *et al.*, 2012). La importancia de las fimbrias de tipo1 en la biología celular de *Salmonella* se confirma por el hecho de que se expresa en más del 80% de los aislamientos clínicos, que representan los múltiples serovares de *Salmonella*. El clúster *fim* en *Salmonella* agrupa 10 genes (*fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimH*, *fimF*, *fimZ*, *fimY*, *fimW* y *stm0551*) y tRNA-Arg (Kolenda *et al.*, 2019). En este trabajo hemos estudiado el gen *fimA* en todos los aislamientos de *Salmonella*, detectándose únicamente en el 4,7% de los aislamientos pertenecientes a los serotipos S. Enteritidis, S. Typhimurium y S. Thompson. Hossain *et al.* (2019), en su estudio sobre tortugas de compañía, no detectaron este gen para ninguno de los aislamientos ensayados; sin embargo, otros autores han encontrado este gen en porcentajes más altos que en nuestro caso (Ma *et al.*, 2018).

La α -hemolisina (*hly*), también denominada «toxina formadora de poros», se inserta dentro de la membrana celular del hospedador provocando lisis celular, facilitando la liberación de hierro y nutrientes que son esenciales para el crecimiento bacteriano (Miranda-Estrada *et al.*, 2017).

Se han estudiado seis factores determinantes de virulencia (*papC*, *cnf1*, *fimA*, *aer*, *hly* y *papGIII*), los cuales se han detectado en porcentajes muy bajos (9,4%, 6,3%, 4,7%, 4,7 %, 0 % y 0%, respectivamente), esto podría ser debido a la gran variabilidad en la virulencia de los serotipos (Beutlich *et al.*, 2011) además, en este estudio, la batería de genes evaluada es muy limitada. El perfil de virulencia encontrado en los 64 aislamientos de *Salmonella enterica* estudiados es el siguiente: *aer* (1 cepa), *cnf1* (1 cepa), *fimA* (3 cepas), *papC* (3 cepas), *papC+cnf1*(1 cepa), *papC+aer+cnf1* (2 cepas). La mayoría de los genes de virulencia de *Salmonella* se encuentran agrupados en regiones distribuidas a lo largo del cromosoma en las SPI. Se cree que estas agrupaciones de genes han sido adquiridas en *Salmonella* a partir de otras especies bacterianas mediante transferencia horizontal, lo que provocaría un incremento en la patogenicidad de esta bacteria a lo largo de su evolución (Hensel, 2004; Ilyas *et al.*, 2017; Marcus *et al.*, 2000; Van Asten y Van Dijk, 2005).

Capítulo I

Tabla I.6. Fenotipo de resistencia a antibióticos, genes de resistencia y factores de virulencia detectados en las cepas de *Salmonella enterica* ensayadas.

| Serotipo (nº de aislamientos) | Resistencia a Antibióticos Fenotipo | Genes de Resistencia (nº de aislamientos) | Factores de Virulencia |
|-------------------------------------|--|---|---------------------------|
| SE (31) | STR (3) | <i>gyrA</i> (2) | ND |
| | | <i>gyrA-strA</i> (1) | ND |
| | AMP (1) | <i>gyrA</i> | ND |
| | AMP/STR (1) | <i>gyrA-parC-aadA-qacED1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | <i>fimA</i> |
| | AMP/ATM (1) | <i>gyrA</i> | ND |
| | NAL (11) | <i>gyrA-parC-aadA^a</i> (3) | ND |
| | | <i>gyrA-parC</i> (4) | <i>Aer</i> (1) |
| | | <i>gyrA-parC-aac</i> (3)- <i>II^a</i> (2) | ND |
| | | <i>gyrA</i> (2) | <i>papC</i> (2) |
| | GEN (1) | <i>gyrA-parC-aadA^a</i> | <i>papC+aer+cnf1</i> |
| | SUL (1) | <i>gyrA-sul1</i> | <i>papC, cnf1</i> |
| | STR/NAL (1) | <i>gyrA-parC</i> | ND |
| | STR/SUL/AMK (1) | <i>gyrA</i> | ND |
| | STR/SUL/TET (1) | <i>gyrA-tetA</i> | ND |
| SV (5) | AMK/STR/NAL (1) | <i>gyrA-parC</i> | ND |
| | STR/NAL (2) | <i>gyrA-parC-aadA</i> | ND |
| | | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacED1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | ND |
| AMK ^a (1) | <i>gyrA</i> | <i>papC</i> | |
| SA1 (5) | AMP/CHL/STR/SUL (4) | <i>gyrA-parC-aadA-sul1</i> | ND |
| | | <i>gyrA-aadA-sul1</i> | ND |
| | | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-Int1-Sul1-bla_{TEM}</i> | ND |
| | | <i>gyrA-parC-aadA-aac</i> (3)- <i>IV-cmlA-Int1-qacED1-rvint1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-blaPSE-1-tetB^a</i> | ND |
| | SUL (1) | <i>gyrA-parC-sul1</i> | <i>Cnf1</i> |
| STR (1) | <i>gyrA</i> | ND | |

| | | | |
|---------|---------------------------------|--|----------------------|
| SI1 (5) | AMP/CHL/STR/SUL (1) | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-int1-qacED1-rvint1-sul1-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | ND |
| ST2 (3) | NAL/GEN (1) | <i>gyrA-parC-aadA^a-aac(3)-II</i> | ND |
| | NAL (1) | <i>gyrA-parC-aadA^a</i> | ND |
| | NAL/AMC/AMP/CHL/STR/SUL/TET (1) | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-int1-qacED1-rvint1-sul1-sul2-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetG</i> | fimA |
| SH (3) | STR/NAL/TET (3) | <i>gyrA-parC-aadA</i> | ND |
| | | <i>gyrA-aadA</i> | ND |
| | | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b-tetA-tetG</i> | ND |
| SB (2) | STR/SUL/TET (2) | <i>gyrA-strA-strB</i> | ND |
| | | <i>gyrA-aadA-strA-strB-sul1</i> | ND |
| SL (2) | SUL (2) | <i>gyrA-sul1(2)</i> | ND |
| SD (1) | NAL | <i>gyrA-parC-aadA^a</i> | ND |
| SP (1) | AMK | <i>gyrA-parC</i> | <i>Aer+papC+cnf1</i> |
| SI2 (1) | STR/SUL | <i>gyrA-parC-aadA</i> | ND |
| SA2 (1) | TET | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^b-rvint1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | ND |
| S1 (1) | AMP/STR/SUL/TET | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-int1-qacED1-rvint1-sul1-sul2-bla_{TEM}-tetB</i> | ND |
| SK (1) | NAL/AMC/AMP/CIP/TET | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | ND |
| ST1 (1) | STR | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacED1^b-rvint1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b-tetB^a</i> | fimA |

ST2: *Salmonella* Typhimurium, SD: *Salmonella* Derby, SE: *Salmonella* Enteritidis, SV: *Salmonella* Virchow, SA1: *Salmonella* Agona, SI1: *Salmonella* Infantis, SP: *Salmonella* Poona, SI2: *Salmonella* Indiana, SH: *Salmonella* Hadar, SB: *Salmonella* Brandenburg, SL: *Salmonella* London, SN: *Salmonella* Newport, SA2: *Salmonella* Anatum, S1: *Salmonella* 1,4,(5),12:i-, SK: *Salmonella* Kentucky, ST1: *Salmonella* Thompson.

AMP: Ampicilina; TOB: Tobramicina; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; CTX: Cefotaxima; CHL: Cloranfenicol; STR: Estreptomina; ATM: Aztreonam; AMK: Amikacina; NAL: Ácido nalidíxico; SUL: Sulfonamidas; SXT: Trimetoprim- sulfametoxazol; AMC: Amoxicilina- ácido clavulánico; CAZ: Cefcazidime; TET: Tetraciclina.

ND: No detectado.

^a Superíndice que indica que los aislamientos en donde se ha analizado el gen presentaron resistencia intermedia al antibiótico.

^b Superíndice que indica que los aislamientos en donde se ha analizado el gen presentaron sensibilidad al antibiótico.

4. CONCLUSIONES

Los mayores porcentajes de resistencia en las cepas de *Salmonella* ensayadas se observaron frente a quinolonas, aminoglucósidos y sulfonamidas. Estos son antibióticos que se emplean como tratamiento terapéutico en casos de salmonelosis humana, lo cual puede suponer un problema de Salud Pública, al quedar invalidados los citados compuestos como opción terapéutica.

Los serotipos portadores de un mayor número de genes de resistencia fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Anatum*, *S. Typhimurium* variante monofásica, *S. Kentucky*, *S. Thompson*, *S. Virchow* y *S. Agona*. Estos serotipos son agentes etiológicos frecuentes en casos de salmonelosis humana, lo cual supone un hecho preocupante desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria.

5. Bibliografía

- Aarestrup, F.M., Lertworapreecha, M., Evans, M.C., Bangtrakulnonth, A., Chalermchaikit, T., Hendriksen, R.S., Wegener, H.C., 2003. Antimicrobial susceptibility and occurrence of resistance genes among *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from different countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52** (4), 715–718. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg426>
- Abatcha, M.G., Effarizah, M.E., Rusul, G., 2018. Prevalence, antimicrobial resistance, resistance genes and class 1 integrons of *Salmonella* serovars in leafy vegetables, chicken carcasses and related processing environments in Malaysian fresh food markets. *Food Control* **91**, 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.039>
- Agga, G.E., Cook, K.L., Netthisinghe, A.M.P., Gilfillen, R.A., Woosley, P.B., Sistani, K.R., 2019. Persistence of antibiotic resistance genes in beef cattle backgrounding environment over two years after cessation of operation. *PLoS ONE* **14** (2), e0212510. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212510>
- Akiyama, T., Presedo, J., Khan, A.A., 2013. The *tetA* gene decreases tigecycline sensitivity of *Salmonella enterica* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* **42** (2), 133–140. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.04.017>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 2009. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20** (12), 1108–1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2012. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23** (1), 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.006>
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R., 2012a. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes

Capítulo I

- isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* **153** (3), 281-287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.011>
- Álvarez-Fernández, E., Domínguez-Rodríguez, J., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2012b. Influence of housing systems on microbial load and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from eggs produced for human consumption. *Journal of Food Protection* **75** (5), 847-853. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-182>
- Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díez-Vega, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food Control* **30** (1), 227-234. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.005>
- Antunes, P., Machado, J., Peixe, L., 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58** (2), 297–304. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl242>
- Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L., 2005. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* **49** (2), 836–839. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.836-839.2005>
- Arai, N., Sekizuka, T., Tamamura, Y., Tanaka, K., Barco, L., Izumiya, H., Kusumoto, M., Hinenoya, A., Yamasaki, S., Iwata, T., Watanabe, A., Kuroda, M., Uchida, I., Akiba, M., 2018. Phylogenetic Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Its Monophasic Variant Isolated from Food Animals in Japan Revealed Replacement of Major Epidemic Clones in the Last 4 Decades. *Journal of Clinical Microbiology* **56** (5), e01758-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01758-17>
- Argüello, H., Guerra, B., Rodríguez, I., Rubio, P., Carvajal, A., 2018. Characterization of antimicrobial resistance determinants and class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* spp., multidrug-resistant isolates from pigs. *Genes (Basel)* **9** (5), 256. <https://doi.org/10.3390/genes9050256>
- Argüello, H., Sørensen, G., Carvajal, A., Baggesen, D.L., Rubio, P., Pedersen,

- K., 2014. Characterization of the emerging *Salmonella* 4,[5],12:i:- in Danish animal production. *Foodborne Pathogens and Disease*. **11** (5), 366-372. <https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1672>
- Aziz, S.A.A., Abdel-Latef, G.K., Shany, S.A.S., Rouby, S.R., 2018. Molecular detection of integron and antimicrobial resistance genes in multidrug resistant *Salmonella* isolated from poultry, calves and human in Beni-Suef governorate, Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic Applied Sciences* **7** (4), 535–542. <https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.06.005>
- Bacci, C., Boni, E., Alpigiani, I., Lanzoni, E., Bonardi, S., Brindani, F., 2012. Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses. *International Journal of Food Microbiology* **160** (1), 16–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.09.014>
- Barone, L., Dal Vecchio, A., Pellissier, N., Viganò, A., Romani, C., Pontello, M., 2008. Emergence of *Salmonella* Typhimurium monophasic serovar: determinants of antimicrobial resistance in porcine and human strains. *Annali di igiene: medicina preventiva e di comunità* **20** (3), 199–209. PMID: 18693398
- Batchelor, M., Hopkins, K., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Stallwood, A.D., Davies, R.H., Liebana, E., 2005. *bla*_{CTX-M} genes in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans in England and Wales from 1992 to 2003. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (4), 1319–1322. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.4.1319-1322.2005>
- Bean, D.C., Livermore, D.M., Hall, L.M.C., 2009. Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: Implications for persistence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53** (3), 1088–1093. <https://doi.org/10.1128/AAC.00800-08>
- Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Caniça, M.M., Vedel, G., Nénot, P., Krishnamoorthy, R., Paul, G., 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiology Letters* **120** (1-2), 75–80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07010.x>

Capítulo I

- Beutlich, J., Jahn S., Malorny, B., Hauser, E., Hühn, S., Schroeter, A., Rodicio, M.R., Appel, B., Threlfall, J., Mevius, D., Helmuth, R., Guerra, B., 2011. Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (16), 5655-5664. [https://doi.org/ 10.1128/AEM.00425-11](https://doi.org/10.1128/AEM.00425-11)
- Blanco, V.M., Maya, J.J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J.S., Mota, G., Pallares, C.J., Rosso, F., Matta, L., Celis, Y., Garzon, M., Villegas, M. V., 2016. Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de β -lactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **34** (9), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
- Bou, G., 2014. Relationship between resistance and virulence in bacteria of clinical interest. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **32** (1), 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.11.002>
- Buruk, C.K., Öztel Ocak, H., Bayramoğlu, G., Aydın, F., 2016. Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance genes in quinolone-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. isolates from bloodstream infections. *Mikrobiyoloji Bülteni* **50**, 186–195. <https://doi.org/10.5578/mb.20935>
- Cabrera, R., Ruiz, J., Marco, F., Oliveira, I., Arroyo, M., Aladueña, A., Usera, M.A., Jiménez-De Anta, M.T., Gascón, J., Vila, J., 2004. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (10), 3934–3939. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3934-3939.2004>
- Caleja, C., de Toro, M., Gonçalves, A., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Monteiro, D., Rodrigues, J., Sáenz, Y., Carvalho, C., Igrejas, G., Torres, C., Poeta, P., 2011. Antimicrobial resistance and class I integrons in *Salmonella enterica* isolates from wild boars and Bísaro pigs. *International Microbiology* **14**, 19–24. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.131>
- Cambray, G., Guerout, A.-M., Mazel, D., 2010. Integrons. *Annual Reviews of Genetics* **44**, 141–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163504>

- Cano, M.E., Domínguez, M.Á., Ezpeleta, C., Padilla, B., Ramírez De Arellano, E., Martínez-Martínez, L., 2008. Cultivos de vigilancia epidemiológica de bacterias resistentes a los antimicrobianos de interés nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **26** (4), 220–229. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(08\)72694-6](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(08)72694-6)
- Capita, R., 2007. Variation in *Salmonella* resistance to poultry chemical decontaminants, based on serotype, phage type, and antibiotic resistance patterns. *Journal of Food Protection* **70** (8), 1835-1843. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.8.1835>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53** (1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto, M., 2007. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103** (5), 1366-1375. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03368.x>
- Capita, R., Cordero, J., Molina, D., Iglesias, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2019a. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from pigeon meat in Spain. *Antibiotics* **8** (4), 259. <http://doi.org/10.3390/antibiotics8040259>
- Capita, R., Felices-Mercado, A., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., 2019b. Characterization of *Listeria monocytogenes* originating from the Spanish meat-processing chain. *Foods* **8** (11), 542. <http://doi.org/10.3390/foods8110542>
- Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C., 2019c. Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**, 15905. <http://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>
- Carlson, S.A., Sharma, V.K., McCuddin, Z.P., Rasmussen, M.A., Franklin, S.K., 2007. Involvement of a *Salmonella* genomic island 1 gene in the rumen protozoan-mediated enhancement of invasion for multiple-antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* **75** (2), 792–800. <https://doi.org/10.1128/IAI.00679-06>

Capítulo I

- Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I., Herrera, A., 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* **104** (1-2), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.010>
- Castaño-Arriba, A., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2020. Antibiotic resistance and biofilm-forming ability in enterococcal isolates from red meat and poultry preparations. *Pathogens*, **9** (12), 1021. <http://doi.org/10.3390/pathogens9121021>
- Centeno, D., Salvatierra, G., Calle, S., 2018. Detection of ACCSuT, BLEE and AmpC resistance phenotypes in *Salmonella enterica* strains isolated from infections in animals. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* **29**, 580–587. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.14491>
- Chen, Y., Näsvall, J., Wu, S., Andersson, D.I., Selmer, M., 2015. Structure of AadA from *Salmonella enterica*: A monomeric aminoglycoside (3'')(9) adenylyltransferase. *Acta Crystallographica Section D (Biological Crystallography)* **71**, 2267–2277. <https://doi.org/10.1107/S1399004715016429>
- Chuanchuen, R., Khemtong, S., Padungtod, P., 2007. Occurrence of qacE/qacEDelta1 genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **38** (5), 855-862. PMID: 18041302
- Cito, F., Baldinelli, F., Calistri, P., Di Giannatale, E., Scavia, G., Orsini, M., Iannetti, S., Sacchini, L., Mangone, I., Candeloro, L., Conte, A., Ippoliti, C., Morelli, D., Migliorati, G., Barile, N.B., Marfoggia, C., Salucci, S., Cammà, C., Marcacci, M., Ancora, M., Dionisi, A.M., Owczartek, S., Luzzi, I., Bottone, G., Bruno, G., De Paulis, F., Di Giampalma, M., Di Luzio, M., Graziani, M., Tuccella, C., Vespa, G., 2016. Outbreak of unusual *Salmonella enterica* serovar Typhimurium monophasic variant 1,4 [5],12:I:-, Italy, June 2013 to September 2014. *Eurosurveillance* **21** (15), pii=30194. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30194>
- CLSI, 2019. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- CLSI, 2015. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution*

- Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals*. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- CNE-ISCI, 2017. Microorganismos notificados al Sistema de Información Microbiológica en el año 2014. *Boletín Epidemiológico Semanal (Centro Nacional de Epidemiología, Instituto de Salud Carlos III)* **Vol. 25, Núm. 2 (2017): Semanas 5-20**, 19-22.
- Coque-González, M.T., 2005. Papel de los integrones en la resistencia a los agentes antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **23** (5), 251-253. <https://doi.org/10.1157/13074963>
- Coque, T.M., Oliver, A., Pérez-Díaz, J.C., Baquero, F., Cantón, R., 2002. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum β -lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46** (2), 500–510. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.500-510.2002>
- Cordero, J., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R., 2019. Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* isolates from the meat of wild and domestic pigeons. *Foods* **8** (11), 536. <http://doi.org/10.3390/foods8110536>
- Da Cunha-Neto, A., Carvalho, L.A., Carvalho, R.C.T., Dos Prazeres-Rodrigues, D., Mano, S.B., De Souza-Figueiredo, E.E., Conte, C.A., 2018. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: Antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. *Poultry Science* **97** (4), 1373–1381. <https://doi.org/10.3382/ps/pex406>
- De Toro, M., Rojo-Bezares, B., Vinué, L., Undabeitia, E., Torres, C., Sáenz, Y., 2010. In vivo selection of aac(6')-Ib-cr and mutations in the gyrA gene in a clinical qnrS1-positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104B strain recovered after fluoroquinolone treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65** (9), 1945–1949. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq262>
- De Toro, M., Seral, C., Rojo-Bezares, B., Torres, C., Castillo, F.J., Sáenz, Y., 2014. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enfermedades Infecciosas y*

Capítulo I

- Microbiología Clínica* **32** (1), 4–10.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.03.006>
- Doyle, M.P., Erickson, M.C., 2006. Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science* **74**, 98–112.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.009>
- EFSA-ECDC, 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* **13** (1), 3991. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- EFSA-ECDC, 2019. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal* **17** (2), e05598.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>
- EFSA-ECDC, 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report, European Food Safety Authority and the European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA Journal* **17** (12), e05926.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>
- EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Cesare, A. De, Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Dewulf, J., Hald, T., Michel, V., Niskanen, T., Ricci, A., Snary, E., Boelaert, F., Messens, W., Davies, R., 2019. *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA Journal* **17** (2), e05596.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5596>
- Elkenany, R.M., Eladl, A.H., El-Shafei, R.A., 2018. Genetic characterisation of class 1 integrons among multidrug-resistant *Salmonella* serotypes in broiler chicken farms. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* **14**, 202–208. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.04.009>
- Gebreyes, W.A., Altier, C., 2002. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (8), 2813–2822.
<https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2813-2822.2002>
- Ghazalibina, M., Farahani, R.K., Mansouri, S., Meskini, M., Farahani, A.H.K., Khaledi, A., 2019. Molecular detection of antibiotic resistance genes, and class I, and II integrons in *Salmonella enteritidis* isolated from Iranian one-

- day-old chicks. *Gene Reports* **16**, 100441
<https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100441>
- Gillings, M.R., 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **78** (2), 257–277.
<https://doi.org/10.1128/mmb.00056-13>
- González-Torralba, A., García-Esteban, C., Alós, J.I., 2018. Enteropathogens and antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **36** (1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.015>
- González, G., Mella, S., Zemelman, R., Bello, H., Domínguez, M., 2004. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. *Revista Médica de Chile* **132**, 619–626.
<http://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872004000500013>
- González-Gutiérrez, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2020. Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science and Nutrition* **8** (2), 777-785.
<https://doi.org/10.1002/fsn3.1319>
- Gopal, M., Elumalai, S., Arumugam, S., Durairajpandian, V., Kannan, M.A., Selvam, E., Seetharaman, S., 2016. GyrA ser83 and ParC trp106 mutations in *Salmonella enterica* serovar Typhi isolated from Typhoid fever patients in tertiary care hospital. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **10** (7), DC14–DC18.
<https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/17677.8153>
- Grattarola, C., Gallina, S., Giorda, F., Pautasso, A., Ballardini, M., Iulini, B., Varello, K., Gorla, M., Peletto, S., Masoero, L., Serracca, L., Romano, A., Dondo, A., Zoppi, S., Garibaldi, F., Scaglione, F.E., Marsili, L., Di Guardo, G., Lettini, A.A., Mignone, W., Fernandez, A., Casalone, C., 2019. First report of *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- in free-ranging striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*), Italy. *Scientific Reports* **9**, 6061.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-42474-6>
- Guardabassi, L., Dijkshoorn, L., Collard, J.-M., Olsen, J.E., Dalsgaard, A., 2000. Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology* **49**, (10), 929–936. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-10-929>
- Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G.,

Capítulo I

- Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2016a. Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiology* **53** (Part B), 156-164. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.007>
- Guerrero-Ramos, E., Molina-González, D., Blanco-Morán, S., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2016b. Prevalence, antimicrobial resistance, and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci in meat preparations. *Journal of Food Protection* **79** (5), 748–756. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-390>
- Güerri, M.L., Aladueña, A., Echeíta, A., Rotger, R., 2004. Detection of integrons and antibiotic-resistance genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates with resistance to ampicillin and variable susceptibility to amoxicillin-clavulanate. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24** (4), 327–333. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2004.04.009>
- Guzmán, M., Rodríguez, E., Antón, K., Silva, S., Navarro, J., Lastra, L., Salazar, E., Alonso, G., 2013. Genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. *Investigación Clínica* **54** (3), 235–245.
- Hai, D., Yin, X., Lu, Z., Lv, F., Zhao, H., Bie, X., 2020. Occurrence, drug resistance, and virulence genes of *Salmonella* isolated from chicken and eggs. *Food Control* **113**, 107109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107109>
- Hensel, M., 2004. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology* **294** (2-3), 95-102. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2004.06.025>
- Herrera-García, M., Arévalo-Valdez, C., Velásquez-Porta, T., 2019. Detección de los genes de β-lactamasas *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTX-M} en aislamientos de *Escherichia coli* comunitarios. *Revista Científica (Guatemala)* **28** (2), 45–56.
- Hossain, S., De Silva, B.C.J., Dahanayake, P.S., Shin, G.W., Heo, G.J., 2019. Molecular characterization of virulence, antimicrobial resistance genes, and class one integron gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp.

- Enterica isolated from pet turtles in Seoul, Korea. *Journal of Exotic Pet Medicine* **28**, 209–217. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.11.002>
- Huehn, S., La Ragione, R., Anjum, M., Saunders, M., Woodward, M., Bunge, C., Helmuth, R., Hauser, E., Guerra, B., Beutlich, J., Brisabois, A., Peters, T., Svensson, L., Madajczak, G., Litrup, E., Imre, A., Herrera-Leon, S., Mevius, D.J., Newell, D.G., Mallorny, B., 2010. Virulotyping and antimicrobial resistance typing of *Salmonella enterica* serovars relevant to human health in Europe. *Foodborne Pathogens and Disease* **7** (5), 523–535. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0447>
- Ilyas, B., Tsai, C.N., Coombes, B.K., 2017. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**, 428. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00428>
- Jiang, H., Cheng, H., Liang, Y., Yu, S., Yu, T., Fang, J., Zhu, C., 2019. Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in *Escherichia coli* Isolates From *Penaeus vannamei* and Pork From Large Markets in Zhejiang, China. *Frontiers in Microbiology* **10**, 01787. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01787>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R.K., Viridi, J.S., Gulati, P., 2018. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* **51** (2), 167-176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Khan, S.B., Khan, M.A., Ahmad, I., ur Rehman, T., Ullah, S., Dad, R., Sultan, A., Memon, A.M., 2019. Phenotypic, genotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis in poultry and poultry products. *Microbial Pathogenesis* **129**, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.046>
- Kolenda, R., Ugorski, M., Grzymajlo, K., 2019. Everything you always wanted to know about *Salmonella* type 1 fimbriae, but were afraid to ask. *Frontiers in Microbiology* **10**, 1017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01017>
- Lei, C.W., Zhang, Y., Kang, Z.Z., Kong, L.H., Tang, Y.Z., Zhang, A.Y., Yang, X., Wang, H.N., 2020. Vertical transmission of *Salmonella* Enteritidis with heterogeneous antimicrobial resistance from breeding chickens to commercial chickens in China. *Veterinary Microbiology* **240**, 108538.

Capítulo I

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108538>

- Lerminiaux, N.A., Cameron, A.D.S., 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology* **65** (1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Lévesque, C., Roy, P.H., 1993. *PCR analysis of integrons, Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Lopes, G.V., Michael, G.B., Cardoso, M., Schwarz, S., 2016. Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. *Veterinary Microbiology* **194**, 84–92. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.020>
- Lu, Y., Zhao, H., Sun, J., Liu, Y., Zhou, X., Beier, R.C., Wu, G., Hou, X., 2014. Characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovars Indiana and enteritidis from chickens in Eastern China. *PLoS ONE* **9** (5), e96050. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096050>
- Ma, Y., Li, M., Xu, X., Fu, Y., Xiong, Z., Zhang, L., Qu, X., Zhang, H., Wei, Y., Zhan, Z., Chen, Z., Bai, J., Liao, M., Zhang, J., 2018. High-levels of resistance to quinolone and cephalosporin antibiotics in MDR-ACSSuT *Salmonella enterica* serovar Enteritidis mainly isolated from patients and foods in Shanghai, China. *International Journal of Food Microbiology* **286**, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.022>
- Macías-Farrera, G.P., de Oca Jiménez, R.M., Varela-Guerrero, J., Tenorio-Borroto, E., Rivera-Ramírez, F., Monroy-Salazar, H.G., Yong-Angel, G., 2018. Antibiotics susceptibility of quinolones against *Salmonella* spp. strains isolated and molecularly sequenced for gyrA gene. *Microbial Pathogenesis* **114**, 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.067>
- Madden, R.H., Moran, L., Scates, P., McBride, J., Kelly, C., 2011. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* in raw chicken on retail sale in the Republic of Ireland. *Journal of Food Protection* **74** (11), 1912–1916. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-11-104>
- Madsen, L., Aarestrup, F.M., Olsen, J.E., 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella*

- Typhimurium. *Veterinary Microbiology* **75** (1), 73–82.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00207-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00207-8)
- Marcus, S.L., Brumell, J.H., Pfeifer, C.G., Finlay, B.B., 2000. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes and Infection* **75** (1), 73-82. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00273-2](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00273-2)
- Maynard, C., Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J., 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149: K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (10), 3214–3221.
<https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3214-3221.2003>
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 2000. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (10), 3214-3221.
<https://doi.org/10.1128/AAC.44.6.1568-1574.2000>
- Michael, G.B., Butaye, P., Cloeckert, A., Schwarz, S., 2006a. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes and Infection* **8** (7), 1898-1914.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.019>
- Michael, G.B., Cardoso, M., Schwarz, S., 2006b. Molecular analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from slaughter pigs. *Veterinary Microbiology* **112** (1), 43–52.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.011>
- Michael, G.B., Schwarz, S., 2016. Antimicrobial resistance in zoonotic nontyphoidal *Salmonella*: an alarming trend? *Clinical Microbiology and Infection* **22** (12), 968-974. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.07.033>
- Miranda-Estrada, L.I., Ruíz-Rosas, M., Molina-López, J., Parra-Rojas, I., González-Villalobos, E., Castro-Alarcón, N., 2017. Relación entre factores de virulencia, resistencia a antibióticos y los grupos filogenéticos de *Escherichia coli* uropatógena en dos localidades de México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **35** (7), 426–433.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.02.021>
- Misra, R., Thakare, R., Amrin, N., Prasad, K., Chopra, S., Dhole, T., 2016. Antimicrobial susceptibility pattern and sequence analysis of DNA gyrase

Capítulo I

- and DNA topoisomerase IV in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi A isolates with decreased susceptibility to ciprofloxacin. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110 (8), 472–479. <https://doi.org/doi:10.1093/trstmh/trw051>
- Moran, R.A., Holt, K.E., Hall, R.M., 2016. PCERC3 from a commensal ST95 *Escherichia coli*: A ColV virulence-multiresistance plasmid carrying a *suI3*-associated class 1 integron. *Plasmid* **84–85**, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2016.02.002>
- Nadi, Z.R., Salehi, T.Z., Tamai, I.A., Ferooshani, A.R., Sillanpaa, M., Soltan-Dallal, M.M., 2020. Evaluation of antibiotic resistance and prevalence of common *Salmonella enterica* serovars isolated from foodborne outbreaks. *Microchemical Journal* **155**, 104660. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104660>
- Ng, L.-K., Mulvey, M.R., Martin, I., Peters, G.A., Johnson, W., 1999. Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Canadian Isolates of *Salmonella* Serovar Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (12), 3018-3021. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.12.3018>
- O'Regan, E., Quinn, T., Frye, J.G., Pagés, J.M., Porwollik, S., Fedorka-Cray, P.J., McClelland, M., Fanning, S., 2010. Fitness costs and stability of a high-level ciprofloxacin resistance phenotype in *Salmonella enterica* serotype enteritidis: Reduced infectivity associated with decreased expression of *Salmonella* pathogenicity island 1 genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54** (1), 367–374. <https://doi.org/10.1128/AAC.00801-09>
- Pagani, L., Dell'Amico, E., Migliavacca, R., D'Andrea, M.M., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., Rossolini, G.M., 2003. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from a hospital in Northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (9), 4264–4269. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4264-4269.2003>
- Perreten, V., Boerlin, P., 2003. A new sulfonamide resistance gene (*suI3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47** (3), 1169–1172.

- <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>
- Pezzella, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I., Carattoli, A., 2004. Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolates from Animals in Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (3), 903–908. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.3.903-908.2004>
- Pitout, J.D.D., Thomson, K.S., Hanson, N.D., Ehrhardt, A.F., Moland, E.S., Sanders, C.C., 1998. β -Lactamases Responsible for Resistance to Expanded-Spectrum Cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* Isolates Recovered in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42** (6), 1350-1354. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.6.1350>
- Rada, A.M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., Villegas, M.V., 2019. Distribution and molecular characterization of beta-lactamases in Gram negative bacteria in Colombia (2001-2016). *Biomédica* **39** (supl. 1), 199-220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
- Radhouani, H., Poeta, P., Gonçalves, A., Pacheco, R., Sargo, R., Igrejas, G., 2012. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: Antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and Enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Medical Microbiology* **61** (6), 837–843. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038364-0>
- Ritter, A.C., Tondo, E.C., Siqueira, F.M., Soggiu, A., Varela, A.P.M., Mayer, F.Q., Brandelli, A., 2019. Genome analysis reveals insights into high-resistance and virulence of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* **306**, 108269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108269>
- Romero, J.L., Grande Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R., 2017. Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01650>
- Ruiz, J., Simon, K., Horcajada, J.P., Velasco, M., Barranco, M., Roig, G., Moreno-Martínez, A., Martínez, J.A., Jiménez de Anta, T., Mensa, J., Vila,

Capítulo I

- J., 2002. Differences in virulence factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing cystitis and pyelonephritis in women and prostatitis in men. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (12), 4445–4449. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.12.4445-4449.2002>
- Sáenz, Y., Briñas, L., Domínguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J., Torres, C., 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (10), 3996–4001. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3996-4001.2004>
- Šeputienė, V., Povilonis, J., Ružauskas, M., Virgailis, M., Žlabys, P., Sužiedėlienė, E., 2006. Quinolone resistance among *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in Lithuania. *Biologija* **3**, 74–78.
- Sin, M., Yoon, S., Kim, Y.B., Noh, E.B., Seo, K.W., Lee, Y.J., 2020. Molecular characteristics of antimicrobial resistance determinants and integrons in *Salmonella* isolated from chicken meat in Korea. *Journal of Applied Poultry Research* **29** (2), 502-514. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2019.12.010>
- Siriken, B., Türk, H., Yildirim, T., Durupinar, B., Erol, I., 2015. Prevalence and characterization of *Salmonella* isolated from chicken meat in Turkey. *Journal of Food Science* **80** (5), M1044–M1050. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12829>
- Sirinavin, S., Garner, P., 1999. Antibiotics for treating *Salmonella* gut infections. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews 1999*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd001167>
- Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* **14** (5), 556-563. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.07.005>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Frontiers in Microbiology* **3**, 119. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- Stapleton, P.D., Shannon, K.P., French, G.L., 1999. Carbapenem Resistance in *Escherichia coli* Associated with Plasmid-Determined CMY-4-Lactamase Production and Loss of an Outer Membrane Protein, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (5), 1206-1210. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.5.1206>

- Stern, A.L., Van der Verren, S.E., Kanchugal, S.P., Näsval, J., Gutiérrez-de-Terán, H., Selmer, M., 2018. Structural mechanism of AadA, a dual-specificity aminoglycoside adenylyltransferase from *Salmonella enterica*. *Journal of Biological Chemistry* **293** (29), 11481–11490. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003989>
- Steward, C.D., Rasheed, J.K., Hubert, S.K., Biddle, J.W., Raney, P.M., Anderson, G.J., Williams, P.P., Brittain, K.L., Oliver, A., McGowan, J., Tenover, F.C., 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology* **39** (8), 2864–2872. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2864-2872.2001>
- Vakulenko, S.B., Mobashery, S., 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical Microbiology Reviews*, **16** (3), 430-450. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.430-450.2003>
- Van Asten, A.J.A.M., Van Dijk, J.E., 2005. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **44** (3), 251-259. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002>
- Van de Klundert, J.A.M., Vliegenthart, J.S., 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, pp. 547-552. In: Persing, D.H., Smith T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (eds.), *Diagnostic molecular microbiology: principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Van Den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E., 2000. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **14** (4), 327-335. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00145-X](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00145-X)
- Van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: An overview. *Frontiers in Microbiology* **2**, 203. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00203>
- Walsh, C., Duffy, G., Nally, P., O'Mahony, R., McDowell, D.A., Fanning, S., 2008. Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. *Letters in Applied Microbiology* **46**, 210–215. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02288.x>

Capítulo I

- Xu, F., Min, F., Wang, J., Luo, Y., Huang, S., Chen, M., Wu, R., Zhang, Y., 2020. Development and evaluation of a Luminex xTAG assay for sulfonamide resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates. *Molecular and Cellular Probes* **49**, 101476. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.101476>
- Xu, Y., Chen, J., 2020. Transfer of class 1 integron-mediated antibiotic resistance genes from *Salmonella enterica* of farm fly origin to susceptible *Escherichia coli* and *Salmonella* strains. *LWT-Food Science and Technology* **122**, 109013. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109013>
- Yamamoto, S., Terai, A., Yuri, K., Kurazono, H., Takeda, Y., Yoshida, O., 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **12** (2), 85–90. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1995.tb00179.x>
- Yang, X., Huang, J., Zhang, Y., Liu, S., Chen, L., Xiao, C., Zeng, H., Wei, X., Gu, Q., Li, Y., Wang, J., Ding, Y., Zhang, J., Wu, Q., 2020. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. *Science of The Total Environmental* **713**, 136385. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136385>
- Yeh, J.C., Chen, C.L., Chiou, C.S., Lo, D.Y., Cheng, J.C., Kuo, H.C., 2018. Comparison of prevalence, phenotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars isolated from turkeys in Taiwan. *Poultry Science* **97** (1), 279–288. <https://doi.org/10.3382/ps/pex293>
- Yokoyama, E., Torii, Y., Shigemura, H., Ishige, T., Yanagimoto, K., Uematsu, K., Ando, N., Murakami, S., 2019. Isolation of *Salmonella enterica* serovar Agona strains and their similarities to strains derived from a clone caused a serovar shift in broilers. *Journal of Infection and Chemotherapy* **25** (1), 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2018.07.003>
- Yue, M., Rankin, S.C., Blanchet, R.T., Nulton, J.D., Edwards, R.A., Schifferli, D.M., 2012. Diversification of the *Salmonella* Fimbriae: A model of macro- and microevolution. *PLoS ONE* **7** (6), e38596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038596>

Ziyate, N., Karraouan, B., Kadiri, A., Darkaoui, S., Soulaymani, A., Bouchrif, B., 2016. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates in Moroccan laying hens farms. *Journal of Applied Poultry Research* **25** (4), 539–546. <https://doi.org/10.3382/japr/pfw036>

Capítulo II

**EFFECTO DE CONCENTRACIONES SUBLETALES DE BIOCIDAS
SOBRE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS, LOS
GENES DE RESISTENCIA Y LOS FACTORES DE VIRULENCIA
EN CEPAS DE *Salmonella enterica* CON RESISTENCIAS
MÚLTIPLES**

1. Introducción

La resistencia a los antibióticos constituye un problema creciente y de gran importancia en todo el mundo. La dificultad para tratar las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos implica unos costes adicionales considerables para los servicios de salud, además de tener un impacto importante en términos de morbilidad y mortalidad (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Si bien la mayoría de los casos de salmonelosis humana requieren únicamente reposo e hidratación, en caso de infecciones severas, infecciones extraintestinales o cuando el proceso se produce en personas inmunodeprimidas puede ser necesaria la terapia con antibióticos (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012). En este escenario, las cepas de *Salmonella* que presentan resistencia a antibióticos suponen un problema importante para la Salud Pública, al quedar invalidados como opción terapéutica muchos de los antibióticos que se usan de forma habitual en la práctica clínica.

Se ha sugerido que existe un vínculo directo entre la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos, ya que los mecanismos que contribuyen a ambos fenómenos son similares, como es el caso, por ejemplo, de los cambios en la permeabilidad celular o la síntesis de las bombas de expulsión (Alonso-Hernando *et al.*, 2010; Alonso-Calleja *et al.*, 2015; Ortega-Morente *et al.*, 2013; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019). Los mecanismos generales de acción de un biocida pueden definirse en función de la estructura bacteriana contra la que ejercen su actividad. Por lo tanto, pueden definirse tres niveles: la interacción con los componentes celulares exteriores, la interacción con la membrana citoplasmática, y la interacción con componentes citoplasmáticos. Es posible que un biocida actúe en uno o en los tres niveles de interacción con las células bacterianas para producir su actividad antimicrobiana (Ortega-Morente *et al.*, 2013).

En esta línea, estudios previos realizados con diferentes grupos de bacterias han puesto de manifiesto que la exposición repetida a dosis subinhibitorias de desinfectantes desencadenó una adaptación de las poblaciones bacterianas a los biocidas, al tiempo que modificó el patrón de resistencia a los antibióticos en las cepas (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Capita y Alonso-Calleja, 2013; Capita *et al.*, 2013, 2014, 2019a; Humayoun *et al.*, 2018; Sheridan *et al.*, 2012). Los biocidas, tales como los compuestos de amonio cuaternario, la clorhexidina, el fosfato

Capítulo II

trisódico, etc., se usan ampliamente para reducir la contaminación bacteriana en la industria alimentaria, en entornos clínicos y agrícolas. Sin embargo, la eliminación de estas bacterias transmitidas por los alimentos puede resultar difícil debido al empleo de dosis bajas de los desinfectantes aplicados o a la limpieza insuficiente antes de la desinfección (Capita *et al.*, 2014; Gadea *et al.*, 2016; Mavri y Smole-Možina, 2013). Bajo tales condiciones, las bacterias están expuestas regularmente a concentraciones subletales de desinfectantes, y esto puede conducir a la adaptación de bacterias que inicialmente eran susceptibles (Mavri y Smole-Možina, 2013).

Durante la adaptación de las bacterias a los biocidas pueden darse de forma conjunta múltiples mecanismos, tales como la modificación de la estructura y composición de la membrana celular, los cambios en la fluidez de la membrana, la formación de biopelículas, la adquisición de genes que codifican para la síntesis de bombas de expulsión, la sobreexpresión de las bombas de expulsión y la biodegradación (Gadea *et al.*, 2016, 2017). Sin embargo, hay pocos estudios sobre la influencia de la adaptación a los biocidas en la sensibilidad de las bacterias a los conservantes que generalmente se encuentran en alimentos procesados, medicamentos y muchos otros productos utilizados en la vida diaria como un componente ubicuo (Gadea *et al.*, 2017; Moen *et al.*, 2012). El papel de los conservantes en los alimentos es, además de mejorar el sabor y la calidad nutricional, retrasar el deterioro de los mismos, incrementando su vida útil.

Algunos de los conservantes que suelen emplearse en el ámbito alimentario son el nitrito sódico (E-250) y el nitrato sódico (E-251), entre otros. Ambos compuestos son muy usados, en combinación, en carnes listas para el consumo. El nitrito ayuda a desarrollar el sabor, y el color rosado característico de la carne procesada e inhibe el crecimiento de microorganismos alterantes y de bacterias patógenas. Por otro lado, el nitrato actúa como precursor de los nitritos mediante la acción de la enzima nitrato-reductasa, que es producida por algunos microorganismos. El uso de conservantes en alimentos está estrictamente regulado por razones de seguridad alimentaria (Lim *et al.*, 2016; Sindelar y Milkowski, 2012).

El hipoclorito de sodio se reconoce como un poderoso oxidante y, en dosis altas, puede provocar daños en el ADN, oxidar las proteínas celulares e inhibir las enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa (Ritter *et al.*, 2019). Mientras

que, el fosfato trisódico es un aditivo alimentario, con capacidad biocida, empleado en diferentes grupos de alimentos como agente regulador del pH, emulsionante, estabilizante, quelante y humectante.

La exposición a biocidas en el medio ambiente puede seleccionar cepas bacterianas tolerantes a estos compuestos y exhibir una mayor resistencia a los antibióticos a través de mecanismos de co-resistencia o resistencia cruzada (Donaghy *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2017; Wales y Davies, 2015).

La resistencia cruzada de microorganismos se refiere a aquellos que han desarrollado métodos para sobrevivir a uno o varios antimicrobianos mediante uno o varios mecanismos de acción, pudiendo ser responsable de la resistencia a diferentes compuestos un único gen. En este caso, los medicamentos o productos químicos a analizar pertenecen a la misma clase y son inactivados por la célula en el mismo grado, sin embargo, los cambios sutiles en la química de estos compuestos aumentan sus actividades y las células microbianas son más o menos susceptibles a su acción. Por ejemplo, los fármacos de fórmula avanzada son más efectivos que los fármacos preexistentes que son químicamente similares (Paul *et al.*, 2019; Schwaiger *et al.*, 2014).

Se ha sugerido que la resistencia cruzada a los compuestos antimicrobianos, después de la exposición y la adaptación a un biocida, podría tener lugar en las siguientes situaciones: (1) el biocida y el compuesto antimicrobiano actúan sobre la misma diana celular; (2) el biocida y el compuesto antimicrobiano tienen el mismo mecanismo de transporte; (3) el biocida y el antibiótico utilizan el mismo mecanismo de resistencia y, finalmente, (4) en situaciones donde los genes que contribuyen a la tolerancia a los biocidas y a la resistencia a los antibióticos se transportan en el mismo elemento genético móvil (Gadea *et al.*, 2016; Poole, 2005).

Debido a que existe la posibilidad de resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas, la presión selectiva para adquirir genes de resistencia para uno de ellos, podría actuar seleccionando genes de resistencia para el otro. Por lo tanto, el mal uso de los biocidas puede contribuir a un riesgo potencial para el desarrollo de resistencia a los antibióticos. Como consecuencia, el tratamiento efectivo de infecciones con antibióticos de uso común puede fallar, aumentando el riesgo de enfermedad invasiva o muerte (Humayoun *et al.*, 2018).

Capítulo II

Por otro lado, la co-resistencia implica resistencia en la misma cepa bacteriana a más de una categoría de productos químicos (antibióticos, biocidas, metales, fitocidas y otros). En este caso son genes diferentes los responsables de la resistencia a cada tipo de compuestos, si bien se trata de genes físicamente unidos, que se transfieren y expresan de forma conjunta. Los genes para la resistencia a los antibióticos pueden estar alojados en un solo casete y mantenerse bajo el control del mismo promotor para una expresión coordinada, aunque los niveles de expresión pueden variar de acuerdo con su proximidad al promotor. Dichos casetes se transmiten en un transposón y prevalecen en bacterias, ya que luego se integran en el ADN cromosómico o plasmídico y se transfieren a otras bacterias que viven en el mismo hábitat, lo que confiere propiedades de resistencia (Cantón y Ruiz-Garbajosa, 2011; Paul *et al.*, 2019). Asimismo, se ha demostrado que los plásmidos son mediadores importantes para las relaciones metabólicas y genéticas, del mismo modo que la clasificación de los mismos proporciona información útil sobre la epidemiología de la resistencia a los antibióticos mediada por plásmidos (impulsada por diversos plásmidos o un tipo de plásmido dominante) y las hipótesis sobre la transmisión de resistencia durante los brotes se pueden refinar de acuerdo con la relación de los plásmidos de resistencia que albergan las cepas clínicas (Orlek *et al.*, 2017).

Actualmente, están ganando terreno los temores con respecto a la co-selección para la resistencia a los antibióticos entre las bacterias encontradas en el ganado que han tolerado la utilización en la explotación ganadera de diversos antimicrobianos, como desinfectantes y otros biocidas, metales y otros agentes terapéuticos. Las cepas resistentes a los antibióticos también podrían transportar factores genéticos responsables de la resistencia a otros agentes antimicrobianos, lo que aumenta el riesgo de propagar, tanto el fenotipo como el genotipo de resistencia a los antibióticos, a otros entornos o a través de la cadena alimentaria (Romero *et al.*, 2017).

El objetivo de este capítulo fue determinar el efecto de concentraciones crecientes subinhibitorias de tres biocidas de uso alimentario sobre los patrones y los genes de resistencia a antibióticos en 10 cepas de *S. enterica* pertenecientes a 10 serotipos diferentes.

1. Materiales y métodos.

1.1. Cepas

En este estudio se han utilizado 10 cepas de *salmonella enterica* de 10 serotipos diferentes: *Salmonella* Anatum (SA2), *Salmonella* Thompson (ST1), *Salmonella* Typhimurium (ST2), *Salmonella* Infantis (SI), *Salmonella* Kentucky (SK), *Salmonella* Agona (SA1), *Salmonella* 1,4,(5),12:i:- (S1), *Salmonella* Hadar (SH), *Salmonella* Virchow (SV) y *Salmonella* Enteritidis (SE). Las cepas se han conservado a -30 °C en Caldo Triptona Soja (TSB, Oxoid) con un 20% (v/v) de glicerol. Una vez iniciados los experimentos, las cepas se mantuvieron a 4 ± 1 °C en placas de Agar Triptona Soja (TSA, Oxoid, Hampshire, Reino Unido).

2.2. Biocidas

Se han utilizado tres compuestos biocidas: nitrito sódico (NS) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), fosfato trisódico (TSP) (Merck, Darmstadt, Alemania) e hipoclorito sódico (HS) (Sigma-Aldrich). Estos compuestos se utilizan en la industria alimentaria como conservantes (FTS y NS), descontaminantes (FTS) o desinfectantes (HS). Las soluciones se prepararon asépticamente antes de cada ensayo en agua destilada estéril.

2.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) antes de la exposición.

Los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se establecieron utilizando el método de microdilución en caldo siguiendo las directrices del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). El desarrollo del proceso se puede observar en la Figura II.1. Se tomaron cinco colonias de cada cepa de las placas de TSA, se inocularon en 10 mL de caldo Mueller-Hinton (MH, Oxoid, Hampshire, Reino Unido) y se incubaron a 37 °C. Después de 24 h de incubación los cultivos contenían aproximadamente 10^8 ufc/mL. Para el experimento, se utilizaron placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 20 μ L de la solución de biocida (se utilizó

Capítulo II

un intervalo de concentraciones) y 180 μL de MH con la dilución adecuada de inóculo para obtener una concentración final en el pocillo de 5×10^5 ufc/mL. La concentración del inóculo se confirmó mediante recuento por siembra directa en placa. Se incluyeron en cada experimento tanto controles positivos (200 μL de inóculo con una concentración de 5×10^5 ufc/mL) como un control negativo (180 μL de caldo MH + 20 μL de biocida). Los valores de la densidad óptica inicial a 420-580 nm ($\text{OD}_{420-580}$) oscilaron entre 0,090-0,100. Las placas de microtítulo se incubaron a 37 °C en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab) y la MIC se determinó como la menor concentración de biocida que impide el crecimiento bacteriano transcurridas 48 h de incubación. Se estableció como valor de referencia límite una densidad óptica ($\text{DO}_{420-580}$) de 0,200, ya que por debajo de este valor de DO no se puede asegurar la inexistencia de crecimiento bacteriano.

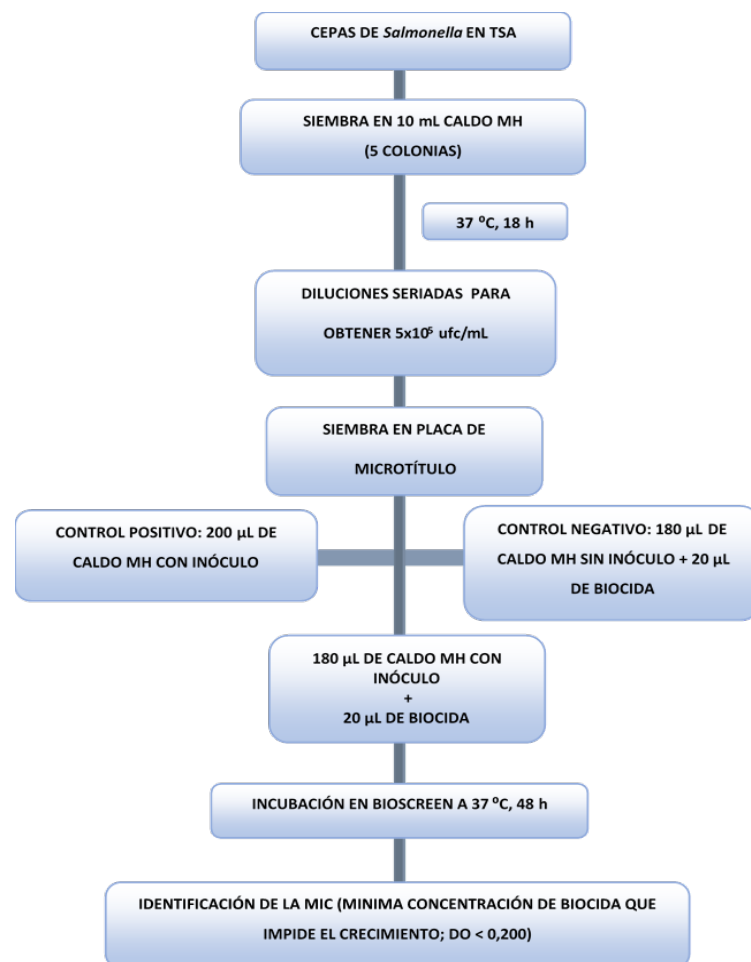


Figura II.1 Esquema del procedimiento seguido para la determinación de la MIC.

2.4 Exposición de las cepas a concentraciones subinhibitorias de los biocidas.

El procedimiento seguido para la exposición de las cepas se esquematiza en la Figura II.2.

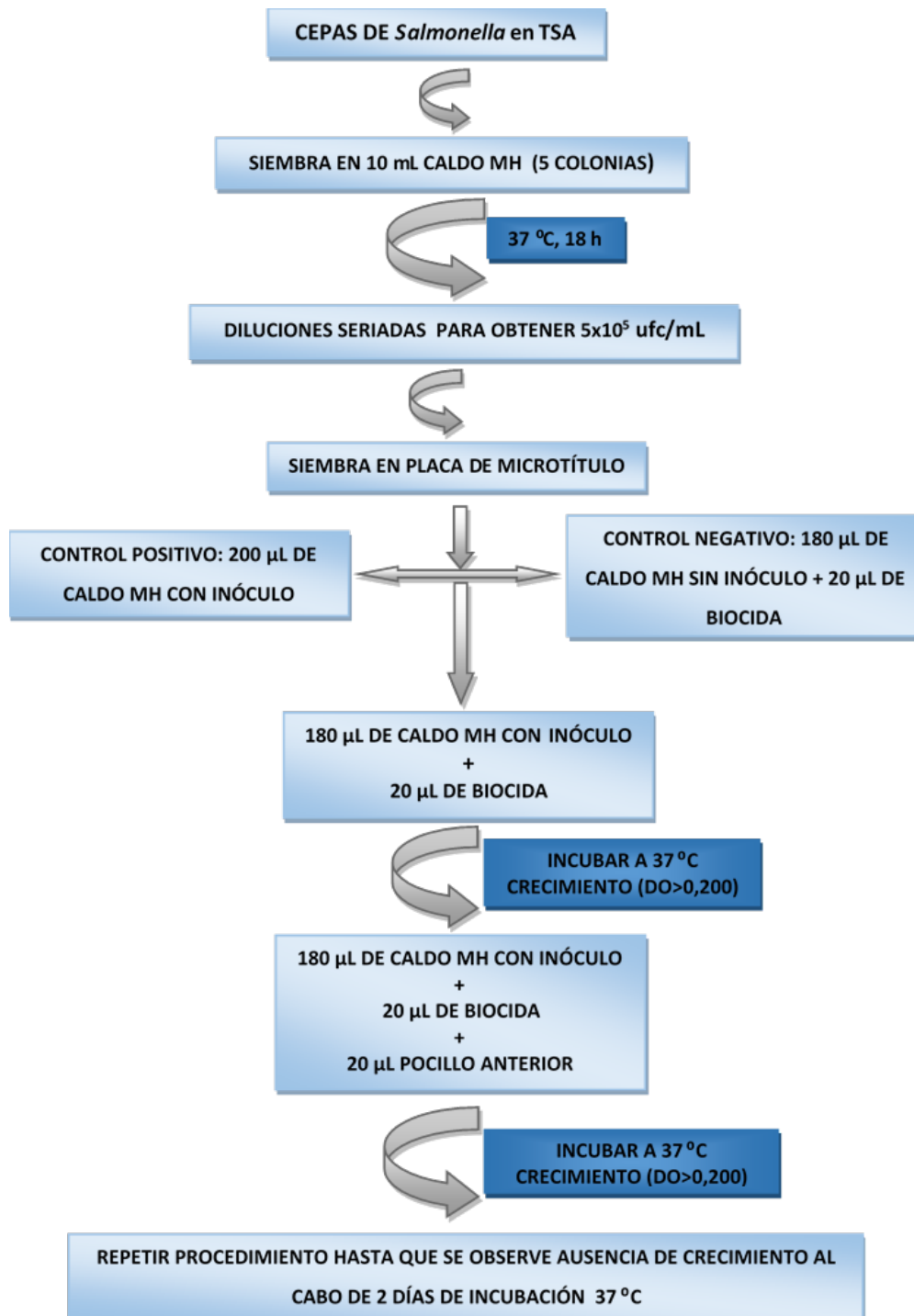


Figura II.2 Procedimiento seguido para la exposición de las cepas a concentraciones subinhibitorias crecientes de los biocidas.

Capítulo II

La prueba se realizó siguiendo la misma metodología descrita para la determinación de la MIC. La concentración inicial de partida de los biocidas fue MIC/2. Cuando se observó el crecimiento, 20 µL de la suspensión se transfirieron asépticamente al siguiente pocillo, que contenía 180 µL de caldo MH y 20 µL de solución de biocida. Después de la transferencia, cada pocillo contenía una concentración de biocida 1,5 veces superior que el pocillo anterior. Este procedimiento continuó hasta que no se observó ningún crecimiento después de 72 h de incubación a 37 °C. La suspensión en el último pocillo con crecimiento se sembró en placas de TSA con biocida a la mitad de la concentración máxima de biocida a la que la bacteria consiguió adaptarse. Las placas de TSA se conservaron a 4±1°C.

2.5 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) después de la adaptación.

Para la determinación de las MICs después de la adaptación a los diferentes biocidas se empleó la misma metodología que la utilizada para el cálculo de las MICs antes de la exposición, con la particularidad de que las cepas de *Salmonella* se sembraron en caldo MH con biocida a la concentración MIC/2.

2.6. Antibiogramas de las cepas de *Salmonella*.

Tanto antes como después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas, las cepas de *Salmonella* fueron sometidas a pruebas de susceptibilidad frente a 31 antimicrobianos (Tabla II.1) utilizando la técnica de difusión por disco en agar MH (Agar Mueller- Hinton, Oxoid), descrita por el *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (CLSI, 2018).

Las zonas de inhibición se midieron y clasificaron como sensibles, intermedias (susceptibilidad reducida) o resistentes según las directrices del CLSI (2018). Para asegurar la precisión y exactitud de los resultados obtenidos con los discos de difusión se utilizaron dos cepas control (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) cuyos patrones de resistencia a los antimicrobianos eran conocidos. Se realizaron un total de 1.240 pruebas (teniendo en cuenta todas las combinaciones de cepas, biocidas y antibióticos). La repetibilidad se evaluó mediante el ensayo de la cuarta parte de las pruebas,

(incluyendo combinaciones de todas las cepas, biocidas y antibióticos), dos veces, en días separados en un intervalo de 3 meses.

Tabla II.1. Antimicrobianos usados en el ensayo con las cepas de *Salmonella enterica*.

| FAMILIA | NOMBRE | ABREVIATURA | CONCENTRACIÓN |
|--|-----------------------------|-------------|---------------|
| Aminociclítiles | Espectinomina | SH | 100 µg |
| Aminoglucósidos | Amikacina | AMK | 30 µg |
| | Gentamicina | GEN | 10 µg |
| | Kanamicina | K | 30 µg |
| | Estreptomina | STR | 10 µg |
| | Tobramicina | TOB | 10 µg |
| Ansamicina | Rifampicina | RD | 5 µg |
| β-Lactámico | Penicilina G | P | 10 unidades |
| | Ampicilina | AMP | 10 µg |
| | Ticarcilina | TIC | 75 µg |
| β-Lactámico/ Inhibidores de la β- Lactamasa | Amoxicilina/Ac. Clavulánico | AMC | 30 µg |
| | Ampicilina/Sulbactam | SAM | 20 µg |
| | Piperacilina/Tazobactam | TZP | 110 µg |
| Cefalosporinas | Cefalotina (1ª Generación) | KF | 30 µg |
| | Cefazolina (1ª Generación) | KZ | 30 µg |
| | Cefoxitina (2ª Generación) | FOX | 30 µg |
| | Cefotaxima (3ª Generación) | CTX | 30 µg |
| Cefalosporinas | Ceftazidima (3ª Generación) | CAZ | 30 µg |
| | Cefepime (4ª Generación) | FEP | 30 µg |
| Carbapenems | Imipenem | IPM | 10 µg |
| Monobactams | Aztreonam | ATM | 30 µg |
| Inhibidores de la vía del folato | Sulfonamidas | SUL | 300 µg |
| | Trimetoprim/Sulfametaxazol | SXT | 25 µg |
| Glicopéptidos | Teicoplanina | TEC | 30 µg |
| Fenicoles | Cloranfenicol | CHL | 30 µg |
| Quinolonas y Fluoroquinolonas | Ácido Nalidíxico | NAL | 30 µg |
| | Ciprofloxacina | CIP | 5 µg |
| | Enrofloxacina | ENR | 5 µg |
| Tetraciclinas | Tetraciclina | TET | 30 µg |
| Otros | Fosfomicina | FOS | 50 µg |
| | Nitrofurantoína | F | 300 µg |

2.6 Caracterización genotípica

Las cepas de *Salmonella enterica* sin adaptar se incubaron en BHI en ausencia de biocidas y las cepas adaptadas a los mismos se incubaron a la concentración MIC/2 de cada uno de ellos. Posteriormente se realizó el mismo protocolo descrito con anterioridad en el Capítulo I de esta tesis para la extracción, cuantificación y amplificación de los genes de resistencia a antibióticos y de virulencia.

Los cebadores y condiciones de amplificación utilizados para determinar tanto los genes de resistencia a antibióticos como los factores de virulencia se indican en la Tabla I.2.

2.7 Análisis estadístico

Los valores de las MICs se evaluaron utilizando técnicas de análisis de varianza, realizando la separación de medias con la prueba de rango múltiple de Duncan. Los porcentajes de cultivos con resistencia incrementada a los antibióticos tras la exposición a los biocidas se compararon mediante las pruebas de Fisher y Chi-cuadrado. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Los análisis se realizaron con programa informático Statistica 6.0 (Statsoft Ltd., Chicago, Illinois, EE.UU.).

3. Resultados y discusión

3.1. Determinación de la MIC y perfiles de resistencia a antibióticos

Los valores de la MIC del FTS, NS e HS para las cepas de *Salmonella* antes de la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas se muestran en la Tabla II.2. El análisis estadístico de los resultados reveló que todos los serotipos de *Salmonella* mostraron una susceptibilidad similar frente al FTS (entre $12,34 \pm 0,09$ mg/mL y $12,74 \pm 0,31$ mg/mL) y el HS (entre $0,39 \pm 0,04$ mg/mL y $0,44 \pm 0,04$ mg/mL). Se encontraron pequeñas diferencias, pero significativas, en cuanto a su susceptibilidad frente al NS (valores entre $11,84 \pm 0,22$ mg/mL y $12,44 \pm 0,41$ mg/mL). Los valores de MIC observados para las cepas de *Salmonella enterica* son concordantes con resultados obtenidos con anterioridad (Alonso-Hernando *et al.*,

2009; Kim y Day, 2007; Stanojević *et al.*, 2010), lo cual confirma que los compuestos ensayados son agentes antibacterianos eficaces. Después de varios pases a través de concentraciones progresivamente crecientes de los biocidas, la concentración máxima de FTS que permitió el crecimiento bacteriano fue 13,50 mg/mL para todos los serotipos. Sin embargo, las cepas de *Salmonella* diferían en su respuesta a la exposición frente a concentraciones subletales de NS e HS, lo que sugiere que la adaptación a estos compuestos es dependiente de los serotipos de *Salmonella*. Las concentraciones máximas toleradas fueron 30,38 mg/mL de NS (45,56 mg/mL para SA1), y 0,68 mg/mL de HS (1,01 mg/mL para SH y 1,52 mg/mL para SI).

Tabla II.2. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) de los tres biocidas (mg/mL) obtenidas para las 10 cepas de *Salmonella enterica* multirresistentes antes y después de la adaptación.

| Cepas | Tratamiento Biocida | | | | | |
|-------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| | ADA | | DDA | | ADA | |
| | NS | NS | FTS | FTS | HS | HS |
| S. A1 | 12,04±0,09 ^b | 24,00 ± 0,00 ^b | 12,60± 0,24 ^c | 26,00 ± 3,46 ^b | 0,43±0,04 ^a | 0,83 ± 0,04 ^a |
| S. A2 | 12,20± 0,35 ^b | 24,00 ± 0,00 ^b | 12,56± 0,09 ^c | 28,00 ± 3,46 ^c | 0,43±0,03 ^a | 0,85 ± 0,08 ^a |
| S. E | 12,32±0,30 ^b | 22,00 ± 3,46 ^b | 12,74±0,31 ^c | 28,00 ± 3,46 ^c | 0,44±0,04 ^a | 0,83 ± 0,04 ^a |
| S. H | 11,88±0,11 ^b | 26,00 ± 3,46 ^b | 12,40±0,00 ^c | 30,00 ± 0,00 ^c | 0,44±0,05 ^a | 1,00 ± 0,11 ^a |
| S. I | 11,96±0,22 ^b | 26,00 ± 3,46 ^c | 12,36±0,09 ^c | 20,00 ± 3,46 ^b | 0,43±0,03 ^a | 0,81 ± 0,00 ^a |
| S. K | 11,88± 0,11 ^b | 20,00 ± 3,46 ^b | 12,64±0,33 ^c | 30,00 ± 0,00 ^c | 0,43±0,03 ^a | 0,88 ± 0,00 ^a |
| S.T1 | 12,44±0,41 ^b | 32,00 ± 3,46 ^b | 12,44±0,09 ^b | 30,00 ± 0,00 ^b | 0,44±0,04 ^a | 0,98 ± 0,07 ^a |
| S.T2 | 11,84± 0,09 ^b | 22,00 ± 3,46 ^b | 12,48±0,11 ^c | 30,00 ± 0,00 ^c | 0,42±0,05 ^a | 0,81 ± 0,00 ^a |
| S1 | 11,84± 0,22 ^b | 20,00 ± 3,46 ^b | 12,48±0,41 ^c | 24,00 ± 0,00 ^c | 0,44±0,04 ^a | 0,86 ± 0,04 ^a |
| S.V | 11,96±0,17 ^b | 24,00 ± 6,00 ^b | 12,52± 0,27 ^c | 26,00 ± 3,46 ^b | 0,39±0,04 ^a | 0,88 ± 0,07 ^a |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1,4,(5),12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. FTS, Fosfato trisódico; NS, Nitrito sódico; HS, Hipoclorito sódico. ADA: datos de MIC antes de la adaptación; DDA: datos de MIC después de la adaptación. Las MICs medias en la misma fila y para antes y después de la adaptación que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Después de la adaptación, se obtuvo un incremento de la MIC de aproximadamente el doble para los tres biocidas empleados con respecto a la MIC obtenida para las cepas sin adaptar. El tipo de biocida usado presentó diferencias

Capítulo II

significativas ($P < 0,05$) para todas las cepas, obteniéndose los mayores valores medios de la MIC para el FTS (27,20 mg/mL), seguido del NS (24 mg/mL) y, por último, el menor valor medio de MIC se correspondió con la obtenida para las cepas adaptadas al HS (0,87 mg/mL).

Los mayores valores obtenidos de MIC después de la adaptación para el NS se obtuvieron en la cepa *S. Thompson* (32 mg/mL), mientras que las cepas *S. Kentucky* y *S. 1,4,[5],12:i:-* (20 mg/mL) presentaron los valores más bajos de la MIC para este biocida. Los serotipos que presentaron mayores valores para la MIC con el FTS fueron *S. Hadar*, *S. Kentucky*, *S. Thomson* y *S. Typhimurium* (30 mg/mL), mientras que el menor valor de la MIC lo presentó la cepa de *S. Infantis* (20 mg/mL). Por último, para el HS el mayor valor de MIC lo presentó la cepa de *S. Hadar* (1,00 mg/mL) y el menor valor lo mostraron las cepas de *S. Infantis* y *S. Typhimurium* (0,81 mg/mL). Henly *et al.* (2019) determinaron la MIC antes y después de exposiciones sucesivas a los biocidas que analizaron, obteniendo un incremento aproximado superior al 50%. También otros autores, como Gadea *et al.* (2017), obtuvieron distintos incrementos para la MIC después de la adaptación en función del biocida utilizado y la cepa de *Salmonella* estudiada.

Antes y después de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas, se probó la susceptibilidad de las cepas frente a un panel de 31 antibióticos. Los patrones de resistencia a los antibióticos de las cepas ensayadas se muestran en la Tabla II.3.

En el estudio de las cepas previo a la exposición, estas mostraron resistencia frente al siguiente número de antibióticos: 7 (*S. Thompson*), 9 (*S. 1,4,[5],12:i:-*, *S. Virchow*), 10 (*S. Enteritidis*, *S. Anatum*), 12 (*S. Agona*, *S. Hadar*), 13 (*S. Infantis*), 15 (*S. Kentucky*) y 17 (*S. Typhimurium*). La exposición de las cepas a concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas se asoció con reducciones en la susceptibilidad a varios antibióticos, y las cepas pasaron de la categoría de "susceptible" (lo que implica que las infecciones debidas a bacterias probablemente pueden responder a ese antibiótico) a la de "resistente" (lo que implica que las infecciones causadas por bacterias no responderán, probablemente, a ese antibiótico), de acuerdo con las directrices utilizadas (CLSI, 2018). Hay que señalar que, en algunos casos, el incremento en la resistencia fue modesto, y las cepas pasaron de la categoría de "sensibles" a la de "sensibilidad reducida", o de

"susceptibilidad reducida" a "resistentes" (Tabla II.3). Es decir, en varias cepas y para diversos antibióticos, el diámetro de las zonas de inhibición en las cepas expuestas disminuyó con respecto a la no expuesta, pero no superó el límite de resistencia. Un modesto cambio en la susceptibilidad podría ser significativo, ya que podría favorecer el crecimiento de la cepa, particularmente si están involucrados mecanismos de expulsión (Braoudaki y Hilton, 2004; Cadena *et al.*, 2019). En todos los casos las cepas pertenecían al mismo grupo (resistente, susceptible o susceptibilidad reducida) en las dos repeticiones realizadas con un intervalo de tres meses.

Se observaron cambios en los perfiles de resistencia para diferentes clases de antibióticos después de la exposición a los biocidas, lo que sugiere que los mecanismos de tolerancia a los biocidas están asociados con mecanismos de amplio espectro (por ejemplo, bombas de expulsión o alteraciones de la permeabilidad) y pueden provocar una disminución en la susceptibilidad a compuestos con diversas estructuras químicas, como ha sido previamente sugerido por otros autores (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Humayoun *et al.*, 2018; Wesgate *et al.*, 2016a).

En este capítulo se han comparado los efectos de la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de tres biocidas diferentes utilizados en las instalaciones de procesamiento de alimentos (FTS, NS e HS) sobre la susceptibilidad en cepas de *Salmonella* resistentes a múltiples antibióticos. Los estudios publicados con distintos biocidas y cepas bacterianas proporcionaron diferentes perspectivas sobre la aparición de resistencias bacterianas. Randall *et al.* (2007) observaron que el uso de ciertos tipos de desinfectantes puede aumentar la resistencia bacteriana frente a varios desinfectantes y a antibióticos. Estos autores expusieron ocho cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium a diferentes desinfectantes usados en granjas (aceite de alquitrán fenólico, compuestos oxidantes, desinfectantes a base de aldehídos o compuestos de amonio cuaternario) y los resultados obtenidos difirieron dependiendo del desinfectante y de la cepa ensayada. La exposición a compuestos oxidantes disminuyó notablemente la susceptibilidad a la ciprofloxacina y varios desinfectantes mediante la inducción de la expresión del sistema de expulsión AcrAB-TolC. Por lo tanto, en dicha investigación, se concluyó que el potencial de

Capítulo II

este tipo de compuestos para inducir la resistencia a la ciprofloxacina es una preocupación real pudiendo dar lugar a la presión selectiva para la selección y/o el mantenimiento de las cepas resistentes en ausencia del antibiótico. Otros autores también han observado que la exposición a concentraciones crecientes subletales de biocidas selecciona cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos (Condell *et al.*, 2012; Karatzas *et al.*, 2007).

Por otra parte, algunos estudios mostraron que no está clara la relación entre el uso de biocidas en dosis subletales y la resistencia a los antibióticos (Condell *et al.*, 2012; Humayoun *et al.*, 2018; Ledder *et al.*, 2006). Se ha sugerido que, dado que los resultados observados en los trabajos de investigación son variables, existe una necesidad de más estudios que aborden el impacto de la utilización de biocidas y la aparición de resistencias a los antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

El impacto de la exposición a los biocidas sobre la reducida susceptibilidad a los antibióticos fue dependiente de los serotipos de *Salmonella* y de las familias de antibióticos ensayados (Figura II.3). Así, *S. Agona* y *S. Anatum* mostraron un incremento menor en el número de resistencias ($P < 0,05$) frente a los antibióticos ensayados (3 para cada cepa) que las cepas restantes (7 a 19), donde la cepa de *S. Hadar* mostró el mayor incremento en el número de resistencias (19). Esta variabilidad coincide con los resultados anteriores (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Braoudaki y Hilton, 2004), y sugiere que los cambios en el patrón de susceptibilidad a los antibióticos después de la exposición a biocidas podrían ser específica del serotipo en lugar de ser específico de la especie o del género. Todo esto hace que sea muy difícil predecir el comportamiento de una cepa después de la exposición subletal a los biocidas.

Tabla II.3 Patrones de resistencia antibióticos de las 10 cepas de *Salmonella enterica* analizadas, sin adaptar y adaptadas a diferentes biocidas.

| | | ANTIBIÓTICOS | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|--------------|----------|----------|---|-----|----------|----|----------|---|-----|----------|----------|----------|----------|----|----------|-----|----------|----------|-----|----------|----------|-----|-----|----------|----------|----------|-----|-----|----------|----------|----------|
| C | T | SH | AMK | GEN | K | STR | TOB | RD | AMP | P | TIC | AMC | SAM | TZP | KF | KZ | FOX | CTX | CAZ | FEP | IPM | ATM | SUL | SXT | TEC | CHL | NAL | CIP | ENR | TET | FOS | F | |
| SA1 | A | R | S | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | R | I | R | S | I | I | S | I | S | R | S | R | R | S | I | I | S | S | I | |
| | B | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | I | I | R | R | S | R | R | S | I | I | R | S | R | R | S | I | R | I | I | I | |
| | C | R | I | S | R | R | I | R | R | R | R | I | I | I | R | R | S | R | I | I | R | I | R | S | R | R | S | I | R | S | S | R | |
| | D | R | I | I | I | R | I | R | R | R | R | S | S | I | S | R | S | R | R | S | R | I | R | S | R | R | S | I | I | I | I | S | R |
| SA2 | A | R | S | S | R | I | S | R | S | R | I | S | S | R | R | S | I | I | I | S | S | S | S | S | S | R | I | I | I | R | R | S | R |
| | B | R | I | S | I | I | S | R | S | R | I | I | S | R | I | S | R | I | S | S | S | S | S | S | S | R | I | I | I | I | I | S | S |
| | C | R | S | S | I | R | S | R | S | R | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S | I | I | S | S | S | R | |
| | D | R | I | R | I | R | I | R | I | R | I | S | S | R | S | I | R | R | R | S | S | I | I | I | R | S | I | I | I | I | I | S | R |
| SE | A | R | S | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | I | I | R | S | I | S | S | S | S | I | S | R | S | S | S | I | S | S | R | |
| | B | I | I | I | I | I | R | R | R | R | R | I | S | I | I | R | S | I | S | S | I | S | S | S | R | S | S | R | S | S | S | I | |
| | C | R | R | I | R | R | I | I | R | R | I | S | S | I | R | R | R | R | R | S | I | R | R | S | S | S | R | R | R | S | R | R | |
| | D | I | I | S | I | R | S | R | R | R | R | S | S | R | S | I | S | R | R | S | S | S | R | S | R | S | S | I | S | S | S | R | |
| SH | A | R | S | S | R | R | S | R | S | R | R | S | S | I | I | I | S | R | S | I | R | S | S | S | R | S | R | I | R | R | S | S | |
| | B | I | R | I | R | R | R | R | I | R | R | S | R | I | I | R | S | R | R | I | R | S | S | S | R | R | R | R | R | R | R | I | R |
| | C | R | R | I | R | R | I | R | I | R | R | R | S | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | R | S | R | R | |
| | D | R | R | I | I | R | I | R | R | R | R | I | S | I | S | R | S | R | R | S | R | I | R | S | R | R | I | I | S | I | S | R | |
| SI | A | R | S | S | I | R | S | R | R | R | R | S | S | I | I | R | S | I | I | S | R | S | R | S | R | R | S | I | R | S | S | R | |
| | B | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | R | R | R | R | S | R | R | R | I | R | R | S | R | I | I | S | R | |
| | C | R | I | S | R | R | S | R | R | R | R | I | S | I | I | R | S | I | I | I | R | S | R | S | R | R | S | I | R | S | S | R | |
| | D | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | I | S | I | S | R | R | R | R | S | R | I | R | S | R | R | I | I | I | I | I | S | R |
| SK | A | R | S | S | I | I | I | R | R | R | R | R | R | I | R | R | S | I | S | I | R | S | I | S | R | S | R | R | R | R | R | S | I |
| | B | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S | I | I | I | S | R | I | R | R | R | R | R | S | S |
| | C | R | R | I | R | R | I | R | R | R | R | I | S | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S | S | R | R | I | S | R | R | |
| | D | I | R | I | I | R | R | R | R | R | R | I | R | R | R | R | I | R | R | S | R | I | R | S | R | I | R | R | R | R | R | S | R |
| ST1 | A | I | I | S | R | R | S | R | S | R | R | S | S | S | S | I | S | R | I | S | I | I | S | S | R | S | I | I | I | S | S | I | |
| | B | R | I | R | I | R | I | R | S | R | I | S | S | R | S | R | S | R | R | S | R | S | I | S | R | I | I | I | R | S | S | S | |
| | C | R | R | S | R | R | S | R | S | R | S | S | I | R | R | R | I | R | R | R | I | R | R | S | S | S | R | R | I | S | R | I | |
| | D | I | R | R | R | R | R | R | S | R | S | I | S | S | S | R | R | R | R | S | I | S | R | I | R | I | R | I | S | I | S | I | |

Capítulo II

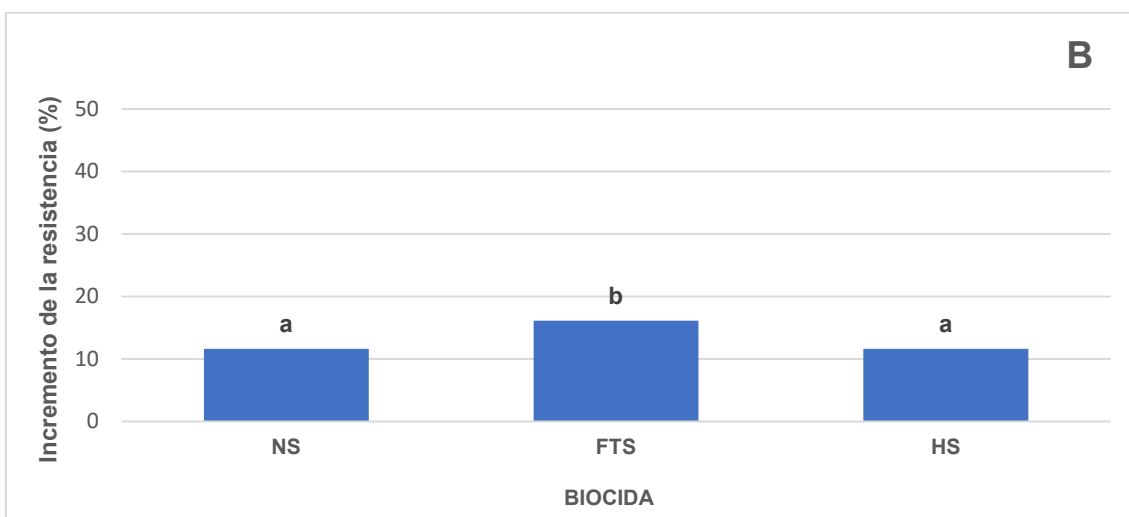
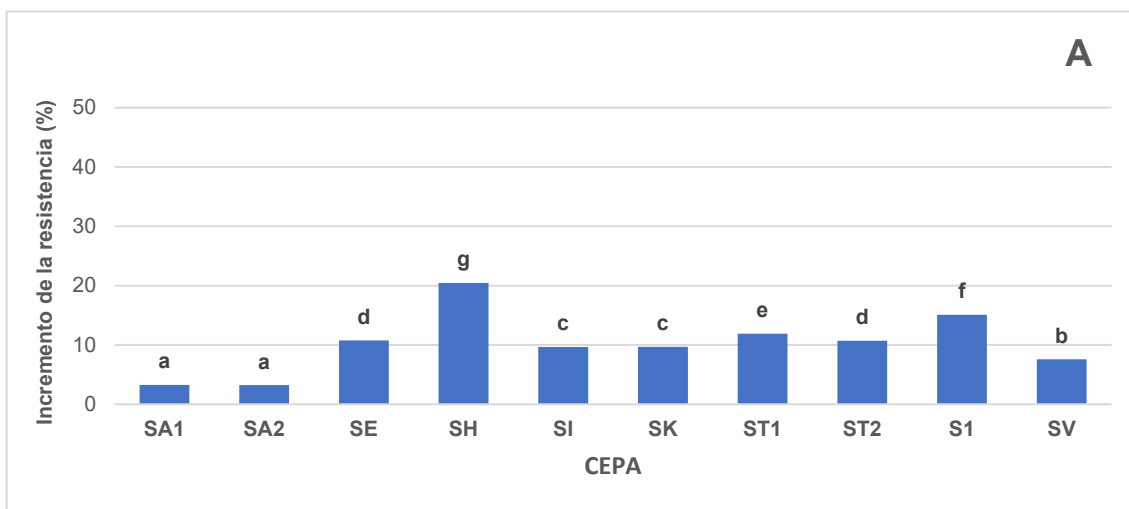
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ST2 | A | R | S | S | R | R | S | R | R | R | R | R | R | R | S | R | S | I | I | S | R | S | R | S | R | R | R | I | I | I | S | R |
| | B | R | I | I | I | R | R | R | R | R | I | I | I | S | R | S | R | I | S | R | S | R | S | R | R | R | R | I | S | R | S | R |
| | C | R | R | I | R | R | R | R | R | R | I | S | S | R | R | R | R | I | R | R | R | I | I | I | R | R | R | R | R | R | R | |
| | D | R | R | I | I | R | R | R | R | R | R | I | I | R | S | R | I | R | I | S | R | I | R | S | R | R | R | R | S | I | S | R |
| S1 | A | I | S | S | I | R | S | R | R | R | R | S | S | R | S | I | S | S | S | S | I | S | R | S | R | S | S | I | S | R | S | S |
| | B | I | R | I | I | R | R | R | R | R | R | R | S | R | S | R | S | R | I | S | R | I | R | I | R | I | I | I | S | R | S | I |
| | C | R | I | S | R | R | I | R | R | R | R | I | I | I | I | R | S | R | I | S | R | I | R | S | R | R | S | I | R | I | S | R |
| | D | I | I | R | R | R | I | R | R | R | R | I | I | R | R | S | R | I | R | I | I | R | S | R | I | I | I | R | R | S | R | |
| SV | A | I | S | S | R | R | I | R | S | R | I | S | S | I | S | S | I | S | S | I | S | S | S | R | S | R | R | R | S | S | R | |
| | B | I | R | R | I | R | I | R | I | R | S | I | S | I | S | R | I | R | R | S | R | S | I | S | R | I | R | R | R | I | S | R |
| | C | I | S | S | R | R | S | R | S | R | R | S | S | I | S | I | S | R | I | S | R | S | R | S | S | S | I | S | R | S | S | |
| | D | R | I | I | I | R | I | R | S | R | S | S | S | I | S | R | S | R | I | S | I | S | I | S | R | S | R | R | R | I | S | R |

SH, espectinomicina (100 mg); AMK, amikacina (30 mg); GEN, gentamicina (10 mg); K, kanamicina (30 mg); STR, estreptomicina (10 mg); TOB, tobramicina (10 mg); RD, rifampicina (5 mg); AMP, ampicilina (10 mg); P, penicilina G (10 units); TIC, ticarcilina (75 mg); AMC, amoxicilina/ácido clavulánico (30 mg); SAM, ampicilina/sulbactam (20 mg); TZP, piperacilina/tazobactam (110 mg); KF, cefalotina (30 mg); KZ, cefazolina (30 mg); FOX, cefoxitina (30 mg); CTX, cefotaxima (30 mg); CAZ, ceftazidime (30 mg); FEP, cefepime (30 mg); IPM, imipenem (10 mg); ATM, aztreonam (30 mg); SUL, sulfonamidas (300 mg); SXT, trimetoprim/sulfametoxazol (25 mg); TEC, teicoplanina (30 mg); CHL, cloranfenicol (30 mg); NAL, ácido nalidíxico (30 mg); CIP, ciprofloxacina (5 mg); ENR, enrofloxacin (5 mg); TET, tetraciclina (30 mg); FOS, fosfomicina (50 mg); F, nitrafurantoína (300 mg). SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i:-; SV, *Salmonella* Virchow. A, sin exposición; B, expuesta a fosfato trisódico; C, expuesta a nitrito sódico; D, expuesta a hipoclorito sódico. R, cepa resistente; I, cepa con susceptibilidad intermedia (susceptibilidad reducida); S, cepa susceptible; Las cepas expuestas con incremento de la resistencia a antibióticos (relativa a las cepas no expuestas) están sombreadas; las cepas expuestas que no han tenido incremento de la susceptibilidad a los antibióticos no están sombreadas. El incremento de la resistencia se define como el cambio desde S (antes de la exposición) a R (después de la exposición) de acuerdo con las directrices del CLSI.

Las diferencias más importantes entre los antibióticos ensayados se observaron para los aminoglucósidos (AMK, GEN y TOB), cefalosporinas (especialmente FOX y CAZ), sulfonamidas y otros antibióticos (ATM, FOS, F) que mostraron un mayor incremento de la resistencia tras la exposición a los biocidas. Gadea *et al.* (2017) obtuvieron datos concordantes con los obtenidos en este estudio para el grupo de las cefalosporinas, ya que tanto para la CTX como para la CAZ se obtuvieron pequeños incrementos en la resistencia. También se obtuvo un pequeño incremento en la resistencia para antibióticos como CIP y NAL.

Hay que señalar que tanto los antibióticos aminoglucósidos como las cefalosporinas son conocidos como sustratos de las bombas de expulsión. Los cambios en los mecanismos de expulsión pueden ofrecer una ventaja adaptativa a las bacterias. Por ese motivo, el hecho de que esta exposición pueda seleccionar potencialmente cepas que sobreexpresen sus bombas de expulsión podría dar lugar a cepas de *Salmonella* más invasivas y, posteriormente, más resistentes frente a la terapia antimicrobiana, lo cual sería motivo de preocupación en el ámbito de la Salud Pública (Condell *et al.*, 2012; Curiao *et al.*, 2016; Pagès *et al.*, 2005). La exposición subletal a biocidas de uso habitual en la industria alimentaria puede dar lugar a una mayor tolerancia a múltiples antibióticos. Este desarrollo de resistencia a los biocidas podría hacerlos ineficaces y conducir a la contaminación bacteriana de los alimentos, con las consecuentes connotaciones negativas para la Seguridad Alimentaria (Humayoun *et al.*, 2018). Estos resultados son notables teniendo en cuenta el hecho de que las cefalosporinas se encuentran entre las opciones terapéuticas para el tratamiento de las infecciones humanas por *Salmonella* en pacientes jóvenes (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012).

Capítulo II



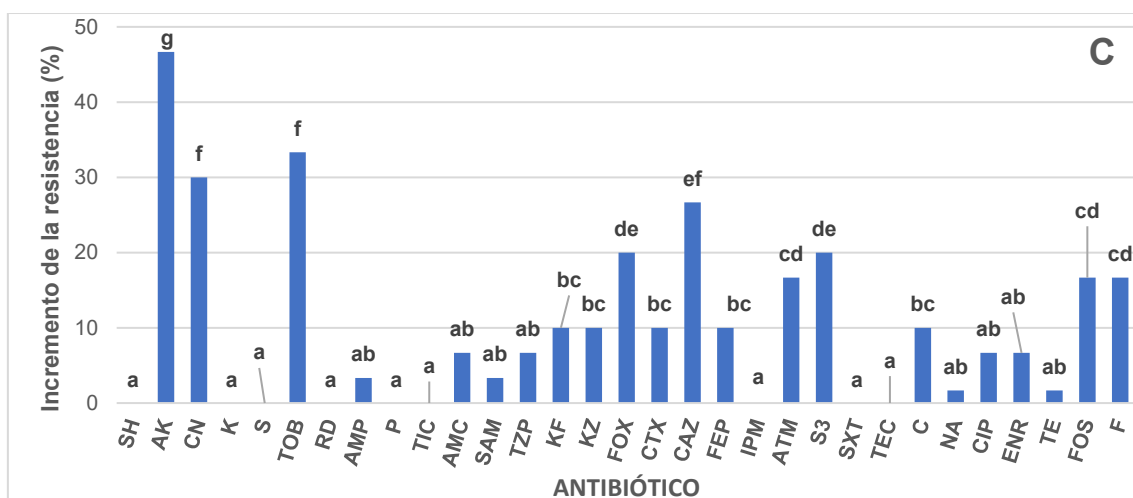


Figura II.3. Porcentaje de cepas que muestran un incremento en la resistencia a los antibióticos después de la exposición a concentraciones subletales de biocidas. El incremento en la resistencia se define como un cambio desde susceptibilidad (antes de la exposición) a resistencia (después de la exposición) de acuerdo con las directrices del CLSI.

Gráfico A: comparación entre cepas (considerando simultáneamente todos los biocidas y antibióticos). Gráfico B: Comparación entre biocidas (considerando simultáneamente todas las cepas y antibióticos). Gráfico C: Comparación entre antibióticos (considerando simultáneamente todas las cepas y biocidas).

SH: espectinomicina (100 mg); AK: amikacina (30 mg); CN: gentamicina (10 mg); K: kanamicina (30 mg); S: estreptomina (10 mg); TOB: tobramicina (10 mg); RD: rifampicina (5 mg); AMP: ampicilina (10 mg); P: penicilina G (10 units); TIC: ticarcilina (75 mg); AMC: amoxicilina/ácido clavulánico (30 mg); SAM: ampicilina/sulbactam (20 mg); TZP: piperacilina/tazobactam (110 mg); KF: cefalotina (30 mg); KZ: cefazolina (30 mg); FOX: cefoxitina (30 mg); CTX: cefotaxima (30 mg); CAZ: ceftazidime (30 mg); FEP: cefepime (30 mg); IPM: imipenem (10 mg); ATM: aztreonam (30 mg); S3: sulfonamidas (300 mg); SXT: trimetoprim/sulfametoxazol (25 mg); TEC: teicoplanina (30 mg); C: cloranfenicol (30 mg); NA: ácido nalidíxico (30 mg); CIP: ciprofloxacina (5 mg); ENR: enrofloxacina (5 mg); T: tetraciclina (30 mg); FOS: fosfomicina (50 mg); F: nitrafurantoína (300 mg).

SA1: *Salmonella* Agona; SA2: *Salmonella* Anatum; SE: *Salmonella* Enteritidis; SH: *Salmonella* Hadar; SI: *Salmonella* Infantis; SK: *Salmonella* Kentucky; ST1: *Salmonella* Thompson; ST2: *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i:- ; SV: *Salmonella* Virchow. NS: Nitrito sódico; FTS: Fosfato trisódico; HS: Hipoclorito sódico.

Las columnas dentro del mismo gráfico que no tienen letras en común son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

3.2. Determinación de genes de resistencia a antibióticos y biocidas.

Los genes que codifican para la resistencia a los biocidas a veces se encuentran en elementos genéticos móviles transferibles horizontalmente, que también portan genes de resistencia a antibióticos. Debido a que existe la posibilidad de resistencia cruzada entre antibióticos y biocidas, la presión selectiva para adquirir genes de resistencia a uno puede seleccionar genes de resistencia para el otro. Por lo tanto, el mal uso de los biocidas puede dar lugar a un riesgo potencial para el desarrollo de resistencia a los antibióticos (Humayoun *et al.*, 2018). Así mismo, se han descrito en bacterias Gram-negativas varios genes de resistencia a los biocidas pertenecientes al grupo de compuestos de amonio cuaternario, tales como, *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF*, *qacG* y *qacH*. Entre ellos, el gen *qacEΔ1* es el más extendido, ya que se encuentra en varios grupos de bacterias Gram-negativas y normalmente se encuentra asociado a integrones de clase I (*intI1*) junto con los genes de resistencia a antibióticos (Jiang *et al.*, 2017; Romero *et al.*, 2017).

En este trabajo se ha analizado únicamente el gen *qacEΔ1*, dentro de los que están relacionados con la codificación de las bombas de expulsión para eliminar los biocidas al exterior de la célula (Gadea *et al.*, 2016). Los genes *qacEΔ1*, *sul1* e *intI1* se analizaron en todas las cepas independientemente de que presentasen resistencia o no para las sulfonamidas. Además, se estudiaron dichos genes tanto en las cepas de *Salmonella enterica* adaptadas como en las no adaptadas a los biocidas. En aquellas cepas resistentes a las sulfonamidas se observó la presencia de los genes *qacEΔ1*, *sul1* e *intI1*. La asociación *qacEΔ1-sul1* se detectó en dos serotipos, S. Infantis y S. Typhimurim, en el primero solamente se detectó en la cepa no adaptada y en el caso de S. Typhimurim se detectó en todos los aislamientos (cepa adaptada a los tres biocidas y no adaptada). En aquellos serotipos no resistentes y con resistencia intermedia a las sulfonamidas no se detectó el gen *intI1*; sin embargo, los genes *qacEΔ1* y *sul1* amplificaron en todos los serotipos, adaptados y sin adaptar, a excepción de S. Hadar y S. Thompson, que, cuando se adaptaron al FTS no se detectó el gen *qacEΔ1*, ni el gen *sul1*.

Algunos autores han llegado a la conclusión de que la presencia o

ausencia del gen *qacEΔ1* es independiente de la aparición de resistencias tanto a los biocidas como a los antibióticos (Azadpour *et al.*, 2015; Vijayakumar *et al.*, 2018).

Por otra parte, la exposición y la adaptación a los biocidas también puede afectar a la homeostasis celular y/o cambiar el nivel de expresión de genes que regulan la síntesis y la modificación de la envoltura celular, virulencia, motilidad o respuesta al estrés (Curiao *et al.*, 2016). En este sentido, cabe señalar que el FTS dio lugar a un incremento del número de resistencias a antibióticos, esto podría estar motivado por una sobreexpresión de los genes de resistencia por la actuación del biocida (Wales y Davies, 2015).

Cuando se estudiaron las cepas resistentes y con susceptibilidad reducida (intermedia) a la AMP, podemos observar cómo se modificaron los fenotipos de multirresistencia ACSSu, ACSSuT y AACSTCSu. Estos fenotipos se han definido en otro Capítulo I tomando como referencia los estudios de Centeno *et al.* (2018) y González-Torralba *et al.* (2018). Los resultados obtenidos para estos fenotipos se muestran en la Tabla II.4, donde se puede apreciar que estos fenotipos de multirresistencia en algunos casos presentaron variaciones para una misma cepa en función de los tres tratamientos biocidas que fueron ensayados. En el caso de *S. Agona* y *S. Infantis*, se ha detectado el fenotipo de resistencia ACSSu en las cepas no adaptadas, sin embargo, cuando se adaptaron a los biocidas, en dos de ellos (FTS e HS), se produjo un pequeño incremento en la resistencia a las tetraciclinas pasando de sensible a susceptibilidad reducida, lo que dio lugar a que se modificase el fenotipo de multirresistencia. Por otro lado, en *S. Infantis* no se detectó el gen *qacEA1_sul1* independientemente del tratamiento biocida empleado.

Tabla II.4 Fenotipo de multirresistencia y genes de resistencia presentes en las cepas de *Salmonella enterica* AMP^R analizadas.

| Cepa | Tratamiento | Fenotipo | Genotipo |
|-------|-------------|--------------------------------------|---|
| S. A1 | No tratada | ACSSu | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-IntI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> |
| | NS | ACSSu | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-IntI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> |
| | FTS | ACSSuT ^a | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^b</i> |
| | HS | ACSSuT ^a | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-IntI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> |
| S. H | No tratada | ND | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b-tetA-tetG</i> |
| | NS | A ^a ACSSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b</i> |
| | FTS | ND | <i>gyrA-parC-aadA-bla_{TEM}^b-tetA^b-tetB^b</i> |
| | HS | AAC ^a ST ^a CSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b-tetB^a</i> |
| S. I | No tratada | ACSSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| | NS | ACSSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> |
| | FTS | ACSSuT ^a | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-bla_{TEM}-tetB^b</i> |
| | HS | ACSSuT ^a | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> |
| S. K | No tratada | ND | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| | NS | ND | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| | FTS | AAC ^a SSuT | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| | HS | AAC ^a STC ^a Su | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacED1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> |
| S. T2 | No tratada | AACST ^a CSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetC^a</i> |
| | NS | AC ^a SSuT | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE1}</i> |
| | FTS | AAC ^a STCSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}</i> |
| | HS | AAC ^a ST ^a CSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-(qacED1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetC^a</i> |
| S1 | No tratada | ASSuT | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-bla_{TEM}-tetB</i> |
| | NS | AAC ^a ST ^a CSu | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-bla_{TEM}</i> |
| | FTS | AACSTC ^a Su | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-bla_{TEM}</i> |
| | HS | AAC ^a STC ^a Su | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intI1-qacED1-rvintI1-sul1-sul2-bla_{TEM}</i> |

AMP^R: resistencia frente a la ampicilina. A: Ampicilina; AC: Amoxicilina-Ácido Clavulánico; S: Estreptomina; T: Tetraciclina; C: Cloranfenicol; Su: Sulfonamidas. ^a indica que las cepas presentaron susceptibilidad reducida (Intermedia) a ese antibiótico: ^b indica que las cepas presentaron sensibilidad frente a ese antibiótico. NS: Nitrito sódico; FTS: Fosfato trisódico; HS: Hipoclorito sódico. En negrita se destacan los genes de resistencia asociados a la isla genómica 1.

En las cepas de *S. Hadar* y *S. Kentucky* sin adaptar y en las adaptadas al FTS y al NS, respectivamente, no se detectó ningún fenotipo de multirresistencia. Sin embargo, en las cepas adaptadas al FTS e HS se detectó el fenotipo de pentarresistencia AACSTCSu, con las peculiaridades que se muestran en la Tabla II.4. En el caso de *S. Kentucky* se obtuvo el mismo perfil genotípico independientemente del tratamiento biocida. Sin embargo, en el caso de *S. Hadar*, cuando se sometió a la acción de los tres biocidas dejaron de detectarse algunos de los genes de resistencia analizados, relacionados con la resistencia a las tetraciclinas.

S. Typhimurium presentó un perfil de pentarresistencia, independientemente del biocida empleado, mientras que la variante monofásica *S. 1,4,[5],12:i:-*, presentó un perfil ASSuT cuando la cepa no estaba adaptada, mientras que al someterse a la acción de los biocidas pasó a un patrón AACSTCSu. En este serotipo no se detectaron los genes de resistencia relacionados con las tetraciclinas independientemente del tratamiento biocida aplicado. Las cepas de *S. Typhimurium* con fenotipo de pentarresistencia ACSSuT se han asociado principalmente con la presencia de los genes *bla_{PSE-1}*, *floR*, *aadA2*, *sul1* y *tet(G)*, localizados en un integrón complejo de clase 1, el cual forma parte de la isla genómica tipo 1 (SGI1). Estos genes asociados al fenotipo de pentarresistencia en *S. Typhimurium*, se observaron en la cepa no adaptada y en la adaptada al HS.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para los genes de resistencia analizados tanto para las cepas no adaptadas como para las adaptadas a los tres biocidas, es necesario realizar un estudio más amplio, para poder determinar cuales son los mecanismos, si los hubiese, para la disminución en la detección de genes de resistencia a antibioticos en alguna de las cepas de *S. enterica* analizadas tras la adaptación a los diferentes biocidas.

En la Tabla II.5 puede observarse el perfil genotípico y los factores de virulencia detectados en los 10 serotipos que se han estudiado en este capítulo y el efecto de la adaptación a tres biocidas (NS, FTS y HS).

Capítulo II

Tabla II.5. Perfil genotípico de 10 cepas de *Salmonella enterica* adaptadas al NS, FTS y HS.

| | Serotipo | Genes de Resistencia | Factores Virulencia |
|-----|------------|---|---------------------|
| SA1 | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-IntI1-qacEΔ1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-blaPSE-1-tetB^b</i> | |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-IntI1-qacEΔ1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-blaPSE-1-tetB^a</i> | |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-qacEΔ1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-blaPSE-1-tetB^b</i> | |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-aac(3)-IV-cmlA-IntI1-qacEΔ1-rvintI1-sul1-sul2-sul3-bla_{TEM}-blaPSE-1-tetB^a</i> | |
| SA2 | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^b-rvintI1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^b-rvintI1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^b-rvintI1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-rvintI1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| SE | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | <i>fimA</i> |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | <i>fimA</i> |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | <i>fimA</i> |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | <i>fimA</i> |
| SH | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b-tetA-tetG</i> | |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b</i> | |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-bla_{TEM}^b-tetA^b-tetB^b</i> | |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}^b-tetB^a</i> | |
| SI | No tratada | <i>gyrA- parC- aadA-cmlA- intI1- qacEΔ1- rvintI1- sul1- (qacEΔ1_sul1)- bla_{TEM}- blaPSE-1</i> | |
| | NS | <i>gyrA- parC- aadA-cmlA- intI1- qacEΔ1- rvintI1- sul1- bla_{TEM}- blaPSE-1-tetB^a</i> | |
| | FTS | <i>gyrA- parC- aadA-cmlA- intI1- qacEΔ1- rvintI1- sul1- bla_{TEM}-tetB^b</i> | |

| | | | |
|-----|------------|--|-------------|
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetB^a</i> | |
| SK | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-qacEΔ1^a-sul1^a-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | |
| ST1 | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacEΔ1^b-rvintl1^b-sul1^b- bla_{TEM}^b-tetB^b</i> | <i>fimA</i> |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacEΔ1^b-rvintl1^b-sul1^b- bla_{TEM}^b-tetB^b</i> | <i>fimA</i> |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-rvintl1^b- bla_{TEM}^b</i> | <i>fimA</i> |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacEΔ1^b-rvintl1^b- bla_{TEM}^b-tetB^a</i> | <i>fimA</i> |
| ST2 | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-(qacEΔ1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetG^a</i> | <i>fimA</i> |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-(qacEΔ1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}</i> | <i>fimA</i> |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-(qacEΔ1_sul1)-bla_{TEM}</i> | <i>fimA</i> |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA-floR-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-(qacEΔ1_sul1)-bla_{TEM}-bla_{PSE-1}-tetG^a</i> | <i>fimA</i> |
| S1 | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-bla_{TEM}-tetB</i> | |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-bla_{TEM}</i> | |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-bla_{TEM}</i> | |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^a-intl1-qacEΔ1-rvintl1-sul1-sul2-bla_{TEM}</i> | |
| SV | No tratada | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| | NS | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| | FTS | <i>gyrA-parC-aadA-cmlA^b-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |
| | HS | <i>gyrA-parC-aadA-qacEΔ1^b-sul1^b-bla_{TEM}</i> | |

SA1: *Salmonella* Agona; SA2: *Salmonella* Anatum; SE: *Salmonella* Enteritidis; SH: *Salmonella* Hadar; SI: *Salmonella* Infantis; SK: *Salmonella* Kentucky; ST1: *Salmonella* Thompson; ST2: *Salmonella* Typhimurium; S1: *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i:- ; SV: *Salmonella* Virchow. NS: Nitrito sódico; FTS: Fosfato trisódico; HS: Hipoclorito sódico. ^a indica que las cepas presentaron susceptibilidad reducida (Intermedia) a ese antibiótico. ^b indica que las cepas presentaron sensibilidad frente a ese antibiótico.

Capítulo II

En cuanto a los factores de virulencia, se detectó el factor *fimA* en las cepas de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Thompson*, tanto en las cepas sin adaptar como en las adaptadas a los tres compuestos.

Los mecanismos que gobiernan cada adaptación específica dependen de una multitud de factores inherentes tanto al biocida particular como a la bacteria. Además, estudios previos han indicado que la exposición de bacterias a biocidas puede dar lugar a adaptaciones fenotípicas reversibles que ocurren como consecuencia de cambios temporales en la expresión génica, como respuesta frente a situaciones de estrés. Por el contrario, otros investigadores destacaron que la exposición a biocidas puede dar lugar a la selección de mutantes resistentes a biocidas con fenotipos estables que no revierten en ausencia del mismo. Esto puede explicar la diversidad dentro de los mecanismos de acción de los biocidas (Henly *et al.*, 2019).

En este estudio, se detectó resistencia a antibióticos y tolerancia a biocidas en diferentes serotipos de *Salmonella* aislados previamente de carne de pollo, y tras adaptarse a alguno de los biocidas comúnmente empleados en la industria alimentaria. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores (Henly *et al.*, 2019; Ritter *et al.*, 2019; Wesgate *et al.*, 2016b), que en algunos casos también han estudiado la presencia de genes de resistencia a antibióticos y de determinantes de resistencia a biocidas en cepas que fueron sometidas a la acción de diferentes biocidas.

4. Conclusiones

Los resultados de este estudio demostraron que la exposición *in vitro* de cepas de *Salmonella enterica* multirresistentes a concentraciones subletales de biocidas, que pueden tener lugar durante varias etapas de la cadena de producción de alimentos, puede reducir la sensibilidad de los cultivos a los antibióticos de uso común. Sin embargo, hay que destacar que los resultados de este trabajo derivan de experimentos de laboratorio y serían necesarias nuevas investigaciones en condiciones prácticas de campo para corroborar estos hallazgos. Además, se requieren investigaciones adicionales para determinar los

mecanismos moleculares que subyacen a la inducción de resistencia fenotípica a los antibióticos por FTS, NS e HS.

Los cultivos expuestos mostraron, en comparación con los cultivos no expuestos, susceptibilidad reducida frente a un amplio rango de antibióticos. El impacto de la exposición a biocidas en la reducción de la susceptibilidad a los antibióticos fue dependiente del serotipo de *Salmonella* y de la familia de antibióticos ensayados, siendo la susceptibilidad a los aminoglucósidos y las cefalosporinas la más fuertemente afectada.

Los resultados del presente estudio sugieren que el uso extensivo de biocidas en concentraciones subletales podría contribuir a la aparición de resistencia a los antibióticos en las cepas de *Salmonella enterica* con resistencias múltiples y favorecer la diseminación de genes de resistencia mediante mecanismos de transferencia horizontal, lo cual va a representar un riesgo para la Salud Pública.

5. BIBLIOGRAFÍA

Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R., 2015. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**, 86-94. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.012>

Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 2009a. Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *Journal of Microbiology* **47**, 142–146. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0237-5>

Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 2009b. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20** (12), 1108–1111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>

Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2010. Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology* **137** (2-3), 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.022>

Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R., 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* **153**, 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.011>

Azadpour, M., Nowroozi J, Goudarzi, G.R., Mahmoudvand, H., 2015. Presence of qacEΔ1 and cepA genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran, *Tropical Biomedicine* **32** (1), 109-115. PMID: 25801259

Braoudaki, M., Hilton, A.C., 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to

antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 73–78. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.73-78.2004>

Cadena, M., Kelman, T., Marco, M.L., Pitesky, M., 2019. Understanding Antimicrobial Resistance (AMR) Profiles Of *Salmonella* Biofilm And Planktonic Bacteria Challenged With Disinfectants Commonly Used During Poultry Processing. *Foods* **8**, 275. <https://doi.org/10.3390/foods8070275>

Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., 2011. Co-resistance: An opportunity for the bacteria and resistance genes. *Current Opinion in Pharmacology* **11**, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.07.007>

Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>

Capita, R., Álvarez-Fernández, E., Fernández-Buelta, E., Manteca, J., Alonso-Calleja, C., 2013. Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry. *Food Microbiology* **34** (1), 112-117. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.11.011>

Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (4), 1268-1280. <http://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>

Capita, R., Cordero, J., Molina-González, D., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C., 2019a. Phylogenetic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from pigeon meat. *Antibiotics* **8** (4), 259. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040259>

Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C., 2019b. Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**, 15905. doi:10.1038/s41598-019-51907-1. <http://doi.org/0.1038/s41598-019-51907-1>

Capítulo II

Centeno, D., Salvatierra, G., Calle, S., 2018. Detection of ACCSuT, BLEE and AmpC resistance phenotypes in *Salmonella enterica* strains isolated from infections in animals. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Peru* **29** (2), 580–587. <https://doi.org/10.15381/rivep.v28i2.14491>

CLSI, 2008. *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved standard M31eA3*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania, PA. USA.

CLSI, 2018. *M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K.A., Walsh, C., Burgess, C., Fanning, S., 2012. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 3087–3097. <https://doi.org/10.1128/AEM.07534-11>

Curiao, T., Marchi, E., Grandgirard, D., León-Sampedro, R., Viti, C., Leib, S.L., Baquero, F., Oggioni, M.R., Martinez, J.L., Coque, T.M., 2016. Multiple adaptive routes of *Salmonella enterica* Typhimurium to biocide and antibiotic exposure. *BMC Genomics* **17**, 491. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2778-z>

Donaghy, J.A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O.N., Jespers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., Quentin, M.C., 2019. Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection* **82** (5), 889–902. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>

Gadea, R., Fernández-Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E., 2016. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International* **85**, 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.033>

Gadea, R., Fernández-Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Ortega, E., 2017. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides

on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology* **63**, 58–71.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.037>

González-Torralba, A., García-Esteban, C., Alós, J.I., 2018. Enteropathogens and antibiotics. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* **36** (1), 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.06.015>

Henly, E.L., Dowling, J.A.R., Maingay, J.B., Lacey, M.M., Smith, T.J., Forbes, S., 2019. Biocide exposure induces changes in susceptibility, pathogenicity, and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **63** (3), e01892-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01892-18>

Humayoun, S.B., Hiott, L.M., Gupta, S.K., Barrett, J.B., Woodley, T.A., Johnston, J.J., Jackson, C.R., Frye, J.G., 2018. An assay for determining the susceptibility of *Salmonella* isolates to commercial and household biocides. *PLoS ONE* **13** (12): e0209072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209072>

Jiang, X., Xu, Y., Li, Y., Zhang, K., Liu, L., Wang, H., Tian, J., Ying, H., Shi, L., Yu, T., 2017. Characterization and horizontal transfer of *qacH*-associated class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from retail meats. *International Journal of Food Microbiology* **258**, 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.009>

Karatzas, K.A.G., Webber, M.A., Jorgensen, F., Woodward, M.J., Piddock, L.J.V., Humphrey, T.J., 2007. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60** (5), 947–955. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm314>

Kim, D., Day, D.F., 2007. A biocidal combination capable of sanitizing raw chicken skin. *Food Control* **18** (10), 1272–1276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.08.004>

Ledder, R.G., Gilbert, P., Willis, C., McBain, A.J., 2006. Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 *ex-situ*

Capítulo II

environmental and human isolates. *Journal of Applied Microbiology* **100**, 1132–1140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02811.x>

Lim, S.C., Foster, N.F., Riley, T. V., 2016. Susceptibility of *Clostridium difficile* to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite. *Anaerobe* **37**, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2015.12.004>

Mavri, A., Smole-Možina, S., 2013. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *International Journal of Food Microbiology* **160** (3), 304–312. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.006>

Moen, B., Rudi, K., Bore, E., Langsrud, S., 2012. Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of *Escherichia coli* with inheritable characteristics. *International Journal of Molecular Sciences* **13** (4), 4101–4123. <https://doi.org/10.3390/ijms13044101>

Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M.F., Doumith, M., Ellington, M.J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Walker, A.S., Phan, H., Sheppard, A.E., 2017. Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: Application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Frontiers in Microbiology* **8**, 182. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00182>

Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande-Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **162** (1), 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>

Pagès, J.M., Masi, M., Barbe, J., 2005. Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends in Molecular Medicine* **11**, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.06.006>

Paul, D., Chakraborty, R., Mandal, S.M., 2019. Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **174**, 601–610. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.083>

Poole, K., 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **56** (1), 20-51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>

Randall, L.P., Cooles, S.W., Coldham, N.G., Penuela, E.G., Mott, A.C., Woodward, M.J., Piddock, L.J.V., Webber, M.A., 2007. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60** (6), 1273–1280. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm359>

Ritter, A.C., Tondo, E.C., Siqueira, F.M., Soggiu, A., Varela, A.P.M., Mayer, F.Q., Brandelli, A., 2019. Genome analysis reveals insights into high-resistance and virulence of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* **306**, 108269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108269>

Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2019. Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* spp. strains on different hydrophobic and hydrophilic surface materials. *Applied Sciences* **9** (23), 5256. <http://doi.org/10.3390/app9235256>

Romero, J.L., Grande-Burgos, M.J., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R., 2017. Resistance to Antibiotics, Biocides, Preservatives and Metals in Bacteria Isolated from Seafoods: Co-Selection of Strains Resistant or Tolerant to Different Classes of Compounds. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1650. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01650>

Schwaiger, K., Harms, K.S., Bischoff, M., Preikschat, P., Mölle, G., Bauer-Unkauf, I., Lindorfer, S., Thalhammer, S., Bauer, J., Hölzel, C.S., 2014. Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans-is there a link to antimicrobial resistance? *Frontiers in Microbiology* **5**, 88. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00088>

Sheridan, À., Lenahan, M., Duffy, G., Fanning, S., Burgess, C., 2012. The potential for biocide tolerance in *Escherichia coli* and its impact on the response to food processing stresses. *Food Control* **26** (1), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.018>

Capítulo II

Sindelar, J.J., Milkowski, A.L., 2012. Human safety controversies surrounding nitrate and nitrite in the diet. *Nitric Oxide* **26** (4), 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.03.011>

Stanojević, D., Čomić L., Stefanović, O., Solujić-Sukdolak, S., 2010. *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives. *Archives of Biological Sciences* **62** (1), 175–183. <https://doi.org/10.2298/ABS1001167S>

Vijayakumar, R., Sandle, T., Al-Aboody, M.S., AlFonaisan, M.K., Alturaiki, W., Mickymaray, S., Premanathan, M., Alsagaby, S.A., 2018. Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* — A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. *Journal of Infection and Public Health* **11** (6), 812–816. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.05.011>

Wales, A.D., Davies, R.H., 2015. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics* **4** (4), 567-604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>

Wesgate, R., Grasha, P., Maillard, J.Y., 2016. Use of a predictive protocol to measure the antimicrobial resistance risks associated with biocidal product usage. *American Journal of Infection Control* **44** (4), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2015.11.009>

Capítulo III

**BIOFILMS, HIDROFOBICIDAD Y CURVAS DE CRECIMIENTO EN
CEPAS DE *Salmonella enterica* SOMETIDAS AL EFECTO DE
VARIOS BIOCIDAS DE USO ALIMENTARIO**

1. Introducción.

Los biofilms o biopelículas son estructuras tridimensionales de microorganismos que se adhieren a superficies bióticas o abióticas. En general, están formados por células individuales o pequeños grupos de células que luego se dividen y se diferencian en comunidades complejas con matrices extracelulares, presentando canales de agua y estando compuestas por proteínas, lípidos y ácidos nucleicos extracelulares incrustados (González-Machado *et al.*, 2018; Kassinger y Hoek, 2020; Kostakioti *et al.*, 2013; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2018). Actualmente, las proteínas extracelulares, los carbohidratos y los ácidos nucleicos se consideran los componentes principales de estas estructuras. Debe señalarse que las biopelículas contribuyen a la supervivencia bacteriana al aumentar la adherencia a diversas superficies, favorecer la protección contra la depredación, la desecación y el ataque inmunitario, ofreciendo protección frente al uso de antibióticos y contra la inanición a través del almacenamiento de carbono. Todo ello favorece la patogenicidad y la supervivencia ambiental de las bacterias (Galié *et al.*, 2018; Kassinger y Hoek, 2020; Kostakioti *et al.*, 2013; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019).

Los microorganismos han desarrollado varias estrategias para resistir frente a los efectos de los antimicrobianos, entre las que se incluyen la formación de biofilms, la reducción de la permeabilidad celular, la expresión incrementada de bombas de expulsión, la modificación o superproducción de los lugares diana o receptores y la adquisición de rutas metabólicas alternativas a las inhibidas por el antimicrobiano (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Ortega Morente *et al.*, 2013; Reygaert, 2018). La capacidad de formación de biofilms es un mecanismo indirecto de resistencia bacteriana, que puede verse incrementada por el uso de biocidas y antibióticos (Henly *et al.*, 2019; Shi y Zhu, 2009; Singh *et al.*, 2017). Por otro lado, el uso de compuestos biocidas puede favorecer la expresión de mecanismos de resistencia a antibióticos, así como favorecer el incremento en la capacidad de formación de biofilms, cuando se emplean en unas condiciones determinadas (Capita *et al.*, 2014; Molina-González *et al.*, 2014). Dicho incremento de la tolerancia bacteriana a los biocidas va a suponer un importante motivo de preocupación en el contexto de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, ya que

Capítulo III

puede dar lugar y favorecer la persistencia de los microorganismos patógenos e indeseables a lo largo de la cadena alimentaria (Capita *et al.*, 2019a).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está controlado por una compleja cascada de reguladores (Kuchma *et al.*, 2005). Las bacterias tienen un sistema de comunicación que facilita la adaptación a ambientes cambiantes mediante la modulación de la expresión génica (Daniels *et al.*, 2004; Scheuerl *et al.*, 2020). Dicha comunicación se lleva a cabo a través de pequeñas moléculas señal autoinductoras (*quorum sensing*) que permiten a la bacteria percibir la densidad de población existente y acumularse alrededor de las células en crecimiento. Cuando la concentración es alta, se inicia la expresión de genes implicados en la formación del biofilm. Existen diferentes tipos de biofilms ya que en función de las condiciones ambientales un tipo de bacterias es capaz de formar diversas clases de ellos (Andersen, 2016; Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Los biofilms formados por bacterias patógenas son considerados como un desafío global, dando lugar a que investigadores de todo el mundo propongan o desarrollen alternativas para su control (Fagerlund *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2020; Malheiro *et al.*, 2019), ya que los microorganismos organizados en biofilms son responsables de casos y brotes de infecciones humanas, tanto en el ámbito hospitalario como en el entorno de la Industria Alimentaria (Abebe, 2020). Dichos biofilms suponen un grave problema de salud mundial debido a su capacidad para favorecer en las bacterias la tolerancia a antibióticos, combatir los sistemas de defensa del hospedador y otros agentes externos, contribuyendo por lo tanto al desarrollo de infecciones crónicas persistentes (Sharma *et al.*, 2019). Se requieren altas dosis de antibióticos durante un periodo prolongado de tiempo para combatir estas estructuras, y estos procedimientos a menudo fracasan, contribuyendo a la persistencia de la infección. Además, la mayoría de los antibióticos disponibles se han desarrollado para combatir células microbianas planctónicas, lo que provoca una brecha en el campo de los biofilms (Merino *et al.*, 2019; Ribeiro *et al.*, 2016).

La formación de biofilms en la industria alimentaria está condicionada por una compleja interacción de factores (medio ambiente, célula, industria y propiedades de las superficies) que da como resultado la formación del mismo, su arquitectura (diseño complejo de la estructura del biofilm) y, por lo tanto, su funcionalidad (modo

de actuación del biofilm) que en última instancia está relacionada con el entorno industrial en el que se encuentra el alimento (Whitehead y Verran, 2015). En dicho entorno, uno de los mayores problemas que nos encontramos radica en que entre los microorganismos formadores de biofilms se encuentran algunos de los principales microorganismos responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias humanas, tales como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* o *Listeria monocytogenes*, entre otros microorganismos, que pueden poner en riesgo la salud humana. La magnitud de este riesgo va a depender de las especies bacterianas que formen parte del biofilm (Camargo *et al.*, 2017; Galié *et al.*, 2018). De ellos, *Salmonella enterica* continúa siendo el agente causal más frecuentemente implicado en brotes de origen alimentario, como ha sido expuesto en apartados previos de esta memoria. Las ubicaciones principales para la formación del biofilm va a depender del tipo de fábrica, pero se pueden desarrollar estas estructuras sobre diversas superficies de contacto, conducciones, tuberías de leche, agua u otros líquidos, silos de almacenamiento para materias primas, materiales y aditivos, membranas de ósmosis inversa, etc. (Galié *et al.*, 2018a; Nkemnaso y Chibueze, 2018). Los biofilms presentes tanto en superficies de contacto con los alimentos como en las instalaciones y equipos de las industrias de procesado de los mismos, son indeseables, ya que constituyen una fuente persistente de contaminación microbiana de los productos alimenticios, que puede dar lugar al deterioro del alimento o a la transmisión de patógenos alimentarios. Además, las células asociadas a los biofilms suelen presentar una elevada resistencia a los antimicrobianos, incluyendo antibióticos y biocidas, por lo que estas células son más resistentes frente a los procesos de limpieza y desinfección (L+D) que se usan habitualmente en la industria alimentaria (Costerton *et al.*, 1987; Sanchez-Vizueté *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2019).

El mecanismo más habitual para la formación de biofilms en *Salmonella* es la co-expresión de fimbrias curli, que facilitan la adhesión, junto a celulosa, mejorando la capacidad para formar biofilms sobre ciertas superficies abióticas (Beshiru *et al.*, 2018; Giaouris *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 2018; MacKenzie *et al.*, 2017). A este problema se le une la capacidad que tienen estas bacterias sésiles para sobrevivir y adaptarse frente a los productos de L+D. Hay una serie de circunstancias en las que se pueden aplicar biocidas en dosis subinhibitorias, por ejemplo, como

Capítulo III

consecuencia de cálculos incorrectos de las concentraciones a utilizar, de un almacenamiento inadecuado de las sustancias que conduce a una pérdida de eficacia, de la presencia de cantidades excesivas de material orgánico capaz de inactivar varios compuestos de cloro como el hipoclorito de sodio, de una distribución desigual de los biocidas o de la dificultad para asegurar que los desinfectantes lleguen a ciertas áreas (Capita *et al.*, 2014; Capita *et al.*, 2019b). Además, el empleo de los diferentes productos de L+D pueden afectar al crecimiento bacteriano de diferente manera (Donaghy *et al.*, 2019). Estudios previos realizados sobre enterobacterias (*Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, principalmente) han demostrado que la exposición repetida a dosis sub-inhedorias de desinfectantes desencadena una adaptación de las poblaciones bacterianas a los biocidas, al tiempo que modifica el patrón de resistencia frente a antibióticos (Capita *et al.*, 2014; Molina-González *et al.*, 2014; Capita *et al.*, 2019b). Se ha sugerido que existe un vínculo directo entre tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos, ya que los mecanismos que contribuyen a ambas circunstancias son similares, por ejemplo, cambios en la permeabilidad celular o la síntesis de bombas de expulsión (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2019a).

Debido a la persistencia de la formación de biofilms de *Salmonella* en los entornos de procesamiento de alimentos después de la L+D, las estrategias de control y erradicación en la industria alimentaria deben estar en constante estudio. En este sentido, se ha probado con éxito el uso de varias alternativas para controlar la formación de biofilm de *Salmonella*, tales como el uso de bacterias ácido lácticas y bacteriocinas, de fagos, o el empleo de extractos de plantas aromáticas, inhibidores de *quorum sensing*, o el uso de nanomateriales y de sustancias surfactantes y biosurfactantes, entre otros (Galié *et al.*, 2018; Merino *et al.*, 2019). Debido a la resistencia de las biopelículas de *Salmonella* a los desinfectantes y antibióticos, es importante evaluar y desarrollar estrategias alternativas para prevenir su formación, que es la mejor estrategia para erradicar las biopelículas bacterianas de entornos relacionados con los alimentos (Merino *et al.*, 2019).

Las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular de las membranas de las bacterias tienen efectos sobre la formación de los biofilms. Por ello, la hidrofobicidad de la superficie celular podría afectar a la capacidad de las células bacterianas para agregarse y así favorecer la formación de los biofilms (Fernandes

et al., 2014). Dicha hidrofobicidad se caracteriza por la adherencia de las células a los hidrocarburos, lo que favorece la capacidad de las bacterias para adherirse a las superficies bióticas o abióticas. Las células hidrofóbicas son más adherentes que las hidrofílicas a los tejidos epiteliales y endoteliales (Biniarz *et al.*, 2015) y, por ello, la hidrofobicidad podría considerarse como uno de los factores de virulencia más importantes, ya que contribuye a la adherencia de los microorganismos al tejido del hospedador (Lagha *et al.*, 2020; Vesterlund *et al.*, 2005). La hidrofobicidad de varias especies bacterianas puede aumentar o disminuir cuando las células están bajo estrés o entran en un estado latente; se pueden provocar cambios en relación con su viabilidad y capacidad de cultivo, hecho que puede ser relevante para el potencial patogénico de las mismas (Dykes *et al.*, 2003), pudiendo ser además responsables de causar enfermedad, en el caso de determinados patógenos entéricos, al relacionarse su potencial hidrofóbico con su capacidad de unirse a las células epiteliales humanas (Yaron y Römling, 2014; Haddaji *et al.*, 2015). La alta hidrofobicidad de los microorganismos se asocia, generalmente, con la presencia de estructuras fibrilares en la superficie y proteínas específicas de la pared celular (Liu *et al.*, 2004) y dependiendo del tipo de superficie, la hidrofobicidad de las células puede incrementar la capacidad de los microorganismos para la adhesión. Las células hidrofóbicas se adhieren más fuertemente a las superficies hidrofóbicas, siendo a su vez más adherentes que las hidrofílicas a los tejidos epiteliales y endoteliales (Biniarz *et al.*, 2015; Krasowska y Sigler, 2014).

La hidrofobicidad microbiana juega un papel importante en procesos como la producción de alimentos y el deterioro de los mismos. Las interacciones entre microorganismos y componentes de los alimentos, como lípidos y proteínas, pueden influir y modificar la estabilidad de las emulsiones alimentarias. Las bacterias con las superficies más hidrófobas tienen una mayor afinidad por la grasa de la leche y los compuestos aromáticos (Krasowska y Sigler, 2014). La hidrofobicidad de la superficie celular puede cambiar, siendo influenciada por compuestos hidrofóbicos como hidrocarburos o agentes tensioactivos. La modificación de las propiedades superficiales de los microorganismos les permite utilizar y adaptarse a distintos sistemas ecológicos, pudiendo estar asociados estos cambios a variaciones en las fuentes disponibles de carbono y energía que afectan y modifican la superficie celular (Kaczorek *et al.*, 2013).

Capítulo III

Al igual que la capacidad hidrofóbica, se cree que existe una correlación entre la capacidad de formación de biofilm y los parámetros cinéticos de crecimiento, tales como fase de latencia (Lag) y el ritmo de crecimiento. La curva típica de crecimiento microbiano (Figura III.1) es de tipo sigmoideo (Swinnen *et al.*, 2004) y se caracteriza por estar compuesta por la fase de latencia, la fase de crecimiento exponencial, la fase estacionaria y la fase de muerte (Forget *et al.*, 2010; Rolfe *et al.*, 2012). La fase de latencia es de vital importancia para el crecimiento microbiano, ya que es el tiempo que tarda una población microbiana, o una célula, en adaptarse al medio para poder desarrollarse (Buchanan *et al.*, 1991). Por tanto, durante la fase de latencia, las células se adaptan a su nuevo entorno, induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético y, en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas. Debido a que el crecimiento de microorganismos patógenos en los productos alimenticios no es aceptable, de encontrarse alguno en un alimento, esto sería un mal menor, si lográsemos que su fase de latencia fuera infinita, es decir, que las condiciones que rodean al alimento no fueran óptimas e impidieran el crecimiento; si éstas no representan tal barrera al desarrollo microbiano, al menos será muy conveniente conocer con exactitud la fase de latencia (McMeekin *et al.*, 2002, 1997), así como la velocidad de crecimiento del patógeno, para predecir, siempre que se sepa su carga inicial, cuándo puede alcanzarse la dosis infectiva (Leggett *et al.*, 2017).

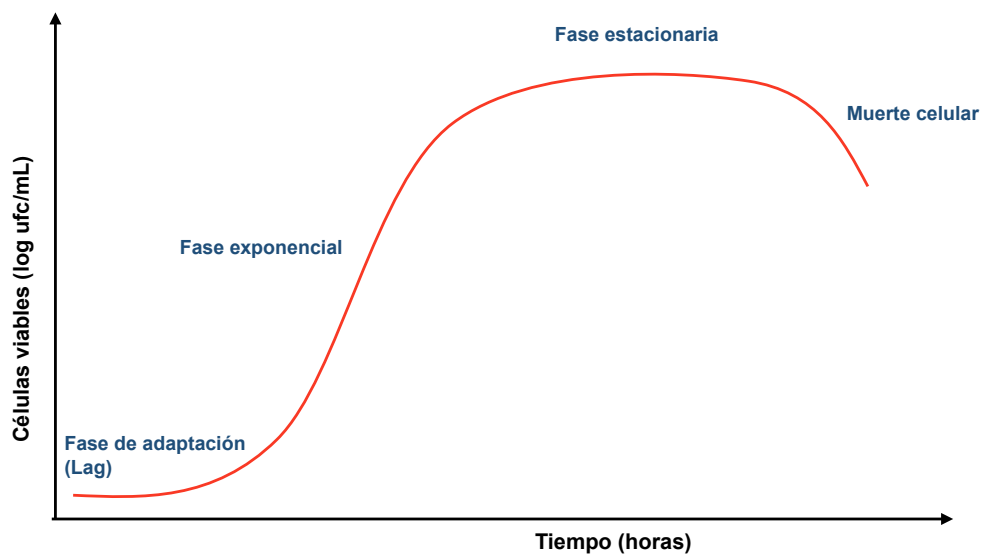


Figura III.1 Curva de crecimiento microbiano con las diferentes etapas o fases de crecimiento y muerte.

El objetivo de este Capítulo es determinar cómo influye la adaptación y/o exposición a tres biocidas de uso en el ámbito alimentario (fosfato trisódico, nitrito sódico e hipoclorito sódico) en la capacidad para formar biofilm, la hidrofobicidad superficial, los parámetros cinéticos de crecimiento y la actividad de las bombas de expulsión en una colección de 10 cepas de *Salmonella enterica* pertenecientes a 10 serotipos diferentes.

2. Material y métodos

2.1 Cepas y biocidas

En este Estudio se han utilizado las 10 cepas de *Salmonella enterica* de 10 serotipos diferentes descritas en capítulos anteriores de esta Tesis (SA, SA2, SE, SH, SI, SK, ST1, ST2, S1, SV), tanto adaptadas como sin adaptar. Durante el experimento, las cepas se conservaron a 4 ± 1 °C en placas de Agar Triptona Soja (TSA, Oxoid, Hampshire, England, Reino Unido) con una concentración de cada biocida igual a la MIC/2 obtenida para cada uno de ellos. Tanto las cepas control (no adaptadas) como las adaptadas se incubaron en caldo sin biocidas o con biocidas (MIC/2; cepas expuestas). Los biocidas empleados (FTS, NS e HS) se han descrito en capítulos previos de esta Memoria de Tesis Doctoral.

2.2 Formación de biofilm

Para determinar la cantidad de biofilm formado por las diferentes cepas de *Salmonella enterica* en el presente Estudio, se ha utilizado el método descrito por Stepanović *et al.* (2004), con algunas modificaciones. La densidad óptica de las células adheridas se determinó en placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia) después de teñir con cristal violeta y enjuagar.

El ensayo se ha realizado utilizando las 10 cepas de *Salmonella enterica* sin adaptar y adaptadas al FTS, NS y HS, y también tras la exposición de las mismas a los tres biocidas usados. Se realizó la siembra de cada una de las cepas en caldo TSB en presencia (MIC/2) y en ausencia de los mismos biocidas. Después de un periodo de incubación a 37 °C durante 5 horas, los cultivos bacterianos contenían aproximadamente 10^8 ufc/ mL. Se realizaron tres diluciones decimales para partir

Capítulo III

de una concentración inicial de bacterias del orden de 10^5 ufc/ mL. Posteriormente, se sembraron en las placas de microtítulo de poliestireno 20 μ L de la última dilución y se añadieron 230 μ L de caldo TSB (sin o con biocida, para asegurar la concentración MIC/2 en el pocillo), siendo el volumen final de 250 μ L y la concentración final de bacterias del orden de 10^4 ufc/mL. Dicha concentración se confirmó mediante siembra y recuento en placa. Los pocillos utilizados para los controles negativos contenían 250 μ L de TSB y TSB suplementado con biocida. Se utilizaron 5 controles negativos en cada ensayo. Las placas se incubaron en condiciones aerobias durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido este periodo, el contenido de la placa se eliminó y los pocillos se lavaron con 300 μ L de agua destilada, procedimiento que se repitió dos veces. Las bacterias que permanecieron adheridas se fijaron a la placa agregando 250 μ L de metanol en cada pocillo durante 15 minutos. Luego se vaciaron las placas y se dejaron secar al aire. Una vez secas, se tiñeron con 250 μ L de cristal violeta, que se dejó actuar durante 5 min. El exceso de colorante se enjuagó colocando la placa de microtítulo directamente debajo del agua corriente del grifo. Tras el secado al aire de las placas, el colorante unido a las células adheridas se solubilizó con 250 μ L de ácido acético glacial al 33%. La densidad óptica de cada pocillo se midió a 580 nm (DO_{580}) usando un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Las placas de microtítulo se agitaron durante un minuto antes de la medición de esta turbidez. Todos los experimentos se repitieron tres veces en días separados. Se realizaron un total de 480 pruebas.

La DO_{580} de corte (DOc) se definió como el valor de tres desviaciones estándar más la media de la DO_{580} de los controles negativos. Las cepas se clasificaron en tres categorías: no productoras de biofilm, cuando $DO_{580} \leq DOc$, productoras débiles de biofilm, cuando $DOc < DO_{580} \leq (2 \times DOc)$, productoras moderadas de biofilm, cuando $(2 \times DOc) < DO_{580} \leq (4 \times DOc)$, o fuertes productoras de biofilm, cuando $(4 \times DOc) < DO_{580}$. Las diferencias en el grado de formación de biofilm se determinaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), utilizando para la separación de medias la prueba de rango múltiple de Duncan. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$).

2.3. Curvas de crecimiento.

El experimento se realizó en placas de microtítulo y los pocillos se llenaron de la misma manera que se describió para la formación de biofilms (10^4 ufc / mL). El crecimiento bacteriano se observó previamente a la incubación (tiempo 0) y a partir de aquí cada dos horas hasta un tiempo final de 120 horas. El crecimiento se determinó midiendo la DO a 420-580 nm ($DO_{420-580}$) utilizando el Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). Las placas se agitaron durante un minuto antes de cada medición de la turbidez. El modelo utilizado para ajustar las curvas de crecimiento a los datos obtenidos fue la ecuación de Gompertz modificada (Garthright, 1991):

$$DO_t = A + B * \exp(-\exp(2.71828183 * \mu * (L - t) / B + 1))$$

donde t es el tiempo en horas transcurrido desde la inoculación, DO_t es la densidad óptica (determinada a 420-580 nm; $DO_{420-580}$) en el tiempo t , L es el tiempo de duración de la fase de latencia (Lag, horas), μ es el ritmo de crecimiento máximo ($\Delta DO / h$), B es el incremento en la $DO_{420-580}$ desde la inoculación hasta la fase estacionaria (E), y A es la asíntota superior de la curva (concentración de bacterias en la etapa estacionaria, E) - B . Los valores para L , μ y B se obtuvieron para cada cepa y réplica ajustando el conjunto de datos a una curva sigmoideal usando un algoritmo de Levenberg-Marquardt. Las diferencias en los parámetros determinados en las curvas de crecimiento (fase Lag, ritmo de crecimiento máximo e incremento de la densidad óptica) se determinaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), utilizando para la separación de medias la prueba de rango múltiple de Duncan. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$).

2.4 Determinación de la hidrofobicidad.

La hidrofobicidad de las células microbianas se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a solventes (MATS), basada en la afinidad por los solventes no polares (To *et al.*, 2002). Se usaron xileno y hexadecano como fase de hidrocarburos (Figura III.2).

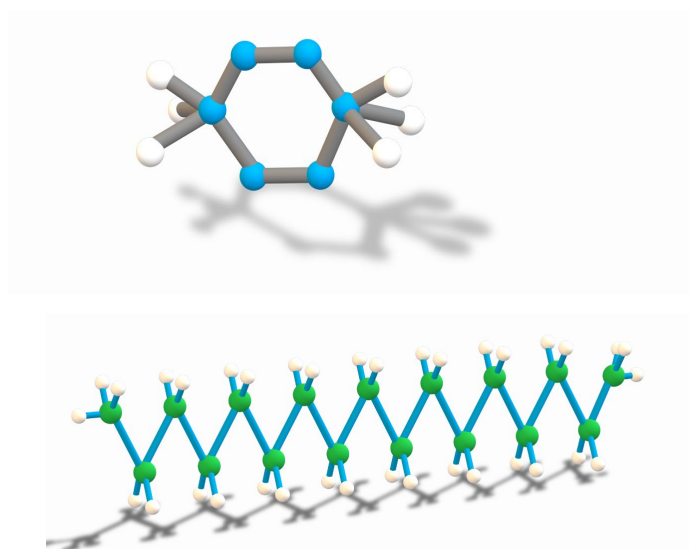


Figura III.2 Estructura química del xileno $C_6H_4(CH_3)_2$ y hexadecano ($C_{16}H_{34}$).

Se sembraron las cepas de *Salmonella*, tanto las adaptadas a los tres biocidas como las cepas sin adaptar, en 10 mL de caldo TSB con o sin biocida (MIC/2). Para llevar a cabo el experimento se recogieron, por centrifugación (5.000 g; 10 min), células de *Salmonella* en la fase logarítmica (aproximadamente 16 horas de incubación). A continuación, se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato estéril (pH = 7,0) y se resuspendieron en una solución salina de (NaCl 0,15 M) obteniendo una concentración aproximada de 10^8 ufc / mL (la concentración se comprobó por siembra en placa). La suspensión celular (2,4 mL) se mezcló por agitación con 0,4 mL del disolvente apolar apropiado (xileno o hexadecano) durante 60 segundos y se dejó reposar durante 15 min a temperatura ambiente, lo que permitió una separación completa de las dos fases (acuosa y orgánica). Se recogió la fase acuosa de la muestra (1 mL) y se determinó la absorbancia a 400 nm (Bioscreen C MBR). El porcentaje de células presentes en el solvente se calculó con la siguiente ecuación: porcentaje de afinidad = $100 \times (1 - (A / A_0))$, donde A_0 es la absorbancia de la suspensión original a 400 nm antes de

mezclar y A es la absorbancia de la fase acuosa. Cada experimento se realizó por triplicado en días separados. La hidrofobicidad de la superficie celular se agrupó en tres categorías en función del resultado de la fórmula anterior: débil (<21%), moderada (21% - 50%) y fuerte (> 50%) (Norouzi *et al.*, 2010).

2.5. Determinación de la actividad de las bombas de expulsión.

Para determinar la actividad de las bombas de expulsión se utilizó como inhibidor carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP; concentración final 80 mM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Se ensayó dicho compuesto a diferentes concentraciones para asegurar que al añadirlo en ausencia de biocidas no se inhibe el crecimiento bacteriano. Los parámetros cinéticos de crecimiento para los diferentes serotipos de *Salmonella* se determinaron tanto en ausencia como en presencia de CCCP para todas las condiciones probadas (células adaptadas y no adaptadas en la ausencia o presencia de concentraciones sub-inhedoras de biocidas). Las cepas control y adaptadas crecidas en presencia de CCCP sin biocidas se utilizaron para asegurar que el CCCP no tuviera efecto inhibitorio. Los valores para L, μ y B se obtuvieron para cada cepa y réplica ajustando el conjunto de datos a una curva sigmoideal usando un algoritmo de Levenberg-Marquardt. Las diferencias en los parámetros determinados en las curvas de crecimiento (fase Lag, tasa de crecimiento y valores de densidad óptica) se determinaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), utilizando para la separación de medias la prueba de rango múltiple de Duncan. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de confianza del 95% ($P < 0,05$).

3. Resultados y discusión

3.1 Formación de biofilm.

La ciencia y la tecnología de biofilms es un campo de estudio activo desde finales de la década de 1960, desde que Bill Costerton enunciara la primera definición de biofilm (Costerton *et al.*, 1987). Hoy en día, se sabe que la mayoría de los microorganismos encontrados en la naturaleza están unidos a las superficies dentro de un ecosistema estructurado, como es el biofilm. La percepción de las biopelículas ha cambiado considerablemente en las últimas décadas como consecuencia del desarrollo tecnológico y la adaptación a nuevas tecnologías de

Capítulo III

imagen, que nos permiten obtener una vista de la estructura tridimensional de la biopelícula y una descripción más detallada. Sin embargo, la formación de biofilms en placas de microtítulo de poliestireno sigue siendo uno de los métodos usados con mayor frecuencia para el estudio de los biofilms (Azeredo *et al.*, 2017).

En nuestro Estudio, pudimos comprobar que todas las cepas de *Salmonella enterica* analizadas fueron formadoras de biofilm en las placas de microtítulo de poliestireno. Se llevaron a cabo un total de 480 pruebas, teniendo en cuenta que se analizó la capacidad formadora de biofilms de las cepas control, de las cepas adaptadas al FTS, al NS y al HS (Tabla III.1A), y también se estudió el efecto que tenía sobre ellas el hecho de exponerlas o no a esos mismos biocidas (Tablas III.1 A, B, C, D). Se obtuvo un valor de DO_{580nm} de corte (estimado como tres desviaciones estándar sobre la media de la DO_{580} de los controles negativos) de 0,116, valor que se utilizó para la clasificación de las cepas, como no formadoras de biofilm ($DO_{580nm} \leq 0,116$), formadoras débiles ($0,116 > DO_{580nm} \leq 0,232$), moderadas ($0,232 > DO_{580nm} \leq 0,464$), y fuertes formadoras de biofilm ($DO_{580nm} > 0,464$). Cuando analizamos la capacidad de formación de biofilm de las cepas de *Salmonella* no adaptadas y no expuestas (cepas control, Tabla III.1 A) destacaron como formadoras fuertes de biofilm las cepas de *S. Agona* y *S. Infantis*, con valores de DO_{580nm} de $1,91 \pm 0,34$ y $1,86 \pm 0,17$, respectivamente, siendo significativamente diferentes ($P < 0,05$) al resto de los serotipos estudiados. Otros autores, como Wang *et al.* (2013), que estudiaron la capacidad formadora de biofilms en cepas de *Salmonella* procedentes de canales de pollo, también observaron que *S. Agona* y *S. Infantis* presentaban una elevada capacidad formadora de biofilm en comparación con otros serotipos de su investigación. Asimismo, Moraes *et al.* (2019) analizaron la capacidad formadora de biofilms en cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos involucrados en casos de salmonelosis, comprobando que *S. Infantis* presentaba una fuerte capacidad de formación de biofilms. Por otra parte, Arteaga *et al.* (2019), en el caso de los serovares *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* procedentes, también, de carne de pollo, encontraron que eran formadores moderados de biofilm, al igual que ocurrió en nuestra investigación. Para el resto de los serotipos estudiados se observó una débil capacidad formadora de biofilm. Díez-García *et al.* (2012) analizaron la capacidad de formación de biofilm en cepas de *Salmonella* procedentes de canales de pollo y obtuvieron, también, unos

resultados similares a los obtenidos en nuestro Estudio, ya que encontraron que la cepa de *S. Agona* resultó ser fuerte formadora de biofilm, las cepas de *S. Typhimurium* y *S. Enteritidis* fueron formadoras moderadas y la cepa de *S. Virchow* tuvo una capacidad de formar biofilm débil. Sin embargo, en su caso, *S. Infantis* resultó ser formadora moderada. Por todo ello, parece bastante probable que la capacidad formadora de biofilm en las cepas de *Salmonella* analizadas es una propiedad dependiente del serotipo, algo que ya ha sido indicado con anterioridad (Capita *et al.*, 2019b; Díez-García *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). El efecto del serotipo, la adaptación y la exposición a los biocidas en la capacidad de formación de biofilms de las cepas de *Salmonella enterica* analizadas, se muestra en las Tablas III.1 (A, B, C y D). De manera global, se pudo observar el efecto de la cepa (serotipo), independientemente del tratamiento de exposición y de la adaptación, en la capacidad de las cepas para formar biofilm ($P < 0,05$).

En el caso particular de formación de biofilms por influencia de la adaptación, se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los compuestos. Por lo que respecta al NS, la adaptación tuvo una escasa influencia en la capacidad de las cepas para formar biofilm, y únicamente la cepa de *S. Typhimurium* pasó de formadora moderada a fuerte formadora de biofilm en presencia de NS. Las cepas de *S. Agona* y *S. Infantis* destacaron como las de mayor capacidad formadora de biofilms, tanto cuando no están adaptadas como cuando lo están frente a los tres biocidas usados, con valores medios de densidad óptica de entre 3 y 13 veces superiores al resto de las cepas. La adaptación al FTS fue la que provocó mayor incremento en la capacidad de formación de biofilm. Así, cepas como *S. Hadar*, *S. Enteritidis* y la variante monofásica de *S. Typhimurium* destacaron como fuertes formadoras de biofilm al estar adaptadas a este compuesto. Por su parte, la adaptación al HS provocó un incremento en la capacidad de formación de biofilm de la cepa de *S. Hadar*.

El tratamiento de exposición, independientemente de la cepa y de la adaptación, ejerció una influencia significativa sobre la capacidad de las cepas para formar biofilm (Tabla III.2). El efecto de la exposición al FTS y al HS fue similar. Lamas *et al.* (2018) estudiaron la capacidad formadora de biofilm en 10 cepas de *Salmonella enterica* de diferentes serotipos aisladas de carne de pollo, evaluando el efecto de la exposición de las mismas frente a tres conservantes usados en el ámbito alimentario, entre ellos estudiaron el nitrito sódico. Estos autores obtuvieron

Capítulo III

valores similares de formación de biofilms tanto para las cepas no expuestas como para las expuestas al efecto del NS, resultando ser el tratamiento menos efectivo sobre la capacidad de formación de biofilm dentro de su estudio. En nuestro caso, la exposición frente al NS fue la que proporcionó unos valores de formación de biofilm significativamente más bajos ($P < 0,05$), incluso menores que en las cepas no expuestas, correspondiendo los mayores valores más elevados a los obtenidos tras la exposición al FTS y al HS.

Tabla III.1.A. Formación de biofilm en cepas de *Salmonella enterica* sin adaptar (cepas control) y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario.

| cepa | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| SA1 | 1,910±0,336 ^b | 2,043±0,252 ^e | 2,000±0,430 ^d | 2,290±0,158 ^c |
| SA2 | 0,196±0,019 ^a | 1,435±0,404 ^{cd} | 0,167±0,043 ^a | 0,154±0,035 ^a |
| SE | 0,249±0,034 ^a | 1,438±0,418 ^{cd} | 0,283±0,075 ^{ab} | 0,212±0,032 ^a |
| SH | 0,165±0,013 ^a | 0,698±0,195 ^b | 0,177±0,029 ^a | 1,787±0,063 ^b |
| SI | 1,860±0,169 ^b | 1,821±0,133 ^{de} | 1,753±0,088 ^c | 1,701±0,068 ^b |
| SK | 0,155±0,025 ^a | 0,131±0,032 ^a | 0,148±0,015 ^a | 0,139±0,014 ^a |
| ST1 | 0,213±0,051 ^a | 0,176±0,042 ^a | 0,188±0,011 ^a | 0,209±0,017 ^a |
| ST2 | 0,271±0,091 ^a | 0,119±0,005 ^a | 0,473±0,027 ^b | 0,202±0,101 ^a |
| S1 | 0,157±0,011 ^a | 1,364±0,366 ^c | 0,147±0,000 ^a | 0,128±0,027 ^a |
| SV | 0,137±0,031 ^a | 0,179±0,072 ^a | 0,120±0,011 ^a | 0,130±0,008 ^a |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. Los valores en la misma columna que no comparten ninguna letra presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Tabla III.1.B. Formación de biofilm en cepas de *Salmonella enterica* sin adaptar y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario y expuestas al efecto del FTS.

| CEPA | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SA1 | 2,225±0,215 ^a | 2,330±0,074 ^c | 2,240±0,010 ^b | 2,497±0,056 ^d |
| SA2 | 0,162±0,044 ^b | 1,764±0,312 ^b | 0,127±0,016 ^a | 0,148±0,048 ^a |
| SE | 0,328±0,290 ^b | 0,123±0,017 ^a | 0,332±0,330 ^a | 0,137±0,017 ^a |
| SH | 0,146±0,028 ^b | 0,136±0,028 ^a | 0,148±0,027 ^a | 2,042±0,225 ^b |
| SI | 2,243±0,199 ^a | 2,124±0,366 ^c | 1,954±0,234 ^b | 2,189±0,195 ^c |
| SK | 0,185±0,048 ^b | 0,130±0,013 ^a | 0,136±0,021 ^a | 0,141±0,018 ^a |
| ST1 | 0,168±0,040 ^b | 0,133±0,045 ^a | 0,157±0,024 ^a | 0,175±0,027 ^a |
| ST2 | 0,263±0,095 ^b | 0,230±0,156 ^a | 0,339±0,069 ^a | 0,255±0,125 ^a |
| S1 | 0,149±0,026 ^b | 2,201±0,255 ^c | 0,278±0,251 ^a | 0,178±0,072 ^a |
| SV | 0,137±0,024 ^b | 0,146±0,014 ^a | 0,123±0,008 ^a | 0,123±0,005 ^a |

Para interpretación, ver Tabla III.1.A.

Tabla III.1.C. Formación de biofilm en cepas de *Salmonella enterica* sin adaptar y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario y expuestas al efecto del NS.

| CEPAS | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|-------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SA1 | 1,301±0,138 ^b | 0,253±0,135 ^b | 1,620±0,190 ^c | 0,148±0,041 ^a |
| SA2 | 0,112±0,006 ^a | 0,161±0,004 ^{ab} | 0,116±0,019 ^a | 0,117±0,004 ^a |
| SE | 0,164±0,044 ^a | 0,120±0,010 ^a | 0,121±0,013 ^a | 0,120±0,016 ^a |
| SH | 0,137±0,028 ^a | 0,164±0,073 ^{ab} | 0,111±0,009 ^a | 1,769±0,173 ^c |
| SI | 1,347±0,217 ^b | 0,125±0,009 ^a | 1,370±0,282 ^b | 1,300±0,134 ^b |
| SK | 0,126±0,022 ^a | 0,132±0,016 ^a | 0,115±0,018 ^a | 0,115±0,007 ^a |
| ST1 | 0,139±0,030 ^a | 0,140±0,031 ^a | 0,127±0,018 ^a | 0,132±0,025 ^a |
| ST2 | 0,113±0,011 ^a | 0,123±0,017 ^a | 0,124±0,014 ^a | 0,112±0,005 ^a |
| S1 | 0,123±0,010 ^a | 0,163±0,027 ^{ab} | 0,129±0,015 ^a | 0,117±0,003 ^a |
| SV | 0,120±0,014 ^a | 0,109±0,013 ^a | 0,116±0,010 ^a | 0,113±0,006 ^a |

Para interpretación, ver Tabla III.1.A.

Tabla III.1.D. Formación de biofilm en cepas de *Salmonella enterica* sin adaptar y adaptadas a tres biocidas de uso alimentario y expuestas al efecto del HS.

| CEPAS | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|-------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SA1 | 1,680±0,197 ^d | 2,030±0,473 ^c | 2,005±0,440 ^b | 2,217±0,378 ^b |
| SA2 | 0,162±0,016 ^{ab} | 1,031±0,043 ^b | 0,171±0,031 ^a | 0,122±0,006 ^a |
| SE | 0,140±0,008 ^a | 0,765±0,554 ^{ab} | 0,139±0,019 ^a | 0,138±0,023 ^b |
| SH | 0,178±0,056 ^{ab} | 0,132±0,019 ^a | 0,158±0,012 ^a | 1,843±0,627 ^b |
| SI | 2,437±0,279 ^e | 2,075±0,525 ^c | 1,860±0,805 ^b | 2,216±0,596 ^a |
| SK | 0,201±0,034 ^{ab} | 0,176±0,035 ^a | 0,163±0,024 ^a | 0,123±0,010 ^a |
| ST1 | 0,221±0,045 ^{ab} | 1,180±0,137 ^b | 0,227±0,027 ^a | 0,131±0,017 ^a |
| ST2 | 0,573±0,049 ^c | 0,266±0,148 ^a | 0,500±0,095 ^a | 0,679±0,269 ^a |
| S1 | 0,394±0,219 ^{bc} | 2,396±0,572 ^c | 0,474±0,223 ^a | 0,134±0,013 ^a |
| SV | 0,137±0,020 ^a | 0,230±0,057 ^a | 0,150±0,023 ^a | 0,139±0,027 ^a |

Para interpretación, ver Tabla III.1.A.

Independientemente de la adaptación previa, las cepas con mayor capacidad para formar biofilm fueron SA1 y SI. Por el contrario, las cepas con menor capacidad de formación de biofilm fueron SV y SK. Si nos centramos en el efecto del tratamiento, independientemente de la cepa estudiada, se observó que éste ejerció diferencias significativas ($P < 0,05$), tanto para las cepas no adaptadas como para las adaptadas previamente a los tres biocidas.

La capacidad de formar biofilm fue débil o moderada cuando las cepas se expusieron al NS, tanto en los serotipos sin adaptar o como en los adaptados con

Capítulo III

anterioridad a los biocidas. Por su parte, en ausencia de biocidas o con exposición al FTS y HS, las cepas tuvieron fuerte capacidad de formar biofilm en todas las adaptaciones previas. En general, la exposición al HS tras una adaptación previa es la que mayor capacidad de formar biofilm generó, aunque no aparecieron diferencias significativas entre las exposiciones al FTS y al HS. El efecto conjunto de cepa y tratamiento ejerció diferencias significativas ($P < 0,05$), excepto para las cepas previamente adaptadas al NS ($P > 0,05$) (Tabla III.2).

Tabla III.2. Formación de biofilm de las cepas de *Salmonella enterica* adaptadas y sin adaptar y expuestas y no expuestas a los tres biocidas ensayados en este Estudio.

| | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| Cepa | | | | |
| SA1 | 1,779 ± 0,404 ^c | 1,664 ± 0,892 ^e | 1,966 ± 0,360 ^d | 1,788 ± 1,010 ^c |
| SA2 | 0,158 ± 0,038 ^a | 1,098 ± 0,664 ^d | 0,145 ± 0,035 ^a | 0,135 ± 0,031 ^a |
| SE | 0,220 ± 0,148 ^{ab} | 0,611 ± 0,641 ^c | 0,219 ± 0,173 ^{ab} | 0,152 ± 0,042 ^a |
| SH | 0,156 ± 0,034 ^a | 0,283 ± 0,266 ^{ab} | 0,148 ± 0,031 ^a | 1,861 ± 0,316 ^c |
| SI | 1,972 ± 0,473 ^c | 1,536 ± 0,904 ^e | 1,735 ± 0,444 ^c | 1,852 ± 0,482 ^c |
| SK | 0,167 ± 0,042 ^a | 0,142 ± 0,030 ^a | 0,140 ± 0,025 ^a | 0,130 ± 0,016 ^a |
| ST1 | 0,185 ± 0,051 ^a | 0,407 ± 0,471 ^b | 0,175 ± 0,043 ^a | 0,162 ± 0,039 ^a |
| ST2 | 0,305 ± 0,185 ^b | 0,185 ± 0,114 ^a | 0,359 ± 0,164 ^b | 0,312 ± 0,264 ^b |
| S1 | 0,206 ± 0,148 ^{ab} | 1,531 ± 0,970 ^e | 0,257 ± 0,203 ^{ab} | 0,139 ± 0,041 ^a |
| SV | 0,133 ± 0,021 ^a | 0,166 ± 0,061 ^a | 0,127 ± 0,018 ^a | 0,126 ± 0,016 ^a |
| Exposición | | | | |
| A | 0,531 ± 0,697 ^b | 0,940 ± 0,762 ^b | 0,546 ± 0,696 ^b | 0,695 ± 0,835 ^b |
| B | 0,601 ± 0,840 ^c | 0,932 ± 0,995 ^b | 0,583 ± 0,787 ^b | 0,789 ± 0,979 ^c |
| C | 0,368 ± 0,491 ^a | 0,149 ± 0,058 ^a | 0,395 ± 0,570 ^a | 0,404 ± 0,588 ^a |
| D | 0,612 ± 0,775 ^c | 1,028 ± 0,887 ^b | 0,585 ± 0,741 ^b | 0,774 ± 0,934 ^{bc} |
| EC | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ |
| ET | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ |
| EC*T | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,359$ | $P < 0,001$ |

A; no exposición; B, exposición al FTS; C, exposición al NS; D, exposición al HS. EC, efecto de la cepa; ET, efecto del tratamiento; EC*T, efecto cepa y tratamiento. Para interpretación adicional, ver Tabla III.1.A.

3.2 Curvas de crecimiento

Para realizar el estudio de las curvas de crecimiento se empleó la ecuación de Gompertz modificada, ya que se consideró apropiada para describir el crecimiento bacteriano *in vitro* ($DO_{420-580}$), debido a la buena relación observada

entre los valores experimentales y los predichos ($R^2 > 0,91$). En este Estudio se observaron diferencias importantes entre los parámetros cinéticos de crecimiento estudiados para los diferentes serotipos de *Salmonella enterica*, tanto cuando las cepas están adaptadas, no adaptadas, como cuando están o no expuestas a los tres biocidas de uso alimentario ensayados.

Se debe tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados obtenidos que una fuente de variabilidad muy importante es la variabilidad biológica, en gran parte debida a la respuesta individual que ofrece cada célula (Aspridou *et al.*, 2019). Al usar la microbiología predictiva como base para la gestión de la Seguridad Alimentaria, se ha tenido en cuenta el comportamiento microbiano individual, o de colonia, a la hora de desarrollar modelos matemáticos que lo describan (Aspridou *et al.*, 2019; Koutsoumanis y Lianou, 2013; Pin, 2006). En este Estudio la extrapolación del modelo con réplicas de días diferentes sirve para observar esa variabilidad y ayuda a predecir el comportamiento con fines indicativos. La línea divisoria entre el crecimiento y el no crecimiento representa un límite en el cual la tasa de crecimiento es cero y la fase de latencia infinita. Probablemente, y más que cualquier otro factor, la determinación precisa de la fase de latencia ha creado problemas a los microbiólogos predictivos. Incluso ha sido ignorada en muchas aplicaciones prácticas de modelos predictivos, por ejemplo, en la evaluación de la higiene de las operaciones del procesado de la carne (Gill *et al.*, 1991). La dificultad radica principalmente en que las células que contaminan un alimento pueden encontrarse en estados fisiológicos diferentes, por lo que el tiempo que tardan en alcanzar el nivel de capacidad fisiológica de división puede ser muy diferente y difícil de predecir.

La fase de latencia de las células que no tienen daños suele asimilarse a una fase de latencia fisiológica, que será siempre más corta que la latencia de aquellas que los han sufrido. Se debe tener en cuenta la existencia de diversos estados de latencia, ya que las células que están sometidas a estrés presentan dos fases Lag; por un lado, el retraso en el crecimiento de la población para adaptarse al nuevo medio y, por otro, un “pseudo-Lag” debido a las células individuales que en ese momento no están en fase de crecimiento (Aspridou *et al.*, 2018). Lógicamente, cuanto más daño, más reparaciones son necesarias y la fase de latencia se alargará proporcionalmente a tales daños. También deben considerarse las células

Capítulo III

viables, que por el motivo que sea, no han podido llegar a repararse o no pueden multiplicarse en las condiciones en que se encuentren, pero, si estas mejorasen, podrían hacerlo. Por otra parte, pueden surgir complicaciones de modelado cuando las fluctuaciones en las condiciones ambientales sean de la suficiente magnitud y rapidez como para inducir a una población que ya ha superado su fase de latencia que comience otra vez uno de los estados latentes citados anteriormente (McMeekin *et al.*, 2002).

Los valores obtenidos para la fase de latencia o fase Lag (L, horas), para la tasa máxima de crecimiento (μ , $\Delta OD_{420-580}/h$) y para el incremento de la DO desde la inoculación hasta la fase estacionaria (B) tanto para las cepas adaptadas como para las cepas sin adaptar, se detallan en las Tablas III.3 (A, B, C, D) y III.4 (A, B). Las cepas de *Salmonella* (control, no adaptadas ni expuestas) que presentaron una mayor tasa de crecimiento fueron *S. Agona* y *S. Infantis*, siendo *S. Virchow* la que menor tasa de crecimiento mostró. La duración de la fase de latencia fue muy similar para todas las cepas a excepción de *S. Typhimurium* y *S. Virchow*, que presentaron una fase de latencia más larga, siendo esta última la que necesitó un mayor período de tiempo de adaptación para poder empezar a crecer (Tabla III.3.A). Al igual que en el presente Estudio, Díez-García *et al.* (2012) observaron diferencias entre los diferentes serotipos de *Salmonella* por lo que respecta a los parámetros de crecimiento que analizaron (en este caso, L, μ y E).

Las cepas de *S. Agona* y *S. Infantis* adaptadas a los tres biocidas utilizados presentaron valores de fase de latencia y de tasa de crecimiento similares a los que mostraron cuando estaban sin adaptar, por lo que, en este caso, la adaptación no influyó, aparentemente, en el crecimiento. Cuando las cepas se sometieron a adaptación con FTS aparecieron diferencias en los parámetros de crecimiento analizados en comparación con las cepas sin adaptar, si bien estas diferencias variaron entre serotipos. De manera general, aumentó la fase de latencia de todos los serotipos a excepción de *S. Virchow*, en el cual ésta disminuyó notablemente. *S. Hadar*, *S. Typhimurium* y *S. Thompson* necesitaron mayor tiempo de adaptación y presentaron una tasa de crecimiento más baja, alcanzando un incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria (B) más bajo que el resto de los serotipos estudiados adaptados al FTS. Cuando analizamos los parámetros de crecimiento obtenidos para las cepas adaptadas al HS, se observó

que este tratamiento biocida es el que generó fases de latencia más prolongadas para determinados serotipos tales como la variante monofásica de *S. Typhimurium*, *S. Thompson*, *S. Kentucky*, *S. Anatum*, *S. Enteritidis* y *S. Virchow*. Estas fases de latencia alargadas en el tiempo indican una mayor dificultad de adaptación de estos serovares. Este hecho, unido a las bajas tasas de crecimiento observadas, pone de manifiesto una alta efectividad de este tratamiento para inhibir el crecimiento bacteriano. El resto de los serotipos presentaron un mejor crecimiento frente a esta exposición ya que se obtuvieron fases de adaptación más cortas y ritmos de crecimiento más altos. De manera general, en función de la adaptación, podríamos decir que los tratamientos biocidas más efectivos fueron el FTS y el HS, ya que son los que dieron lugar a una reducción en la tasa de crecimiento (Tabla III.3.A y III.4.A). Del Río *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la concentración de varios descontaminantes de la carne de ave sobre la cinética del crecimiento de bacterias patógenas y obtuvieron también para el FTS valores de fase Lag más largos y un menor ritmo de crecimiento que para el resto de los biocidas usados.

Por lo que respecta a la influencia del serotipo en los resultados obtenidos (Tablas III.5 y III.6), si analizamos los parámetros de crecimiento observamos que las cepas de *Salmonella* sin adaptar presentaron una fase Lag muy similar para la mayor parte de los serotipos estudiados a excepción de *S. Virchow*, que necesitó una mayor fase de adaptación presentando, además, una menor tasa de crecimiento. En función de los resultados obtenidos, podríamos decir que cuando las cepas no adaptadas son expuestas al NS, necesitaron un mayor tiempo de adaptación (fase Lag más larga) para poder crecer, presentando, así mismo, una tasa de crecimiento más baja y un incremento en la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria menor que para el resto de las exposiciones. De los tres biocidas empleados, el NS parece ser el más efectivo ya que prácticamente no se observa crecimiento de las cepas. Por otro lado, la exposición al HS también dio lugar a que en algunos casos las cepas presentaron una mayor fase de latencia y una tasa de crecimiento menor, por lo que estas cepas tuvieron una mayor dificultad para crecer. Chaves *et al.* (2019) también observaron cómo cepas de *Salmonella* sometidas a la acción del hipoclorito presentaron dificultad para crecer como consecuencia de la necesidad de reparar los daños ejercidos por el cloro. Éste da lugar a ácido hipocloroso, que al ser un agente fuertemente

Capítulo III

oxidante que puede atacar las paredes celulares y dañar la funcionalidad de la membrana celular, se traduce en un aumento de la permeabilidad de la membrana, alterando el metabolismo de las vías implicadas en la utilización de ATP y otras actividades asociadas a membranas, además de poder dañar el DNA resultante de la formación de derivados clorados de las bases de nucleótidos.

Las cepas adaptadas al FTS presentaron un comportamiento particular a la hora de crecer cuando se expusieron también al efecto del mismo biocida (Tabla III.3.B y III.4.A). Serotipos como *S. Hadar*, *S. Thompson* y *S. Typhimurium* presentaron una mayor fase Lag cuando estaban adaptados al FTS dando lugar también, junto a *S. Enteritidis*, a una mayor tasa de crecimiento y a un menor incremento de la densidad óptica que el resto de los serotipos, lo cual podría indicar una mayor dificultad para adaptarse a las condiciones iniciales de crecimiento y cuando consiguieron adaptarse experimentaron un crecimiento rápido pero no fueron capaces de mantenerse en el tiempo y establecer una fase estacionaria. Así, crecieron y cuando alcanzaron su máximo de crecimiento entraron inmediatamente en su fase de inactivación. Este comportamiento característico podría explicarse debido a que el FTS ejerce el efecto antimicrobiano debido a la combinación de varios factores. Primero, genera valores altos de pH, lo cual parece alterar las moléculas grasas en la membrana celular, haciendo que las células bacterianas pierdan líquido intracelular. En segundo lugar, cabe citar su fuerza iónica, que puede causar autólisis de células bacterianas (Alonso-Hernando *et al.*, 2013; Del Río *et al.*, 2008). Por último, las bacterias podrían haber utilizado toda su energía disponible en adaptarse y agotar los nutrientes del medio, por lo que cuando se disponen a crecer no tienen energía suficiente para ello. Si la célula no logra mantener el pH estable, no podrá sintetizar componentes celulares y se producirá una reducción en la actividad de los sistemas de transporte, limitándose la entrada de iones esenciales y nutrientes, por lo que será incapaz de dividirse y crecer o, al menos, se reducirá la tasa de crecimiento o aumentará la fase de latencia (Cheroutre-Vialette *et al.*, 1998).

Por lo que respecta a las cepas adaptadas al NS (Tabla III.3.A), éstas presentaron mayor fase Lag, menor tasa de crecimiento y menor incremento de densidad óptica hasta la fase estacionaria que aquellas que están adaptadas y expuestas al NS (Tabla III.3.C), al resto de los compuestos biocidas e incluso a la

ausencia de los mismos. Independientemente de la adaptación, cuando las cepas se expusieron al efecto del NS se produjo un incremento de la DO hasta la fase estacionaria menor que para el resto de las exposiciones, lo cual da lugar a una reducción en el crecimiento e indica que la exposición a este biocida tiene un mayor efecto inhibitorio que el resto de los biocidas empleados. Los serotipos adaptados al HS que presentaron una mayor fase de latencia fueron la variante monofásica de *S. Typhimurium*, *S. Anatum*, *S. Thompson*, *S. Kentucky*, *S. Enteritidis* y *S. Virchow*, serotipos que presentaron, a su vez, una tasa de crecimiento bajo, respecto al resto de serotipos en las mismas condiciones. En cuanto a la exposición, estas cepas crecen mejor cuando están expuestas al FTS que al resto de los compuestos, y de igual manera que en los casos anteriores, la exposición al NS es el tratamiento más efectivo, ya que es el que da lugar a mayor inhibición del crecimiento.

Se estudió la correlación existente entre la capacidad de formación de biofilms de las cepas de *Salmonella* ensayadas y los parámetros cinéticos de crecimiento, tales como fase Lag y tasa de crecimiento (Tabla III.7). Se realizó el análisis de forma conjunta, obteniéndose una correlación alta para ambos parámetros (μ : 0,78; L: 0,62; $P < 0,05$) cuando las cepas estaban sin adaptar. Cuando las cepas estaban adaptadas al FTS, se obtuvo una correlación muy alta para la tasa de crecimiento (0,80) y moderada para la fase Lag (0,45). Sin embargo, cuando las cepas estaban adaptadas al NS y al HS, se obtuvo una correlación muy alta para la tasa de crecimiento (0,86 y 0,87, respectivamente), una correlación nula para las cepas adaptadas al NS y muy baja (0,14) para las cepas adaptadas al HS en cuanto a la fase Lag se refiere. Cuando las cepas de *Salmonella* se sometieron al efecto de la exposición (MIC/2) frente a estos mismos biocidas, la correlación que se obtuvo es baja o muy baja. Como puede observarse en la Tabla III.7, la correlación entre la formación de biofilms y los parámetros de crecimiento L y μ es dependiente de la cepa y de la adaptación.

Díez-García *et al.* (2012) analizaron la correlación entre la capacidad de formación de biofilm y los parámetros cinéticos de crecimiento de 69 cepas de *Salmonella* procedentes de carne de pollo (se incluyeron también cepas patrón), no obteniendo ninguna correlación entre los parámetros cinéticos de crecimiento y la capacidad de las cepas de *Salmonella* para producir biofilms, considerando cada serotipo por separado.

Capítulo III

Tabla III.3.A. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas no expuestas al efecto de los biocidas.

| Cepas | L _{NAD} | μ _{NAD} | L _{AFTS} | μ _{AFTS} | L _{ANS} | μ _{ANS} | L _{AHS} | μ _{AHS} |
|------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| SA1 | 2,416±0,349 ^a | 0,136±0,028 ^d | 2,828±0,105 ^a | 0,148±0,012 ^d | 2,624±0,404 ^{ab} | 0,138±0,015 ^f | 2,822±0,183 ^a | 0,136±0,014 ^c |
| SA2 | 2,415±0,328 ^a | 0,096±0,004 ^c | 2,678±0,471 ^a | 0,101±0,010 ^c | 2,469±0,630 ^{ab} | 0,087±0,011 ^{de} | 14,848±1,686 ^b | 0,029±0,009 ^a |
| SE | 2,748±1,093 ^a | 0,070±0,005 ^{bc} | 3,774±0,293 ^a | 0,154±0,028 ^d | 2,029±0,583 ^a | 0,062±0,004 ^b | 16,379±3,512 ^b | 0,028±0,006 ^a |
| SH | 2,136±0,739 ^a | 0,088±0,016 ^c | 8,649±2,391 ^b | 0,010±0,001 ^a | 2,214±0,699 ^a | 0,056±0,008 ^b | 3,039±0,804 ^a | 0,128±0,020 ^c |
| SI | 2,352±0,312 ^a | 0,127±0,017 ^d | 3,002±0,333 ^a | 0,114±0,006 ^c | 3,648±0,447 ^b | 0,142±0,018 ^f | 2,887±0,134 ^a | 0,129±0,005 ^c |
| SK | 1,823±0,465 ^a | 0,058±0,008 ^{ab} | 3,249±1,365 ^a | 0,072±0,011 ^b | 1,974±0,426 ^a | 0,051±0,005 ^{ab} | 17,334±12,719 ^b | 0,040±0,013 ^a |
| ST1 | 2,607±0,349 ^a | 0,071±0,006 ^{bc} | 6,902±2,519 ^b | 0,016±0,004 ^a | 2,705±0,580 ^{ab} | 0,081±0,009 ^{cd} | 22,707±2,502 ^{bc} | 0,032±0,002 ^a |
| ST2 | 3,746±0,763 ^b | 0,093±0,004 ^c | 14,552±2,693 ^c | 0,010±0,002 ^a | 2,695±0,245 ^{ab} | 0,100±0,008 ^e | 3,274±0,734 ^a | 0,101±0,016 ^b |
| S1 | 2,251±0,645 ^a | 0,086±0,023 ^c | 3,335±0,320 ^a | 0,137±0,019 ^d | 2,377±0,581 ^{ab} | 0,067±0,005 ^{bc} | 30,212±14,460 ^c | 0,037±0,026 ^a |
| SV | 19,271±0,106 ^c | 0,036±0,001 ^a | 1,072±0,298 ^a | 0,066±0,006 ^b | 18,084±1,427 ^c | 0,036±0,003 ^a | 18,502±1,258 ^b | 0,027±0,001 ^a |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. L, fase de latencia (horas); μ , ritmo máximo de crecimiento (Δ DO₄₂₀₋₅₈₀/h); NAD, no adaptada; AFTS, adaptada a fosfato trisódico; ANS, adaptada a nitrito sódico; AHS, adaptada a hipoclorito sódico.

Los valores que en la misma columna comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Tabla III.3.B. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas expuestas al efecto del FTS.

| Cepas | L _{NAD} | μ _{NAD} | L _{AFTS} | μ _{AFTS} | L _{ANS} | μ _{ANS} | L _{AHS} | μ _{AHS} |
|-------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| SA1 | 3,418±1,284 ^{ab} | 0,183±0,004 ^d | 3,445±0,617 ^{abc} | 0,206±0,072 ^a | 4,351±0,630 ^a | 0,192±0,024 ^{de} | 4,544±0,618 ^b | 0,205±0,039 ^c |
| SA2 | 3,313±0,475 ^{ab} | 0,101±0,014 ^c | 2,484±1,152 ^{ab} | 0,121±0,046 ^a | 2,512±0,724 ^a | 0,062±0,005 ^a | 3,687±0,500 ^b | 0,059±0,005 ^a |
| SE | 2,110±0,835 ^{ab} | 0,065±0,011 ^{abc} | 3,949±0,057 ^{bc} | 2,279±0,443 ^{cd} | 3,892±0,444 ^a | 0,115±0,016 ^{bc} | 2,679±1,520 ^{ab} | 0,068±0,034 ^a |
| SH | 4,196±0,307 ^b | 0,078±0,008 ^{abc} | 3,948±0,055 ^{bc} | 2,020±0,252 ^{bc} | 3,018±1,530 ^a | 0,064±0,031 ^a | 4,506±1,723 ^b | 0,264±0,040 ^d |
| SI | 4,489±1,313 ^b | 0,176±0,038 ^d | 3,778±1,147 ^{bc} | 0,231±0,036 ^a | 3,381±0,978 ^a | 0,206±0,047 ^e | 3,864±0,911 ^b | 0,256±0,013 ^d |
| SK | 3,886±2,323 ^b | 0,165±0,044 ^d | 2,921±1,698 ^{abc} | 0,059±0,003 ^a | 4,164±1,025 ^a | 0,034±0,008 ^a | 3,705±0,644 ^b | 0,040±0,009 ^a |
| ST1 | 2,796±1,890 ^{ab} | 0,061±0,001 ^{abc} | 3,299±1,150 ^{abc} | 2,468±0,280 ^d | 2,283±2,053 ^a | 0,060±0,022 ^a | 3,035±0,552 ^b | 0,067±0,010 ^a |
| ST2 | 3,927±1,746 ^b | 0,086±0,020 ^{bc} | 4,620±1,133 ^c | 1,792±0,075 ^b | 2,916±0,872 ^a | 0,079±0,037 ^{ab} | 4,581±0,974 ^b | 0,118±0,025 ^b |
| S1 | 3,150±1,862 ^{ab} | 0,068±0,009 ^{abc} | 3,702±0,879 ^{abc} | 0,175±0,065 ^a | 3,648±1,092 ^a | 0,150±0,010 ^{cd} | 3,881±0,417 ^b | 0,082±0,038 ^{ab} |
| SV | 1,038±0,110 ^a | 0,046±0,000 ^a | 1,852±0,446 ^a | 0,082±0,051 ^a | 3,515±1,355 ^a | 0,061±0,043 ^a | -0,021±4,196 ^{ab} | 0,058±0,018 ^a |

Para interpretación, ver Tabla III.3.A.

Tabla III.3C. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas expuestas al efecto del NS.

| Cepas | L _{NAD} | μ _{NAD} | L _{AFTS} | μ _{AFTS} | L _{ANS} | μ _{ANS} | L _{AHS} | μ _{AHS} |
|-------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| SA1 | 7,516±0,204 ^a | 0,066±0,011 ^{ab} | 7,518±0,389 ^a | 0,033±0,020 ^a | 9,803±0,673 ^{bc} | 0,017±0,009 ^a | 6,119±1,106 ^a | 0,077±0,061 ^b |
| SA2 | 8,249±0,806 ^{abc} | 0,069±0,038 ^{ab} | 9,250±0,223 ^a | 0,040±0,009 ^a | 9,066±5,081 ^{bc} | 0,045±0,023 ^{ab} | 8,837±2,870 ^{abcd} | 0,040±0,043 ^{ab} |
| SE | 10,568±0,106 ^c | 0,069±0,006 ^{ab} | 5,514±0,730 ^a | 0,390±0,228 ^a | 12,429±2,163 ^c | 0,042±0,020 ^{ab} | 10,847±0,335 ^{cd} | 0,059±0,010 ^{ab} |
| SH | 9,228±1,724 ^{abc} | 0,117±0,080 ^b | 29,797±8,132 ^b | 0,011±0,006 ^a | 9,862±2,600 ^{bc} | 0,087±0,032 ^b | 8,364±1,103 ^{abc} | 0,038±0,004 ^{ab} |
| SI | 9,022±0,465 ^{abc} | 0,049±0,013 ^a | 7,446±1,297 ^a | 0,050±0,017 ^a | 2,489±0,305 ^a | 0,015±0,003 ^a | 9,443±0,360 ^{bcd} | 0,056±0,036 ^{ab} |
| SK | 7,341±1,001 ^a | 0,063±0,019 ^{ab} | 8,552±0,807 ^a | 0,113±0,008 ^a | 7,980±0,966 ^{bc} | 0,077±0,050 ^b | 7,693±0,160 ^{ab} | 0,093±0,015 ^b |
| ST1 | 10,278±1,225 ^{bc} | 0,086±0,003 ^{ab} | 32,446±5,133 ^b | 0,034±0,032 ^a | 9,645±6,872 ^{bc} | 0,072±0,035 ^b | 11,518±1,847 ^d | 0,063±0,019 ^{ab} |
| ST2 | 9,973±2,461 ^{bc} | 0,077±0,009 ^{ab} | 11,220±3,108 ^a | 1,143±0,030 ^b | 13,759±1,215 ^c | 0,009±0,002 ^a | 7,629±2,232 ^{ab} | 0,055±0,045 ^{ab} |
| S1 | 8,083±0,150 ^{ab} | 0,052±0,009 ^a | 8,520±1,711 ^a | 0,383±0,570 ^a | 5,030±1,041 ^{ab} | 0,012±0,008 ^a | 6,276±0,518 ^a | 0,009±0,003 ^a |
| SV | 9,015±1,735 ^{abc} | 0,086±0,017 ^{ab} | 6,860±1,771 ^a | 0,110±0,060 ^a | 10,314±1,767 ^{bc} | 0,025±0,009 ^a | 10,926±1,768 ^{cd} | 0,084±0,015 ^b |

Para interpretación, ver Tabla III.3.A.

Capítulo III

Tabla III.3.D. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y no adaptados a biocidas. Cepas expuestas al efecto del HS.

| Cepas | L _{NADP} | μ _{NAD} | L _{AFTS} | μ _{AFTS} | L _{ANS} | μ _{ANS} | L _{AHS} | μ _{AHS} |
|-------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| SA1 | 3,372±0,170 ^a | 0,099±0,004 ^e | 3,807±0,317 ^a | 0,120±0,014 ^{ab} | 4,098±0,135 ^b | 0,120±0,016 ^c | 3,768±0,533 ^a | 0,124±0,015 ^c |
| SA2 | 3,191±0,728 ^a | 0,037±0,002 ^{ab} | 4,369±0,707 ^a | 0,114±0,012 ^{ab} | 4,086±0,816 ^b | 0,035±0,002 ^a | 31,846±2,494 ^c | 0,034±0,011 ^a |
| SE | 4,116±1,628 ^a | 0,033±0,001 ^a | 3,537±0,640 ^a | 0,289±0,273 ^{bc} | 6,319±0,756 ^c | 0,032±0,002 ^a | 19,209±5,063 ^b | 0,021±0,003 ^a |
| SH | 2,979±0,193 ^a | 0,055±0,026 ^{cd} | 4,891±0,648 ^a | 0,157±0,109 ^{ab} | 2,035±0,389 ^a | 0,045±0,024 ^a | 4,285±0,621 ^a | 0,138±0,023 ^c |
| SI | 4,179±0,339 ^a | 0,128±0,012 ^f | 3,889±0,720 ^a | 0,133±0,016 ^{ab} | 3,811±0,708 ^b | 0,123±0,013 ^c | 4,281±0,613 ^a | 0,135±0,012 ^c |
| SK | 3,727±3,860 ^a | 0,027±0,002 ^a | 3,098±1,488 ^a | 0,032±0,002 ^a | 1,626±0,461 ^a | 0,027±0,002 ^a | 16,549±0,969 ^b | 0,023±0,013 ^a |
| ST1 | 3,210±0,328 ^a | 0,050±0,003 ^{bc} | 4,199±0,077 ^a | 0,383±0,263 ^c | 2,242±0,618 ^a | 0,036±0,008 ^a | 17,968±2,378 ^b | 0,025±0,001 ^a |
| ST2 | 3,983±0,776 ^a | 0,069±0,001 ^d | 3,498±1,001 ^a | 0,098±0,017 ^{ab} | 6,345±0,450 ^c | 0,084±0,005 ^b | 3,593±0,513 ^a | 0,072±0,009 ^b |
| S1 | 3,025±1,255 ^a | 0,031±0,001 ^a | 3,509±0,919 ^a | 0,124±0,020 ^{ab} | 3,607±0,040 ^b | 0,073±0,018 ^b | 17,266±2,020 ^b | 0,018±0,005 ^a |
| SV | 21,518±1,978 ^b | 0,028±0,006 ^a | 4,124±2,154 ^a | 0,049±0,036 ^{ab} | 5,499±0,982 ^c | 0,023±0,001 ^a | 6,278±0,637 ^a | 0,022±0,002 ^a |

Para interpretación, ver Tabla III.3.A.

Tabla III.4.A. Parámetros cinéticos de crecimiento (B, incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y no adaptados a biocidas en ausencia de biocidas o en presencia de FTS (MIC/2).

| Cepas | B _{NAD} | B _{AFTS} | B _{ANS} | B _{AHS} | B _{NAD} * | B _{AFTS} * | B _{ANS} * | B _{AHS} * |
|-------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| SA1 | 1,353±0,031 ^{bc} | 1,311±0,038 ^a | 1,367±0,035 ^{abc} | 1,353±0,038 ^{ab} | 1,274±0,093 ^a | 1,197±0,074 ^b | 1,216±0,059 ^a | 1,139±0,039 ^a |
| SA2 | 1,181±0,114 ^a | 1,344±0,028 ^a | 1,360±0,086 ^{abc} | 1,244±0,022 ^a | 1,055±0,108 ^a | 1,306±0,087 ^b | 1,101±0,166 ^a | 1,139±0,148 ^a |
| SE | 1,305±0,052 ^{abc} | 1,301±0,174 ^a | 1,467±0,104 ^{cd} | 1,337±0,067 ^{ab} | 1,248±0,115 ^a | 0,516±0,058 ^a | 1,235±0,101 ^a | 1,262±0,077 ^a |
| SH | 1,327±0,072 ^{abc} | 0,936±0,393 ^a | 1,342±0,038 ^{abc} | 1,370±0,096 ^{ab} | 1,099±0,177 ^a | 0,578±0,036 ^a | 1,121±0,168 ^a | 1,236±0,158 ^a |
| SI | 1,402±0,039 ^{bc} | 1,377±0,067 ^a | 1,310±0,071 ^{ab} | 1,376±0,071 ^b | 1,257±0,119 ^a | 1,173±0,172 ^b | 1,182±0,146 ^a | 1,178±0,163 ^a |
| SK | 1,358±0,051 ^{bc} | 1,418±0,094 ^a | 1,410±0,016 ^{bc} | 1,388±0,079 ^b | 1,068±0,055 ^a | 1,184±0,118 ^b | 1,127±0,020 ^a | 1,193±0,111 ^a |
| ST1 | 1,298±0,033 ^{abc} | 0,777±0,081 ^a | 1,358±0,026 ^{abc} | 1,273±0,028 ^{ab} | 1,179±0,171 ^a | 0,632±0,022 ^a | 1,180±0,180 ^a | 1,330±0,078 ^a |
| ST2 | 1,421±0,106 ^c | 1,398±1,052 ^a | 1,547±0,162 ^d | 1,385±0,104 ^b | 1,251±0,123 ^a | 0,534±0,021 ^a | 1,326±0,065 ^a | 1,292±0,101 ^a |
| S1 | 1,253±0,172 ^{bc} | 1,383±0,050 ^a | 1,361±0,035 ^{abc} | 1,333±0,058 ^{ab} | 1,231±0,183 ^a | 1,243±0,141 ^b | 1,150±0,196 ^a | 1,218±0,200 ^a |
| SV | 1,191±0,004 ^a | 1,360±0,099 ^a | 1,256±0,034 ^a | 1,301±0,042 ^{ab} | 1,244±0,137 ^a | 1,124±0,170 ^b | 1,108±0,187 ^a | 1,234±0,312 ^a |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. B es el incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria.

Los valores que en la misma columna comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). Los asteriscos se relacionan con la exposición a los diferentes biocidas, no asterisco indica que no hay exposición, * indica exposición al FTS.

Capítulo III

Tabla III.4.B. Parámetros cinéticos de crecimiento (B, incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y no adaptados a biocidas en presencia de NS (MIC/2) o de HS (MIC/2).

| Cepa | B _{NAD} [°] | B _{BAFTS} [°] | B _{ANS} [°] | B _{AHS} [°] | B _{NAD} [∞] | B _{BAFTS} [∞] | B _{ANS} [∞] | B _{AHS} [∞] |
|------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| SA1 | 0,402±0,005 ^c | 0,349±0,019 ^{abc} | 0,349±0,053 ^{bcd} | 0,328±0,050 ^{ab} | 1,381±0,043 ^{bc} | 1,312±0,032 ^a | 1,303±0,055 ^{ab} | 1,351±0,036 ^{ab} |
| SA2 | 0,377±0,032 ^{bc} | 0,376±0,013 ^{bc} | 0,342±0,032 ^{bcd} | 0,411±0,074 ^c | 1,208±0,084 ^a | 1,291±0,031 ^a | 1,183±0,065 ^a | 1,220±0,024 ^a |
| SE | 0,298±0,032 ^a | 0,319±0,106 ^{abc} | 0,286±0,020 ^{ab} | 0,325±0,027 ^a | 1,336±0,122 ^{abc} | 1,160±0,504 ^a | 1,248±0,141 ^{ab} | 1,432±0,159 ^{ab} |
| SH | 0,386±0,051 ^{bc} | 0,386±0,046 ^c | 0,331±0,006 ^{bcd} | 0,357±0,026 ^{abc} | 1,305±0,095 ^{abc} | 0,834±0,538 ^a | 1,230±0,057 ^{ab} | 1,280±0,068 ^{ab} |
| SI | 0,383±0,029 ^{bc} | 0,321±0,038 ^{abc} | 0,386±0,034 ^d | 0,318±0,016 ^a | 1,324±0,046 ^{abc} | 1,305±0,050 ^a | 1,306±0,041 ^{ab} | 1,309±0,038 ^{ab} |
| SK | 0,374±0,032 ^{bc} | 0,347±0,033 ^{abc} | 0,346±0,023 ^{bcd} | 0,391±0,030 ^{bc} | 1,252±0,101 ^{ab} | 1,332±0,023 ^a | 1,316±0,065 ^{ab} | 1,534±0,355 ^b |
| ST1 | 0,354±0,078 ^{abc} | 0,398±0,034 ^c | 0,286±0,030 ^{ab} | 0,305±0,023 ^a | 1,299±0,058 ^{abc} | 0,907±0,493 ^a | 1,309±0,036 ^{ab} | 1,266±0,074 ^{ab} |
| ST2 | 0,311±0,035 ^{ab} | 0,289±0,041 ^{ab} | 0,303±0,033 ^{abc} | 0,306±0,009 ^a | 1,407±0,055 ^c | 1,183±0,541 ^a | 1,260±0,064 ^{ab} | 1,292±0,119 ^{ab} |
| S1 | 0,322±0,026 ^{ab} | 0,313±0,053 ^{abc} | 0,243±0,065 ^a | 0,334±0,021 ^{ab} | 1,329±0,070 ^{abc} | 1,420±0,026 ^a | 1,164±0,133 ^a | 1,333±0,130 ^{ab} |
| SV | 0,385±0,028 ^{bc} | 0,277±0,012 ^a | 0,358±0,012 ^{cd} | 0,361±0,008 ^{abc} | 1,306±0,009 ^{abc} | 1,288±0,072 ^a | 1,349±0,026 ^b | 1,341±0,073 ^{ab} |

Los superíndices se relacionan con la exposición a los diferentes biocidas, [°] indica exposición al NS y [∞] indica exposición el HS. Para interpretación adicional, ver Tabla III.4.A.

Tabla III.5. Parámetros cinéticos de crecimiento (L -fase de latencia- y μ -ritmo máximo de crecimiento-) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y expuestos a diferentes biocidas de uso alimentario.

| Cepas | L _{NAD} | μ _{NAD} | L _{AFTS} | μ _{AFTS} | L _{ANS} | μ _{ANS} | L _{AHS} | μ _{AHS} |
|-------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| SA1 | 4,180±2,134 ^a | 0,121±0,048 ^d | 4,400±1,946 ^a | 0,127±0,073 ^a | 5,219±2,882 ^{bc} | 0,117±0,068 ^d | 4,313±1,393 ^a | 0,136±0,058 ^c |
| SA2 | 4,292±2,470 ^{ab} | 0,076±0,032 ^{bc} | 4,695±2,918 ^a | 0,094±0,039 ^a | 4,533±3,594 ^{ab} | 0,057±0,023 ^{bc} | 14,804±11,217 ^d | 0,040±0,023 ^a |
| SE | 4,886±3,625 ^{ab} | 0,059±0,017 ^{ab} | 4,193±0,919 ^a | 0,778±0,941 ^c | 6,167±4,223 ^c | 0,063±0,035 ^{bc} | 12,279±7,122 ^{cd} | 0,044±0,026 ^a |
| SH | 4,635±2,987 ^{ab} | 0,084±0,043 ^c | 11,821±11,576 ^c | 0,549±0,897 ^b | 4,282±3,639 ^{ab} | 0,063±0,027 ^{bc} | 5,049±2,299 ^a | 0,142±0,087 ^c |
| SI | 5,011±2,640 ^{ab} | 0,120±0,051 ^d | 4,529±1,970 ^a | 0,132±0,070 ^a | 3,332±0,776 ^a | 0,122±0,075 ^d | 5,119±2,706 ^a | 0,144±0,077 ^c |
| SK | 4,194±2,869 ^a | 0,078±0,058 ^c | 4,455±2,739 ^a | 0,069±0,031 ^a | 3,936±2,722 ^{ab} | 0,047±0,030 ^{ab} | 11,320±8,148 ^{bc} | 0,049±0,029 ^a |
| ST1 | 4,723±3,498 ^{ab} | 0,067±0,014 ^{bc} | 11,711±12,823 ^c | 0,725±1,075 ^c | 4,219±4,497 ^{ab} | 0,062±0,026 ^{bc} | 13,807±7,889 ^{cd} | 0,047±0,022 ^a |
| ST2 | 5,407±3,076 ^b | 0,081±0,013 ^c | 8,472±5,141 ^b | 0,761±0,778 ^c | 6,429±4,720 ^c | 0,068±0,040 ^c | 4,769±2,110 ^a | 0,086±0,035 ^b |
| S1 | 4,127±2,611 ^a | 0,059±0,024 ^{ab} | 4,766±2,447 ^a | 0,205±0,268 ^a | 3,666±1,199 ^a | 0,075±0,052 ^c | 14,409±12,548 ^d | 0,037±0,036 ^a |
| SV | 12,711±8,663 ^c | 0,049±0,024 ^{ab} | 3,477±2,646 ^a | 0,076±0,044 ^a | 9,353±5,986 ^d | 0,036±0,024 ^{ab} | 8,921±7,347 ^b | 0,048±0,028 ^a |
| EXPOSICIÓN | | | | | | | | |
| A | 4,176±5,164 ^b | 0,086±0,031 ^c | 5,004±4,063 ^b | 0,083±0,056 ^a | 4,082±4,802 ^a | 0,082±0,035 ^c | 13,201±10,750 ^c | 0,069±0,048 ^a |
| B | 3,232±1,542 ^a | 0,103±0,053 ^d | 3,399±1,120 ^a | 0,943±1,021 ^c | 3,368±1,168 ^a | 0,102±0,063 ^d | 3,446±1,885 ^a | 0,122±0,086 ^b |
| C | 8,927±1,499 ^d | 0,073±0,031 ^b | 12,712±9,890 ^c | 0,231±0,375 ^b | 9,037±4,045 ^b | 0,040±0,035 ^a | 8,765±2,228 ^b | 0,057±0,035 ^a |
| D | 5,329±5,656 ^c | 0,055±0,033 ^a | 3,892±0,993 ^a | 0,150±0,147 ^a | 3,967±1,713 ^a | 0,060±0,038 ^b | 12,504±9,361 ^c | 0,061±0,051 ^a |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. Fase Lag (L; horas), tasa de máximo crecimiento (μ ; Δ OD420–580/h). A: cepa no expuesta, B: cepa expuesta al FTS, C: cepa expuesta al NS y D: cepa expuesta al HS.

Los valores que en la misma columna comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Capítulo III

Tabla III.6 Parámetros cinéticos de crecimiento (B, incremento de la densidad óptica desde la inoculación hasta la fase estacionaria) de 10 serotipos de *Salmonella enterica* adaptados y expuestos a diferentes biocidas de uso alimentario.

| Cepas | B _{NAD} | B _{AFTS} | B _{ANS} | B _{AHS} |
|-------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SA1 | 1,102±0,427 ^c | 1,042±0,423 ^{bcd} | 1,059±0,434 ^{ab} | 1,043±0,442 ^{ab} |
| SA2 | 0,955±0,362 ^a | 1,079±0,427 ^{cd} | 0,997±0,416 ^a | 1,004±0,367 ^a |
| SE | 1,046±0,459 ^{bc} | 0,824±0,493 ^{ab} | 1,059±0,484 ^{ab} | 1,089±0,472 ^{ab} |
| SH | 1,029±0,410 ^{abc} | 0,684±0,363 ^a | 1,006±0,422 ^a | 1,061±0,435 ^{ab} |
| SI | 1,092±0,434 ^{bc} | 1,044±0,450 ^{bcd} | 1,046±0,408 ^{ab} | 1,045±0,451 ^{ab} |
| SK | 1,013±0,404 ^{ab} | 1,070±0,450 ^{cd} | 1,049±0,439 ^{ab} | 1,127±0,489 ^b |
| ST1 | 1,032±0,421 ^{abc} | 0,679±0,291 ^s | 1,033±0,463 ^{ab} | 1,044±0,449 ^{ab} |
| ST2 | 1,097±0,485 ^c | 0,851±0,693 ^{abc} | 1,109±0,505 ^b | 1,069±0,469 ^{ab} |
| S1 | 1,034±0,445 ^{abc} | 1,090±0,478 ^d | 0,979±0,465 ^a | 1,055±0,450 ^{ab} |
| SV | 1,031±0,397 ^{abc} | 1,012±0,461 ^{bcd} | 1,018±0,416 ^a | 1,059±0,445 ^{ab} |
| EXPOSICIÓN | | | | |
| A | 1,308±0,104 ^c | 1,260±0,369 ^c | 1,377±0,099 ^d | 1,336±0,072 ^c |
| B | 1,191±0,137 ^b | 0,948±0,334 ^b | 1,175±0,136 ^b | 1,222±0,144 ^b |
| C | 0,360±0,048 ^{0a} | 0,337±0,055 ^a | 0,323±0,051 ^a | 0,343±0,045 ^a |
| D | 1,315±0,083 ^c | 1,203±0,330 ^c | 1,267±0,087 ^c | 1,336±0,146 ^c |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito Sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito Sódico. Incremento de la densidad óptica desde la inoculación a la fase estacionaria (B). A: cepa no expuesta, B: cepa expuesta al FTS, C: cepa expuesta al NS y D: cepa expuesta al HS.

Los valores que en la misma columna comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Tabla III.7 Correlación entre la capacidad de formación de biofilms y la tasa de crecimiento para los diferentes serotipos de *Salmonella* ensayados (coeficiente de correlación de Pearson).

| Cepas | NAD | | AFTS | | ANS | | AHS | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | μ | L | μ | L | μ | L | μ | L |
| SA1 | 0,88 | 0,98 | 0,67 | 0,56 | 0,79 | 0,84 | 0,99 | -0,24 |
| SA2 | -0,54 | 0,49 | 0,50 | 0,54 | -0,92 | 0,65 | -0,81 | -0,05 |
| SE | -0,57 | 0,34 | 0,94 | 0,98 | -0,27 | -0,62 | -0,06 | -0,09 |
| SH | 0,56 | -0,88 | 0,14 | 0,67 | 1,00 | 0,98 | 0,49 | -0,57 |
| SI | 0,87 | 0,20 | -0,62 | -0,52 | -0,70 | -0,93 | 0,45 | 0,39 |
| SK | -0,96 | 0,96 | -0,70 | 0,56 | -0,86 | -0,52 | -0,23 | 1,00 |
| ST1 | -0,81 | 0,98 | -0,51 | 0,29 | 0,85 | 0,62 | -0,84 | 0,67 |
| ST2 | 0,48 | -0,02 | -0,90 | 0,78 | -0,56 | 0,23 | 0,96 | -0,93 |
| S1 | -0,19 | 0,65 | 0,59 | 0,73 | 0,99 | -0,10 | -0,42 | -0,78 |
| SV | 0,57 | 0,12 | -0,47 | -0,43 | -0,99 | -0,86 | -0,58 | 0,75 |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. Fase Lag (L; horas), tasa de máximo crecimiento (μ; ΔOD₄₂₀₋₅₈₀/h). r = 1 correlación perfecta, 0,8 < r < 1 muy alta, 0,6 < r < 0,8 alta, 0,4 < r < 0,6 moderada, 0,2 < r < 0,4 baja, 0 < r < 0,2 muy baja, r = 0 correlación nula. Se estudia la correlación para P < 0,05.

3.3 Hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la superficie de las células bacterianas puede sufrir modificaciones como respuesta adaptativa frente a diversas circunstancias tales como variaciones de las condiciones de crecimiento, diferentes estados fisiológicos de las células o composición del medio; además, la hidrofobicidad puede variar entre especies, serotipos y cepas (Li y McLandsborough, 1999; Shivaramu *et al.*, 2016). Tales modificaciones pueden ser de tipo químico, para repeler sustancias solubles en agua y pueden dar lugar a un cambio en la superficie celular (Capita *et al.*, 2014; To *et al.*, 2002). La hidrofobicidad de la superficie celular juega un papel fundamental en la adherencia de las bacterias frente a una amplia variedad de superficies hidrófobas (poliestireno) (Ben Abdallah *et al.*, 2014; Benito *et al.*, 1997; Capita *et al.*, 2014; Gallardo-Moreno *et al.*, 2002; Lagha *et al.*, 2020; Rodríguez-Melcón *et al.*, 2019) y, puesto que la adherencia de las bacterias a la superficie es el primer paso en la formación de biopelículas, se espera que un aumento en la hidrofobicidad de la superficie celular vaya acompañado de un aumento en la capacidad bacteriana para formar biopelículas en superficies hidrófobas (Capita *et al.*, 2014).

En este Estudio se analizó si, como resultado de las adaptaciones a los biocidas, se produjeron cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular de los diferentes serotipos de *Salmonella*; para ello se analizaron las cepas patrón (no adaptadas) y las cepas adaptadas a los tres biocidas utilizados (FTS, NS e HS). Se ensayó la hidrofobicidad empleando dos solventes (xileno y hexadecano) como fase de hidrocarburos. Se establecieron los límites de hidrofobicidad según Norouzi *et al.* (2010) como hidrofóbico débil (valores inferiores a < 21%), moderado (21-50%) y fuerte (> 50%).

Los resultados obtenidos para la hidrofobicidad de las diez cepas de *Salmonella* ensayadas empleando el xileno y hexadecano como fase de hidrocarburos se pueden observar las Tablas III.8 y III.9. La correlación entre ambos compuestos ($P < 0,05$) es muy alta, tanto para las cepas control (no adaptadas) como para las cepas adaptadas al FTS, NS e HS.

Tabla III.8. Hidrofobicidad de 10 cepas de *Salmonella* adaptadas y sin adaptar usando hexadecano.

| Cepas | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|-------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| SA1 | 39,740±1,172 ^f | 55,563±2,276 ^g | 4,007±0,237 ^d | 33,730±1,323 ^e |
| SA2 | 2,833±0,393 ^a | 53,023±0,617 ^{fg} | 6,583±0,168 ^e | 9,203±0,766 ^c |
| SE | 5,193±0,407 ^{cd} | 5,797±0,106 ^b | 6,127±0,570 ^e | 0,497±0,099 ^a |
| SH | 6,853±0,159 ^d | 15,607±0,831 ^d | 12,210±0,563 ^f | 14,307±0,764 ^d |
| SI | 47,267±2,508 ^g | 50,770±3,834 ^f | 42,217±0,947 ^g | 32,390±1,799 ^e |
| SK | 4,863±0,781 ^{bc} | 8,803±0,413 ^c | 3,047±0,368 ^c | 6,197±1,123 ^b |
| ST1 | 4,340±0,225 ^{abc} | 24,083±0,686 ^e | 1,680±0,157 ^b | 9,773±0,362 ^c |
| ST2 | 8,607±0,756 ^e | 17,630±0,736 ^d | 0,530±0,104 ^a | 0,470±0,085 ^a |
| S1 | 3,263±0,605 ^{ab} | 51,037±2,253 ^f | 4,307±0,396 ^d | 1,130±0,131 ^a |
| SV | 3,643±0,335 ^{abc} | 1,590±0,082 ^a | 0,410±0,061 ^a | 0,773±0,289 ^a |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrato sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. Los valores que en la misma columna comparten alguna letra no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Cuando utilizamos como fuente hidrocarbonada el hexadecano (Tabla III.8), se obtuvieron siguientes resultados: de los 10 serotipos patrón de *Salmonella enterica* analizados solamente *S. Agona* (SA1) y *S. Infantis* (SI) destacan como hidrofóbicos moderados, siendo SI la cepa más hidrofóbica; el resto de los serotipos presentan una hidrofobicidad débil. Sin embargo, cuando estos mismos serotipos se sometieron al proceso de adaptación, se obtuvieron cambios notables en la hidrofobicidad, sobre todo cuando las cepas estaban adaptadas al FTS. Las cepas de SA1 y SI pasaron de ser hidrofóbicas moderadas a hidrofóbicas fuertes, y serotipos como SA2 y S1 pasaron de ser hidrofóbicos débiles a fuertes y ST1 pasó de ser hidrofóbico débil a moderado. Las adaptaciones al NS e HS no provocaron cambios notables si los comparamos con las cepas sin adaptar. Ben Abdallah *et al.* (2014) analizaron la hidrofobicidad de 20 cepas de *Salmonella* de diferentes serotipos y origen (10 de origen humano y 10 precedentes de carne de pollo) usando como fuente de carbono el hexadecano, y obtuvieron una afinidad por este compuesto baja, lo que sugiere el carácter hidrofílico para los aislamientos que analizaron. Hay que señalar que, en el presente Estudio, el 80% de las cepas presentaron también una afinidad débil por el hexadecano. Los autores indicados no pudieron establecer una correlación entre la hidrofobicidad de las cepas de *Salmonella* y

Capítulo III

la capacidad de las mismas para formar biofilms, mientras que en el estudio que se presenta, como se detallará con posterioridad en este Capítulo, si se estableció dicha correlación.

Tabla III.9. Hidrofobicidad de 10 cepas de *Salmonella* adaptadas y sin adaptar usando xileno.

| Cepas | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|-------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| SA1 | 47,427±0,214 ^h | 57,533±0,853 ^h | 45,853±0,583 ^f | 1,623±0,310 ^a |
| SA2 | 10,200±0,606 ^d | 53,507±2,012 ^{gh} | 19,007±1,696 ^e | 26,063±3,496 ^e |
| SE | 5,593±0,254 ^b | 4,510±1,596 ^a | 1,537±0,264 ^a | 6,337±0,685 ^b |
| SH | 8,677±0,577 ^c | 21,377±3,226 ^{bc} | 15,453±0,787 ^d | 15,470±1,061 ^{cd} |
| SI | 43,913±0,358 ^g | 51,013±0,542 ^g | 44,713±1,292 ^f | 51,320±1,144 ^f |
| SK | 19,050±0,260 ^f | 24,720±2,850 ^{cd} | 14,943±0,788 ^d | 12,123±2,014 ^c |
| ST1 | 4,453±0,058 ^a | 32,907±5,891 ^e | 11,613±1,374 ^c | 14,937±1,724 ^{cd} |
| ST2 | 10,787±1,033 ^d | 27,750±2,077 ^d | 1,350±0,187 ^a | 15,787±0,368 ^d |
| S1 | 14,600±0,381 ^e | 44,217±3,712 ^f | 7,957±0,076 ^b | 23,643±3,236 ^e |
| SV | 8,907±0,266 ^c | 19,563±0,778 ^b | 2,283±0,129 ^a | 15,397±0,600 ^{cd} |

Para interpretación, ver Tabla III.8.

Cuando utilizamos el xileno como fuente hidrocarbonada (Tabla III.9), las cepas SA1 y SI presentaron una hidrofobicidad moderada cuando estaban sin adaptar, mientras que las cepas del resto de los serotipos presentaron una hidrofobicidad débil. La adaptación que provocó mayores cambios en la hidrofobicidad celular de las cepas ensayadas ha sido al FTS. Serotipos como SA1 y SI pasaron de tener una hidrofobicidad moderada a una fuerte hidrofobicidad, SA2 pasó de presentar una hidrofobicidad débil a una fuerte hidrofobicidad y serotipos como SK, ST1, ST2 y S1 pasaron de presentar una débil hidrofobicidad a una hidrofobicidad moderada. Li y McLandsborough (1999) analizaron 22 cepas de *Escherichia coli* para determinar la hidrofobicidad usando como fases de hidrocarburos tanto el xileno como el hexadecano, obteniendo similares resultados. Como puede observarse en la Tabla III.10, existen diferencias cuando se emplean ambas fases de hidrocarburos, tanto en las cepas control como para las adaptadas al FTS, NS e HS. Las cepas de *Salmonella* analizadas presentaron una mayor afinidad por el xileno que por el hexadecano.

Tabla III.10 Hidrofobicidad de 10 cepas de *Salmonella* adaptadas y sin adaptar.

| Serotipos | NAD | AFTS | ANS | AHS |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| SA1 | 43,58 ± 4,28 ^g | 56,55 ± 1,88 ^h | 39,79 ± 6,70 ^f | 2,82 ± 1,33 ^a |
| SA2 | 6,52 ± 4,06 ^c | 53,27 ± 1,36 ^g | 14,11 ± 5,50 ^d | 16,32 ± 10,90 ^e |
| SE | 5,39 ± 0,37 ^b | 5,15 ± 1,23 ^a | 1,02 ± 0,60 ^a | 6,23 ± 0,58 ^b |
| SH | 7,77 ± 1,07 ^d | 18,49 ± 3,80 ^c | 14,88 ± 0,94 ^d | 13,84 ± 1,94 ^d |
| SI | 45,59 ± 2,44 ^h | 50,89 ± 2,45 ^g | 38,55 ± 6,89 ^e | 46,77 ± 5,07 ^f |
| SK | 11,96 ± 7,79 ^f | 16,76 ± 8,91 ^c | 10,57 ± 4,87 ^c | 7,59 ± 5,14 ^{bc} |
| ST1 | 4,40 ± 0,16 ^a | 28,50 ± 6,12 ^e | 10,69 ± 1,35 ^c | 8,31 ± 7,34 ^c |
| ST2 | 9,70 ± 1,44 ^e | 22,69 ± 5,72 ^d | 0,91 ± 0,50 ^a | 8,16 ± 8,36 ^c |
| S1 | 8,93 ± 6,23 ^e | 47,63 ± 4,64 ^f | 4,54 ± 3,74 ^b | 13,98 ± 10,79 ^d |
| SV | 6,28 ± 2,90 ^{bc} | 10,58 ± 9,86 ^b | 1,53 ± 0,85 ^a | 7,90 ± 8,22 ^c |
| Tratamiento | | | | |
| Hexadecano | 12,66 ± 15,89 ^a | 28,39 ± 21,06 ^a | 10,85 ± 12,21 ^a | 8,11 ± 12,05 ^a |
| Xileno | 17,36 ± 14,97 ^b | 33,71 ± 16,85 ^b | 16,47 ± 15,84 ^b | 18,27 ± 13,24 ^b |
| C | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ |
| T | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ |
| T*C | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ | $P < 0,001$ |

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV, *Salmonella* Virchow. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. C: Cepa, T: Tratamiento, T*C: Tratamiento-cepa. Los valores que en la misma columna comparten alguna letra no muestran diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$).

Cuando analizamos los resultados obtenidos de forma conjunta (Tabla III.10) sin tener en cuenta la fuente hidrocarbonada empleada, los serotipos sin adaptar que presentaron mayor hidrofobicidad fueron SA1 y, especialmente, SI. En cuanto a las cepas adaptadas al FTS, tanto SA2, como SA1 y SI sufrieron modificaciones aumentando su hidrofobicidad a fuertemente hidrofóbicos. Por su parte, S1 pasó de tener hidrofobicidad débil a moderada. Las cepas de *Salmonella* presentaron diferencias significativas ($P < 0,001$) tanto cuando las cepas no están adaptadas como para todas las adaptaciones, independientemente del tratamiento utilizado. La adaptación que dio lugar a una mayor hidrofobicidad fue el FTS, seguido de la adaptación al NS e HS. Capita *et al.* (2014) analizaron la capacidad de formación de biofilm, la hidrofobicidad y los parámetros de las curvas de crecimiento de una cepa de *E. coli* (ATCC 12806), adaptada a los tres biocidas de uso alimentario estudiados en esta Tesis

Capítulo III

Doctoral. En su investigación, los autores indicados obtuvieron una mayor hidrofobicidad para la cepa de *E. coli* cuando estaba adaptada al NS.

El aumento en la hidrofobicidad de la superficie celular observado en las cepas adaptadas al FTS podría estar relacionado con una reducción en los sitios de unión de los biocidas cargados negativamente (hidrófilos) (Capita *et al.*, 2014). A medida que las cepas están más adaptadas a los compuestos biocidas, pierden o enmascaran sus sitios de unión para los biocidas. Estos sitios de unión están cargados negativamente y, por lo tanto, restan valor a la hidrofobicidad de la célula, por lo que a medida que se pierden o se enmascaran, la célula aumenta su hidrofobicidad (Loughlin *et al.*, 2002).

El tratamiento, independientemente de la cepa considerada, ejerció un efecto significativo ($P < 0,001$) sobre la hidrofobicidad, siendo en todas las cepas antes y después de la adaptación mayor para el xileno. La adaptación al FTS presentó los mayores valores de hidrofobicidad en todos los casos. Para el efecto conjunto de cepa y tratamiento también se obtuvieron diferencias significativas ($P < 0,001$), tanto para las cepas no adaptadas como para las adaptadas a los tres biocidas de uso alimentario ensayados (Tabla III.10).

Como hemos mencionado anteriormente, Ben Abdallah *et al.* (2014) analizaron la hidrofobicidad de 20 cepas de *Salmonella* de diferentes serotipos y origen (10 de origen humano y 10 procedentes de carne de pollo) usando como fuente de carbono el hexadecano, obteniendo una afinidad por este compuesto baja, lo que sugiere el carácter hidrófilo tanto de los aislamientos tanto humanos como los procedentes de carne de pollo. Los autores mencionados no encontraron relación entre hidrofobicidad y formación de biofilms. En nuestro Estudio, cuando analizamos la correlación entre la hidrofobicidad y los parámetros de crecimiento obtuvimos una correlación moderada con respecto a la tasa de crecimiento, tanto para el xileno como para el hexadecano; sin embargo, aunque la correlación obtenida para la hidrofobicidad y la fase Lag resultó baja para ambos compuestos. En cuanto a la correlación entre la hidrofobicidad y la capacidad de formación de biofilm se determinó la existencia de una correlación positiva alta, tanto para el xileno como para el hexadecano.

La hidrofobicidad de la superficie celular es un factor significativo que influye en la adhesión bacteriana. La naturaleza molecular de la superficie de la célula bacteriana es importante en la interacción entre el hospedador y los

microorganismos. Generalmente, se ha observado que los microorganismos producen biopelículas bajo ciertas condiciones tales como áreas deficientes en nutrientes, agentes inhibidores que incluyen toxinas o antibióticos bajo condiciones de amenaza para la supervivencia y la protección celular. Beshiru *et al.* (2018) analizaron la capacidad de formación de biofilm mediante el método del cristal violeta, y la hidrofobicidad, empleando el xileno como fuente hidrocarbonada, de 45 cepas de *Salmonella* aisladas de camarones precocinados, obteniendo que el 55,56% eran hidrofílicos y el 44,44% hidrofóbicos moderados, no pudiendo establecer una correlación entre hidrofobicidad y formación de biofilms. En el presente Estudio se ha determinado la correlación entre la hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad de formación de biofilms, obteniendo una correlación muy alta tanto para el xileno (0,94) como para el hexadecano (0,98) cuando las cepas de *Salmonella* no están adaptadas ni expuestas a ningún biocida. Cuando evaluamos las cepas adaptadas al FTS, obtenemos una correlación moderada en el caso del xileno (0,55) y alta para el hexadecano (0,73); sin embargo, cuando están adaptadas al NS, vuelven a presentar una correlación muy alta para ambos compuestos (xileno: 0,87; hexadecano:0,88). La menor correlación se obtuvo para las cepas adaptadas al HS, siendo muy baja para el xileno (0,09) y moderada para el hexadecano (0,52). En cuanto a las cepas ensayadas, el 80% de las mismas resultaron ser hidrofóbicas débiles y el 20% hidrofóbicas moderadas, tanto cuando se empleó el xileno como cuando se empleó el hexadecano como fuente hidrocarbonada. Estos porcentajes variaron cuando se analizó la hidrofobicidad de las cepas adaptadas frente a los tres biocidas de uso alimentario ensayados y para las dos fuentes hidrocarbonadas empleadas.

3.4 Bombas de expulsión.

Para poder observar el papel que desarrollan las bombas de expulsión en la adaptación de las cepas de *Salmonella* frente a los tres biocidas usados en esta Tesis Doctoral, se estudió el crecimiento de las cepas control, adaptadas y expuestas en presencia de CCCP, compuesto inhibidor de las bombas de expulsión (Tablas III.11-III.13). Las cuatro cepas usadas en esta parte del Estudio se eligieron en función de los valores que se obtuvieron de MIC después de la adaptación, descritos en el Capítulo II de esta Memoria. Estudios previos

Capítulo III

han indicado la implicación de las bombas de expulsión en la resistencia y adaptación frente a ciertos antimicrobianos. Sin embargo, parece ser que los tres biocidas ensayados (FTS, NS y HS), usados ampliamente en la industria alimentaria, no han sido probados previamente con esta finalidad. Las bombas de expulsión de las bacterias están energizadas por la fuerza motriz del protón, siendo esta la razón por la que el CCCP, que es un inhibidor de la fuerza motriz de protones, se usa ampliamente para estudiar estas estructuras.

Tabla III.11. Fase de latencia (L, horas) en cepas de *Salmonella* no adaptadas y previamente adaptadas a tres biocidas, en presencia y ausencia de CCCP.

| ADAPTACIÓN | | | | | | |
|------------|-----|----|-----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| E | C | T | NAD | AFTS | ANS | AHS |
| NC | SH | A | 2,136±0,739 ^a | 8,649±2,391 ^b | 2,214±0,699 ^a | 3,039±0,804 ^a |
| | SI | A | 2,352±0,312 ^a | 3,002±0,333 ^a | 3,648±0,447 ^b | 2,887±0,134 ^a |
| | S1 | A | 2,352±0,312 ^a | 3,002±0,333 ^a | 3,648±0,447 ^b | 2,887±0,134 ^a |
| | ST1 | A | 2,607±0,349 ^a | 6,902±2,519 ^b | 2,705±0,580 ^{ab} | 22,707±2,502 ^b |
| | SH | B | 3,584±0,466 ^{ab} | - | 2,816±0,851 ^a | 5,692±1,218 ^a |
| | SI | B | 3,584±0,466 ^{ab} | 1,583±3,427 ^a | 4,315±2,613 ^a | 10,196±10,178 ^a |
| | S1 | B | 2,402±0,247 ^a | 0,977±1,039 ^a | 5,433±4,789 ^a | 5,567±0,921 ^a |
| | ST1 | B | 4,592±0,0,869 ^b | - | - | 9,417±4,420 ^a |
| | NS | SH | A | 2,979±0,193 ^{ab} | 4,891±0,648 ^b | 2,035±0,389 ^a |
| SI | | A | 4,179±0,339 ^{ab} | 3,889±0,720 ^a | 3,811±0,708 ^a | 4,281±0,613 ^{bc} |
| S1 | | A | 3,025±1,255 ^a | 3,509±0,919 ^a | 3,607±0,040 ^a | 17,266±2,020 ^a |
| ST1 | | A | 3,210±0,328 ^b | 4,199±0,077 ^b | 2,242±0,618 ^a | 17,968±2,378 ^c |
| SH | | B | 0,156±0,087 ^a | - | 37,279±18,853 ^a | 24,806±25,820 ^a |
| SI | | B | 21,010±4,277 ^{ab} | - | - | - |
| S1 | | B | 26,943±24,395 ^{ab} | 41,945±6,431 ^a | - | - |
| ST1 | | B | 50,988±11,178 ^c | - | 21,468±1,089 ^a | - |

E: exposición a biocidas, C: cepa, T: tratamiento inhibidor de las bombas de expulsión. SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; ST1, *Salmonella* Thompson; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12:i-; SV. NAD, cepa no adaptada; AFTS, cepa adaptada al fosfato trisódico; ANS, cepa adaptada al nitrito sódico; AHS, cepa adaptada al hipoclorito sódico. NC: cepas sin compuesto, NS: cepas expuestas al nitrito sódico. A: Sin CCCP, B: con CCCP. Los valores que en la misma columna comparten alguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí.

Tabla III.12. Ritmo máximo de crecimiento (μ ; $\Delta OD_{420-580}/h$) en cepas de *Salmonella* no adaptadas y previamente adaptadas a tres biocidas, en presencia y ausencia de CCCP.

| E | C | T | ADAPTACIÓN | | | |
|----|-----|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| | | | NAD | AFTS | ANS | AHS |
| NC | SH | A | 0,088±0,016 ^a | 0,010±0,001 ^a | 0,056±0,008 ^a | 0,128±0,020 ^b |
| | SI | A | 0,127±0,017 ^b | 0,114±0,006 ^b | 0,142±0,018 ^c | 0,129±0,005 ^b |
| | S1 | A | 0,086±0,023 ^a | 0,137±0,019 ^c | 0,067±0,005 ^{ab} | 0,037±0,026 ^a |
| | ST1 | A | 0,071±0,006 ^a | 0,016±0,004 ^a | 0,081±0,009 ^b | 0,032±0,002 ^a |
| | SH | B | 0,015±0,003 ^a | - | 0,012±0,002 ^a | 0,051±0,047 ^c |
| | SI | B | 0,050±0,034 ^b | 0,023±0,005 ^b | 0,051±0,040 ^a | 0,055±0,055 ^b ^c |
| | S1 | B | 0,013±0,008 ^a | 0,009±0,002 ^a | 0,037±0,025 ^a | 0,008±0,001 ^a |
| | ST1 | B | 0,014±0,003 ^a | - | - | 0,023±0,014 ^{ab} |
| NS | SH | A | 0,117±0,080 ^a | 0,011±0,006 ^a | 0,087±0,032 ^b | 0,038±0,004 ^{ab} |
| | SI | A | 0,049±0,013 ^a | 0,050±0,017 ^a | 0,015±0,003 ^a | 0,056±0,036 ^b |
| | S1 | A | 0,052±0,009 ^a | 0,383±0,570 ^a | 0,012±0,008 ^a | 0,009±0,003 ^a |
| | ST1 | A | 0,086±0,003 ^a | 0,034±0,032 ^a | 0,072±0,035 ^b | 0,063±0,019 ^b |
| | SH | B | 0,004±0,001 ^b | - | 0,009±0,007 ^a | 0,036±0,054 ^a |
| | SI | B | 0,004±0,001 ^b | - | - | - |
| | S1 | B | 0,003±0,003 ^a | 0,004±0,001 ^a | - | - |
| | ST1 | B | 0,006±0,001 ^{ab} | - | 0,005±0,001 ^b | - |

Para interpretación, ver Tabla III.11.

Tabla III.13. Incremento de la densidad óptica desde la inoculación a la fase estacionaria (B) en cepas de *Salmonella* no adaptadas y previamente adaptadas a tres biocidas, en presencia y ausencia de CCCP.

| | | | ADAPTACIÓN | | | |
|----|-----|---|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| E | C | T | NAD | AFTS | ANS | AHS |
| NC | SH | A | 1,327±0,072 ^a | 0,936±0,393 ^a | 1,342±0,038 ^a | 1,370±0,096 ^a |
| | SI | A | 1,402±0,039 ^a | 1,377±0,067 ^b | 1,310±0,071 ^a | 1,376±0,071 ^a |
| | S1 | A | 1,253±0,172 ^a | 1,383±0,050 ^b | 1,361±0,035 ^a | 1,333±0,058 ^a |
| | ST1 | A | 1,298±0,033 ^a | 0,777±0,081 ^a | 1,358±0,026 ^a | 1,273±0,028 ^a |
| | SH | B | 0,331±0,082 ^a | - | 0,210±0,003 ^a | 1,199±0,381 ^c |
| | SI | B | 1,002±0,014 ^b | 0,768±0,314 ^b | 0,943±0,029 ^b | 0,791±0,241 ^b |
| | S1 | B | 0,364±0,175 ^a | 0,257±0,039 ^b | 0,965±0,019 ^b | 0,286±0,097 ^a |
| | ST1 | B | 0,360±0,147 ^a | - | - | 0,499±0,222 ^{ab} |
| NS | SH | A | 0,386±0,051 ^a | 0,386±0,046 ^a | 0,331±0,006 ^{bc} | 0,357±0,026 ^b |
| | SI | A | 0,383±0,029 ^a | 0,321±0,038 ^a | 0,386±0,034 ^c | 0,318±0,016 ^{ab} |
| | S1 | A | 0,322±0,026 ^a | 0,313±0,053 ^a | 0,243±0,065 ^a | 0,334±0,021 ^{ab} |
| | ST1 | A | 0,354±0,078 ^a | 0,398±0,034 ^a | 0,286±0,030 ^{ab} | 0,305±0,023 ^a |
| | SH | B | 0,420±0,027 ^b | - | 0,255±0,016 ^a | 0,286±0,246 ^a |
| | SI | B | 0,387±0,063 ^b | - | - | - |
| | S1 | B | 0,177±0,122 ^a | 0,322±0,110 ^a | - | - |
| | ST1 | B | 0,276±0,050 ^{ab} | - | 0,320±0,013 ^b | - |

Para interpretación, ver Tabla III.11.

De manera general, las cepas control estudiadas mostraron una mayor fase Lag y una menor tasa de crecimiento y densidad óptica en la fase estacionaria, al crecer en presencia de CCCP. Cuando las cepas están adaptadas, en algunos casos el CCCP ejerce un efecto inhibitorio del crecimiento. En las cepas adaptadas al NS el CCCP se produce un aumento de la fase Lag, mientras que en las cepas adaptadas al FTS el CCCP tiene el efecto contrario, reduciendo dicha fase. Finalmente, en las cepas adaptadas al NS, aumenta la fase Lag para SH y SI y disminuye en el caso de S1 y ST1.

Cuando se añadió al medio FTS e HS tuvo lugar un efecto inhibitorio del crecimiento para todos los serotipos. Cuando se añadió NS, este compuesto provocó un aumento de la fase Lag tanto en las cepas control como en las adaptadas a los tres biocidas, debiendo señalarse que algunas de las cepas adaptadas no crecieron en presencia de NS y CCCP. Alonso-Calleja *et al.* (2015) estudiaron el efecto del CCCP utilizando una cepa patrón de *E. coli*, que adaptaron y expusieron al efecto de los tres biocidas empleados en el presente

Estudio; de igual manera, la adaptación y la exposición junto al CCCP dio lugar a un efecto inhibitorio del crecimiento.

4. Conclusiones

Todas las cepas estudiadas formaron biofilm en las condiciones ensayadas, destacando *S. Agona* y *S. Infantis* como los dos serotipos con mayor capacidad de formación tanto cuando no están adaptadas como cuando se adaptaron a los tres biocidas estudiados (FTS, NS e HS). De manera general, después de la exposición al hipoclorito sódico y al fosfato trisódico, las cepas aumentaron su capacidad de formación de biofilm.

De igual modo, ambos serotipos presentaron una mayor tasa de crecimiento que el resto de los serotipos, en los que la fase Lag fue muy similar. La exposición al nitrito sódico resultó ser el tratamiento más efectivo, ya que dio lugar a una mayor inhibición o retardo del crecimiento. Asimismo, *S. Agona* y *S. Infantis* también presentaron una mayor capacidad hidrofóbica, lo que posiblemente mejore su adhesión a las superficies favoreciendo la formación de biofilm.

Por otra parte, el fosfato trisódico fue el compuesto cuya adaptación provocó mayores cambios en la hidrofobicidad celular tanto cuando se utilizó como fuente hidrocarbonada el hexadecano como cuando se utilizó el xileno, siendo este último el más recomendable para su empleo, ya que las células bacterianas presentaron una mayor afinidad por el mismo.

Las bombas de expulsión ejercieron un papel fundamental en la adaptación de las cepas de *Salmonella enterica*, sobre todo frente a la exposición al fosfato trisódico y al hipoclorito sódico, ya que al bloquearlas mediante la adición del carbonylcianuro-m-clorofenilhidrazona, no se observó crecimiento de las mismas. Así mismo, las cepas expuestas al nitrito sódico con las bombas de expulsión bloqueadas, en algunos casos, pudieron crecer, si bien se incrementó la fase Lag y se redujo la tasa de crecimiento de manera drástica.

5. Bibliografía

Ben Abdallah, F., Lagha, R., Said, K., Kallel, H., Gharbi, J. 2014. Detection of Cell Surface Hydrophobicity, Biofilm and Fimbriae Genes in *Salmonella* Isolated from Tunisian Clinical and Poultry Meat. *Iranian Journal of Public Health* **43** (4), 423–431. <https://ijph.tums.ac.ir/index.php/ijph/article/view/4112>. PMC4433723.

Abebe, G.M., 2020. The Role of Bacterial Biofilm in Antibiotic Resistance and Food Contamination. *International Journal of Microbiology* **2020**, 1705814. <https://doi.org/10.1155/2020/1705814>

Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A., Capita, R., 2015. Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.03.012>

Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2013. Growth kinetic parameters of Gram-positive and Gram-negative bacteria on poultry treated with various chemical decontaminants. *Food Control* **33** (2), 429–432. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.009>

Arteaga, V., Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M., 2019. Microbial Pathogenesis Antimicrobial activity of apitoxin from *Apis mellifera* in *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and its effects on motility, biofilm formation and gene expression. *Microbial Pathogenesis* **137**, 103771. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103771>

Aspidou, Z., Akritidou, T., Koutsoumanis, K.P., 2018. Simultaneous growth, survival and death: The trimodal behavior of *Salmonella* cells under osmotic stress giving rise to “Phoenix phenomenon”. *International Journal of Food Microbiology* **285**, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.012>

Aspidou, Z., Balomenos, A., Tsakanikas, P., Manolakos, E., Koutsoumanis, K., 2019. Heterogeneity of single cell inactivation: Assessment of the individual cell time to death and implications in population behavior. *Food Microbiology* **80**, 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.12.011>

Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M.,

Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2017. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology* **43** (3), 313-351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

Benito, Y., Pin, C., Marin, M.L., Garcia, M.L., Selgas, M.D., Casas, C., 1997. Cell surface hydrophobicity and attachment of pathogenic and spoilage bacteria to meat surfaces. *Meat Science* **45** (4), 419-425. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(96\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(96)00133-7)

Beshiru, A., Igbinsa, I.H., Igbinsa, E.O., 2018. Biofilm formation and potential virulence factors of *Salmonella* strains isolated from ready-to-eat shrimps. *PLoS ONE* **13** (9), e0204345. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204345>

Biniarz, P., Baranowska, G., Feder-Kubis, J., 2015. The lipopeptides pseudofactin II and surfactin effectively decrease *Candida albicans* adhesion and hydrophobicity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **108**, 343–353. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0486-3>

Camargo, A.C., Woodward, J.J., Call, D.R., Nero, L.A., 2017. *Listeria monocytogenes* in Food-Processing Facilities, Food Contamination, and Human Listeriosis: The Brazilian Scenario. *Foodborne Pathogenesis and Disease* **14** (11), 623–636. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2274>

Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., 2014. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to Sublethal Concentrations of Food-Grade Biocides Influences Its Ability To Form Biofilm, Resistance to Antimicrobials, and Ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (4), 1268–1280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>

Capita, R., Fernández-Pérez, S., Buzón-Durán, L., Alonso-Calleja, C., 2019a. Effect of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride on the structural parameters of the biofilms formed by ten *Salmonella enterica* serotypes. *Pathogens* **8** (3), 154. <http://doi.org/10.3390/pathogens8030154>

Capita, R., Vicente-Velasco, M., Rodríguez-Melcón, C., García-Fernández, C., Carballo, J., Alonso-Calleja, C., 2019b. Effect of low doses of biocides on the antimicrobial resistance and the biofilms of *Cronobacter sakazakii* and *Yersinia enterocolitica*. *Scientific Reports* **9**, 15705 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51907-1>

Chaves, R.D., Aspridou, Z., Sant'Ana, A.S., Koutsoumanis, K.P., 2019.

Capítulo III

Effect of chlorine stress on the subsequent growth behavior of individual *Salmonella* cells. *Food Research International* **123**, 311–316.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.006>

Cheroutre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C., Lebert, A., 1998. Effects of pH or Aw stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **42** (1-2), 71–77.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00064-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00064-6)

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology* **41**, 435–464.

<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>

Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **28** (3), 261–289.

<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2003.09.004>

Del Río, E., González-de Caso, B., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2008. Effect of poultry decontaminants concentration on growth kinetics for pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology* **25** (7), 888–894.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.05.011>

Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology* **31** (2), 173–180.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>

Donaghy, J.A., Jagadeesan, B., Goodburn, K., Grunwald, L., Jensen, O.N., Jaspers, A., Kanagachandran, K., Lafforgue, H., Seefelder, W., Quentin, M.C., 2019. Relationship of sanitizers, disinfectants, and cleaning agents with antimicrobial resistance. *Journal of Food Protection* **82** (5), 889–902.

<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-373>

Dykes, G.A., Sampathkumar, B., Korber, D.R., 2003. Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *International Journal of Food Microbiology* **89** (1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00123-5)

Fagerlund, A., Heir, E., Møretrø, T., Langsrud, S., 2020. *Listeria monocytogenes* biofilm removal using different commercial cleaning agents. *Molecules* **25** (4), 792. <https://doi.org/10.3390/molecules25040792>

Fernandes, P.É., São José, J.F.B., Zerdas, E.R.M.A., Andrade, N.J., Fernandes, C.M., Silva, L.D., 2014. Influence of the hydrophobicity and surface roughness of mangoes and tomatoes on the adhesion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and evaluation of cleaning procedures using surfactin. *Food Control* **41**, 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.024>

Forget, N., Belzile, C., Rioux, P., Nozais, C., 2010. Teaching the microbial growth curve concept using microalgal cultures and flow cytometry. *Journal of Biological Education* **44** (4), 185-189. <https://doi.org/10.1080/00219266.2010.9656220>

Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E.M., Villar, C.J., Lombó, F., 2018a. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology* **9**, 898. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>

Gallardo-Moreno, A.M., González-Martín, M.L., Pérez-Giraldo, C., Garduño, E., Bruque, J.M., Gómez-García, A.C., 2002. Adhesion of *Candida parapsilosis* to polystyrene. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (5), 2610–2613. <https://aem.asm.org/content/68/5/2610>

Garthright, W.E., 1991. Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology* **8** (3), 239–248. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(91\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0740-0020(91)90056-8)

Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretrø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G.J., Kacániová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., Simões, M., 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* **6**, 841 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>

Gill, C., Harrison, J.C.L., Phillips, D.M., 1991. Use of a temperature function assess the hygienic adequacy process integration technique to of a beef carcass cooling. *Food Microbiology* **8** (2), 83–94. [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(91\)90001-1](https://doi.org/10.1016/0740-0020(91)90001-1)

González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Calleja, C., 2018. Visualization and quantification of the celular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE* **13** (7), e0200011; <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>

Gu, H., Lee, S.W., Carnicelli, J., Zhang, T., Ren, D., 2020. Magnetically driven active topography for long-term biofilm control. *Nature Communications*

Capítulo III

11, 2211. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16055-5>

Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>

Henly, E.L., Dowling, J.A.R., Maingay, J.B., Lacey, M.M., Smith, T.J., Forbes, S., 2019. Biocide exposure induces changes in susceptibility, pathogenicity, and biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **63** (3), e01892-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01892-18>

Kassinger, S.J., Van Hoek, M.L., 2020. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target. *Synthetic and System Biotechnology* **5** (2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2020.01.001>

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S.J., 2013. Bacterial biofilms: Development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, a010306. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>

Koutsoumanis, K.P., Lianou, A., 2013. Stochasticity in Colonial Growth Dynamics of Individual Bacterial. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, (7), 2294–2301. <https://doi.org/10.1128/AEM.03629-12>

Krasowska, A., Sigler, K., 2014. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **4**, 112. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>

Kuchma, S.L., Connolly, J.P., O'Toole, G.A., 2005. A Three-Component Regulatory System Regulates Biofilm Maturation and Type III Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **187** (4), 1441–1454. <https://doi.org/10.1128/JB.187.4.1441-1454.2005>

Lagha, R., Ben Abdallah, F., Masmoudi, A.S., 2015. Effect of combined long-term starvation and γ -irradiation on membrane fatty acids and cell surface hydrophobicity of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Dairy Science* **98** (12), 8525–8530. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9984>

Lamas, A., Paz-Mendez, A.M., Regal, P., Vazquez, B., Miranda, J.M., Cepeda, A., Franco, C.M., 2018. Food preservatives influence biofilm formation, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. *LWT-Food Science and Technology* **97**, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.042>

Leggett, H.C., Cornwallis, C.K., Buckling, A., West, S.A., 2017. Growth rate, transmission mode and virulence in human pathogens. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* **372**, 20160094 <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0094>

Li, J., McLandsborough, L.A., 1999. The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. *International Journal of Food Microbiology* **53** (2-3), 185–193. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(99\)00159-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(99)00159-2)

Liu, Y., Yang, S., Tay, J., Liu, Q., Qin, L., Li, Y., 2004. Cell hydrophobicity is a triggering force of biogranulation. *Enzyme and Microbial Technology* **34** (5), 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.009>

Loughlin, M.F., Jones, M.V, Lambert, P.A., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49** (4), 631–639. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.631>

MacKenzie, K.D., Palmer, M.B., Köster, W.L., White, A.P., 2017. Examining the link between biofilm formation and the ability of pathogenic *Salmonella* strains to colonize multiple host species. *Frontiers in Veterinary Science* **4**, 138. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00138>

Malheiro, J.F., Maillard, J.Y., Borges, F., Simões, M., 2019. Biocide potentiation using cinnamic phytochemicals and derivatives. *Molecules* **24** (21), 3918. <https://doi.org/10.3390/molecules24213918>

McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Salter, M., Soontranon, S., 1997. Quantitative Microbiology: A Basis for Food Safety. *Emerging Infectious Disease* **3** (4), 541–549. <https://doi.org/10.3201/eid0304.970419>

McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., Ross, T., 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology* **73** (2-3), 395–407. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00663-8](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00663-8)

Merino, L., Procura, F., Trejo, F.M., Bueno, D.J., Golowczyc, M.A., 2019. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. *Food Research International* **119**, 530-540. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.024>

Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A., Capita, R.,

Capítulo III

2014. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**, 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>

Moraes, J.O., Cruz, E.A., Pinheiro, Í., Oliveira, T.C.M., Alvarenga, V., Sant, A.S., Magnani, M., 2019. An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by five *Salmonella enterica* strains on polypropylene and glass surfaces as affected by pH, temperature and NaCl. *Food Microbiology* **83**, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.012>

Nkemnaso, O.C., Chibueze, I.K., 2018. Advances in Industrial Biofilm Control with Nanotechnology - A Review. *International Journal of Chemical and Biomolecular Science* **4** (4), 41–59. <http://www.aiscience.org/journal/paperInfo/ijcbs?paperId=4235>

Norouzi, F., Mansouri, S., Moradi, M., Razavi, M., 2010. Comparison of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among ESBL-and non – ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *African Journal of Microbiology Research* **4** (11), 1143-1147. https://academicjournals.org/article/article1380271219_Norouzi%20et%20al.pdf

Ortega-Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande-Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., 2013. Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **162** (1), 13-25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028>

Pin, C., Baranyi, J. 2006. Kinetics of Single Cells: Observation and Modeling of a Stochastic Process. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (3), 2163-2169. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.2163-2169.2006>

Reygaert, W.C., 1900. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology* **4** (3), 482–501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>

Ribeiro, S.M., Felício, M.R., Boas, E.V., Gonçalves, S., Costa, F.F., Samy, R.P., Santos, N.C., Franco, O.L., 2016. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & Therapeutics* **160**, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.006>

Rodríguez-Lázaro, D., Alonso-Calleja, C., Oniciuc, E.A., Capita, R., Gallego, D., González-Machado, C., Wagner, M., Barbu, V., Eiros-Bouza, J.M., Nicolau, A.I., Hernández, M., 2018. Characterization of biofilms formed by

foodborne methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Microbiology* **9**, 3004. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03004>

Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R. 2019. Architecture and viability of the biofilms formed by nine *Listeria* strains on various hydrophobic and hydrophilic materials. *Applied Sciences* **9** (23), 5256. <https://doi.org/10.3390/app9235256>

Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W., Hinton, J.C.D., 2012. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. *Journal of Bacteriology* **194** (3), 686–701. <https://doi.org/10.1128/JB.06112-11>

Sanchez-Vizueté, P., Orgaz, B., Aymerich, S., Le Coq, D., Briandet, R., 2015. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology* **6**, 705. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>

Scheuerl, T., Hopkins, M., Nowell, R.W., Rivett, D.W., Barraclough, T.G., Bell, T., 2020. Bacterial adaptation is constrained in complex communities. *Nature Communications* **11**, 754. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14570-z>

Sharma, D., Misba, L., Khan, A.U., 2019. Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* **8**, 76. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3>

Shi, X., Zhu, X., 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* **20** (9), 407–413. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>

Shivaramu, K., Siddhartha, T., Jitendra, P., 2016. Biofilm Formation by Environmental Isolates of *Salmonella* and Their Sensitivity. *Foodborne Pathogens and Disease* **13** (9), 509–516. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2145>

Singh, S., Singh, S.K., Chowdhury, I., Singh, R., 2017. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents. *The Open Microbiology Journal* **11**. 53-62. <https://doi.org/10.2174/1874285801711010053>

Soto, S.M., 2013. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* **4** (3), 223–229. <https://doi.org/10.4161/viru.23724>

Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., Švabić-Vlahović, M., 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface.

Capítulo III

Letters in Applied Microbiology **38**, 428–432. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>

Swinnen, I.A.M., Bernaerts, K., Dens, E.J.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology* **94** (2), 137–159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.01.006>

To, M.S., Favrin, S., Romanova, N., Griffiths, M.W., 2002. Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (11), 5258–5264. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5258-5264.2002>

Vesterlund, S., Paltta, J., Karp, M., Ouwehand, A.C., 2005. Adhesion of bacteria to resected human colonic tissue: Quantitative analysis of bacterial adhesion and viability. *Research in Microbiology* **156** (2), 238–244. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2004.08.012>

Wang, H., Ding, S., Dong, Y., Ye, K., Xu, X., Zhou, G., 2013. Biofilm Formation of *Salmonella* Serotypes in Simulated Meat Processing Environments and Its Relationship to Cell Characteristics. *Journal of Food Protection* **76** (10), 1784–1789. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-093>

Whitehead, K.A., Verran, J., 2015. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science* **2**, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.02.003>

Yaron, S., Römling, U., 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology* **7** (6), 496–516. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12186>

Conclusiones

PRIMERA. La caracterización de una colección de cepas de *Salmonella enterica* procedentes de carne de ave ha permitido demostrar la presencia de resistencia fenotípica y de genes de resistencia a diferentes antibióticos en la mayoría de los aislamientos. Estas cepas constituyen, por lo tanto, un reservorio importante de genes de resistencia a antibióticos y, en algún caso, también de genes de virulencia. Teniendo en cuenta que la resistencia a los antibióticos supone un grave problema global de Salud Pública, resulta imprescindible una correcta manipulación de la carne de pollo que evite la diseminación de dichos genes y/o de las bacterias que los portan.

SEGUNDA. El empleo de biocidas de uso habitual en la industria alimentaria (fosfato trisódico, nitrito sódico e hipoclorito sódico) a dosis subinhibitorias provoca la adaptación de las cepas a los compuestos y modifica su patrón de resistencia a antibióticos, causando un incremento en el número de resistencias fenotípicas detectadas. El efecto de la exposición a los biocidas sobre la resistencia a los antibióticos es dependiente de la familia de antibióticos, siendo la susceptibilidad a los aminoglucósidos y las cefalosporinas la más fuertemente afectada. El hecho de que los cambios en los perfiles de resistencia se observaron para diferentes clases de antibióticos, sugiere que la exposición a los biocidas desencadena mecanismos de resistencia de amplio espectro (por ejemplo, bombas de expulsión inespecíficas o alteraciones de la permeabilidad celular), que provocan una susceptibilidad reducida a compuestos con diferentes estructuras químicas.

TERCERA. En las cepas adaptadas a los biocidas, especialmente al fosfato trisódico, se redujo, con respecto a las cepas no adaptadas, el número de genes de resistencia detectados. Este hecho podría deberse a modificaciones del genoma bacteriano o ser consecuencia de algún mecanismo que impida la amplificación de determinados genes.

CUARTA. La adaptación a los biocidas de las cepas de *S. enterica* provocó modificaciones en el comportamiento de éstas, aumentando tanto su capacidad para formar biofilm como la hidrofobicidad de la superficie celular en algunos de los serotipos estudiados. Se produjeron, además, modificaciones en la cinética de crecimiento, ya que tanto la adaptación como la exposición a dosis subinhibitorias de los biocidas dieron lugar a modificaciones en los parámetros

Conclusiones

de crecimiento de los aislamientos de *S. enterica*, provocando un incremento de la fase de latencia que les permite adaptarse a las nuevas circunstancias para, en una segunda etapa, poder iniciar su multiplicación.

QUINTA. Entre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos estudiados destacó, por su relevancia, la expresión incrementada de bombas de expulsión. Cuando este mecanismo se ve comprometido utilizando un inhibidor de bombas de expulsión, la capacidad de crecimiento de las cepas se reduce, principalmente cuando son expuestas al fosfato trisódico y al hipoclorito sódico.

SEXTA. Tanto el incremento de la resistencia a antibióticos provocado por los biocidas como los mecanismos que generan estas resistencias, fueron dependientes del biocida empleado y del serotipo de *Salmonella enterica* considerado. Así, *Salmonella* Hadar y *Salmonella* 1,4,[5],12;i;- fueron los serovares que experimentaron un mayor incremento en el número de resistencias tras la exposición a biocidas, mientras que *Salmonella* Agona y *Salmonella* Infantis mostraron la mayor capacidad de formación de biofilms e hidrofobicidad superficial.

SÉPTIMA. El control de la transmisión de *Salmonella enterica* en la cadena alimentaria constituye un ejemplo perfecto para describir el concepto “*One Health*”. El empleo de biocidas a dosis subinhibitorias favorece el incremento en los patrones de resistencia a antibióticos y compromete la eficiencia de los mismos como opción terapéutica en casos de salmonelosis humana. Por ello, es necesario un control integral en el ámbito de la producción animal y de la industria alimentaria, limitando la transmisión de estas resistencias desde y hacia el medio ambiente.

ANEXO: PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN

Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A. y Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control*, **40**, 329-334. Reino Unido. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>



Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains



Diana Molina-González^a, Carlos Alonso-Calleja^{a,b}, Alicia Alonso-Hernando^{a,b}, Rosa Capita^{a,b,*}

^a Food Science and Food Technology Institute, University of León, Spain

^b Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 July 2013

Received in revised form

23 November 2013

Accepted 30 November 2013

Keywords:

Salmonella

Antibiotic susceptibility

Biocides

ABSTRACT

Ten multi-drug resistant *Salmonella enterica* isolates belonging to ten different serotypes were exposed to increasing sub-inhibitory concentrations of three biocides widely used in food industry facilities (trisodium phosphate, sodium nitrite, or sodium hypochlorite). Cultures were tested, before and after exposure to biocides, against 31 antibiotics of clinical significance by means of a standard disk-diffusion technique (CLSI). Exposed cultures displayed reduced susceptibility to a range of antibiotics, as compared with not exposed cultures. The impact of biocide exposure on reduced susceptibility to antibiotics was dependent on the *Salmonella* strain and the antibiotic family tested, susceptibility to aminoglycosides and cephalosporins being the most strongly affected. Results in the present study suggest that extensive use of biocides at sub-lethal concentrations could contribute to the emergence of antibiotic resistance in multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains and therefore represent a public health risk. The intra-specific differences observed in antibiotic susceptibility underline the need to screen a wide range of strains.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Non-typhoidal *Salmonella* caused over 95,500 confirmed cases of enteritis in the European Union in 2011 (the notification rate was 20.7 cases per 100,000 population), resulting in significant morbidity and 56 deaths (EFSA, 2013). While most cases of human salmonellosis are self-limiting, requiring only bed rest and re-hydration, antibiotic therapy may be necessary for severe cases, extra-intestinal disease or immune-compromised patients (Álvarez-Fernández, Alonso-Calleja, García-Fernández, & Capita, 2012). In such a scenario, *Salmonella* strains that are resistant to commonly used antibiotics are especially threatening because they may compromise the effective treatment of human illness.

Biocides are used extensively in the food industry as food additives, decontaminants or environmental disinfectants to control harmful micro-organisms (Capita & Alonso-Calleja, 2013). Sub-inhibitory concentrations of biocides could occur as consequence of improper use (erroneous concentration or inadequate distribution),

inappropriate storage of the formulations, excessive amounts of organic matter (known to inactivate several biocides) or use of compounds at sub-lethal concentrations, leading to a “hurdle effect” (Alonso-Hernando, Capita, Prieto, & Alonso-Calleja, 2009). Recent scientific evidence suggests that the selective pressure exerted by the use of biocides, including compounds widely used in food production facilities, could select for resistance to antibiotics, e.g. cross-resistance, co-resistance, selection for clones that are resistant to both biocides and antibiotics, or activation of the SOS response (Capita & Alonso-Calleja, 2013; Randall et al., 2007). In view of the large and increasing use of biocides (generally available figures show that the consumption of biocides in the European Union increased by 4%–5% per year in the last decade, with a market of €10 billion to €11 billion in 2006; SCENIHR, 2009), the risk of biocide use leading to the selection and spread of antibiotic resistant bacteria is of increasing concern. However, scientific evidence is therefore insufficient to assess the risk of biocides correctly (SCENIHR, 2009). Therefore, the aim of this research was to determine the effect of exposure to increasing sub-inhibitory concentrations of three biocides commonly used in the Food Industry (trisodium phosphate, sodium nitrite and sodium hypochlorite) on the susceptibility of multi-drug resistant *Salmonella enterica* isolates from poultry to a range of antibiotics of clinical significance.

* Corresponding author. Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, Campus de Vegazana, s/n, 24071-León, Spain. Tel.: +34 987 29 1000x5633; fax: +34 987 44 20 70.

E-mail addresses: rosa.capita@unileon.es, rmcapg@unileon.es (R. Capita).

2. Materials and methods

2.1. Strains

Ten multi-drug resistant *S. enterica* strains (with resistance to between 6 and 15 antibiotics) previously isolated from poultry were used in this study: *Salmonella* Agona (SA1), *Salmonella* Anatum (SA2), *Salmonella* Enteritidis (SE), *Salmonella* Hadar (SH), *Salmonella* Infantis (SI), *Salmonella* Kentucky (SK), *Salmonella* Thompson (ST1), *Salmonella* Typhimurium (ST2), *Salmonella* 1, 4, (5), 12: i- (S1), and *Salmonella* Virchow (SV). Strains were maintained in tryptone soya broth (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, England) with 20% (v/v) glycerol at -30°C . Working cultures were kept at $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ on plates of tryptone soya agar (TSA, Oxoid).

2.2. Biocides

Three compounds were tested: trisodium phosphate (TSP, Merck, Darmstadt, Germany), sodium nitrite (SNI, Sigma–Aldrich, Steinheim, Germany) and sodium hypochlorite (SHY, Sigma–Aldrich). These compounds are used in the Food Industry as food preservatives (TSP and SNI), decontaminants (TSP) or disinfectants (SHY). Solutions were aseptically prepared before each experiment in sterile distilled water.

2.3. Determination of the Minimum Inhibitory Concentrations (MICs)

The Minimum Inhibition Concentration (MIC) values were established using a microdilution broth method following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2008). Five colonies of each organism were taken from TSA plates, inoculated into 10 mL of Mueller-Hinton (MH) broth (Oxoid) and incubated at 37°C . After 24 h of incubation these bacterial cultures contained approximately 10^8 cfu/mL. For the experiment, 100-well polystyrene micro-well plates (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finland) were used. Wells were filled with 20 μL of the solution of biocides (a range of concentrations was used) and 180 μL of appropriate dilutions (in MH broth) of inocula in order to give a final concentration in the well of 5×10^5 cfu/mL. The inoculum concentration was confirmed by plating. Both positive (200 μL of inoculum at 5×10^5 cfu/mL) and negative (180 μL of MH broth + 20 μL of chemical compound) controls were included in each experiment. Initial optical density at 420–580 nm ($\text{OD}_{420-580}$) values ranged from 0.090 to 0.100. No significant differences were observed between bacterial strains, types of biocides, or controls.

The microwell plates were incubated at 37°C in a Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab) and the MIC was established as the lowest biocide concentration necessary to prevent growth after 48 h of incubation. According to previous findings, an $\text{OD}_{420-580}$ of 0.200 was considered the cut-off for bacterial growth (Díez-García, Capita, & Alonso-Calleja, 2012). Experiments were replicated five times on separate days.

2.4. Exposure to increasing sub-inhibitory concentrations of biocides

The test was performed in the same manner as described for determining MIC. The biocides starting concentration was MIC/2. When growth was observed, 20 μL of the suspension were aseptically transferred to the next well, which contained 160 μL of MH broth and 20 μL of biocide solution. After the transfer, each well contained a biocide concentration 1.5 times stronger than the previous well. This procedure was continued until no growth was observed after 72 h of incubation at 37°C . The suspension in the

last well with recorded growth was streaked on TSA plates with biocide (one-half of the maximum concentration of biocide that supported microbial growth was added to TSA) and stored ($4 \pm 1^{\circ}\text{C}$) after incubation at 37°C for 48 h.

2.5. Antibiotic susceptibility testing

Isolates were screened for susceptibility, before and after exposure to the chemicals, to a panel of 31 antibiotics on Mueller-Hinton agar (Oxoid) by a disk diffusion method described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2008). The following disks (Oxoid) were used: spectinomycin (SH, 100 μg), amikacin (AK; 30 μg), gentamicin (CN; 10 μg), kanamycin (K, 30 μg), streptomycin (S; 10 μg), tobramycin (TOB, 10 μg), rifampicin (RD, 5 μg), ampicillin (AMP, 10 μg), penicillin G (P, 10 units), ticarcillin (TIC, 75 μg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 30 μg), ampicillin/sulbactam (SAM, 20 μg), piperacillin/tazobactam (TZP, 110 μg), cephalothin (KF; 30 μg), cefazolin (KZ, 30 μg), cefoxitin (FOX, 30 μg), cefotaxime (CTX, 30 μg), ceftazidime (CAZ, 30 μg), cefepime (FEP, 30 μg), imipenem (IPM, 10 μg), aztreonam (ATM, 30 μg), sulphonamides (S3, 300 μg), trimethoprim/sulphamethoxazole (SXT; 25 μg), teicoplanin (TEC, 30 μg), chloramphenicol (C; 30 μg), nalidixic acid (NA; 30 μg), ciprofloxacin (CIP; 5 μg), enrofloxacin (ENR; 5 μg), tetracycline (TE; 30 μg), phosphomycin (FOS, 50 μg), and nitrofurantoin (F, 300 μg). The inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediate susceptibility and resistant according to the CLSI (2008) guidelines. To control the precision and accuracy of the results obtained with the disk diffusion test procedure cultures of two quality control strains (*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) with known antimicrobial resistance patterns were used. A total of 1240 tests (considering all combinations of strains, biocides and antibiotics) were performed. Repeatability was assessed by testing a fourth of tests (including combinations for all strains, biocides and antibiotics) twice on separate days with a 3-month interval.

2.6. Statistical analysis

MIC values were evaluated using analysis of variance techniques. Mean separations were obtained using Duncan's multiple range test. The percentages of cultures with increased resistance to antibiotics after exposure to biocides were compared by means of the Fisher's exact and Chi-square tests. Significance was determined at the $P < 0.05$ level. Data processing was carried out using the Statistica® 6.0 software package (Statsoft Ltd., Chicago, Illinois, USA).

Table 1

Minimum inhibitory concentrations (MICs) of three biocides (mg/mL) obtained for 10 multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains.

| <i>Salmonella</i> strain | Biocide | | |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------|------------------|
| | TSP | SNI | SHY |
| <i>Salmonella</i> Agona | 12.60 \pm 0.24ab | 12.04 \pm 0.09ab | 0.43 \pm 0.04a |
| <i>Salmonella</i> Anatum | 12.56 \pm 0.09ab | 12.20 \pm 0.35bcd | 0.43 \pm 0.03a |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | 12.74 \pm 0.31a | 12.32 \pm 0.30bd | 0.43 \pm 0.04a |
| <i>Salmonella</i> Hadar | 12.34 \pm 0.09b | 11.88 \pm 0.11ac | 0.44 \pm 0.05a |
| <i>Salmonella</i> Infantis | 12.36 \pm 0.09b | 11.96 \pm 0.22ac | 0.43 \pm 0.03a |
| <i>Salmonella</i> Kentucky | 12.64 \pm 0.33ab | 11.88 \pm 0.11ac | 0.43 \pm 0.03a |
| <i>Salmonella</i> Thompson | 12.44 \pm 0.09ab | 12.44 \pm 0.41d | 0.44 \pm 0.04a |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium | 12.48 \pm 0.11ab | 11.84 \pm 0.09a | 0.42 \pm 0.05a |
| <i>Salmonella</i> 1, 4, (5), 12: i- | 12.48 \pm 0.41ab | 11.84 \pm 0.22a | 0.44 \pm 0.04a |
| <i>Salmonella</i> Virchow | 12.52 \pm 0.27ab | 11.96 \pm 0.17ac | 0.39 \pm 0.04a |

TSP, Trisodium phosphate; SNI, sodium nitrite; SHY, sodium hypochlorite. Average MICs in the same column with no letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

3. Results and discussion

The MIC values of TSP, SNI and SHY for *Salmonella* isolates prior to exposure to sub-inhibitory concentrations of biocides are shown in Table 1. Statistical analysis of the results revealed that all *Salmonella* strains had a similar susceptibility to TSP (between 12.34 ± 0.09 mg/mL and 12.74 ± 0.31 mg/mL) and SHY (between

0.39 ± 0.04 mg/mL and 0.44 ± 0.04 mg/mL). Small but significant differences were found between strains in respect of their susceptibility to SNI (11.84 ± 0.22 mg/mL to 12.44 ± 0.41 mg/mL). The MIC values observed for *S. enterica* strains are in line with values reported previously (Alonso-Hernando et al., 2009; Kim & Day, 2007; Stanojević, Čomić, Stefanović, & Solujić-Sudolak, 2010), and this confirms that the biocides tested are effective antibacterial

Table 2
Antibiotic resistance patterns of *Salmonella* strains tested.

| Salmonella strain | Antibiotic | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------------|----|----|---|---|-----|----|-----|---|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|-----|-----|---|----|-----|-----|----|-----|---|---|
| | SH | AK | CN | K | S | TOB | RD | AMP | P | TIC | AMC | SAM | TZP | KF | KZ | FOX | CTX | CAZ | FEP | IPM | ATM | S3 | SXT | TEC | C | NA | CIP | ENR | TE | FOS | F | |
| SA1 not exposed | R | S | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | R | I | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | R | S | S | R | I | S | I |
| SA1 exposed to TSP | R | I | S | R | R | I | R | R | R | R | I | I | I | R | S | S | I | S | I | I | I | R | S | R | R | S | I | R | I | S | R | |
| SA1 exposed to SNI | R | R | S | R | R | R | R | R | R | S | I | I | R | S | S | I | I | S | S | I | R | S | R | R | S | S | R | R | I | I | | |
| SA1 exposed to SHY | R | I | I | I | R | I | R | R | R | I | S | S | I | S | S | S | I | I | S | S | I | R | S | R | R | S | S | R | R | S | R | |
| SA2 not exposed | R | S | S | R | R | S | R | S | R | I | S | S | R | R | S | I | S | S | S | S | S | I | S | R | I | I | S | R | R | S | R | |
| SA2 exposed to TSP | R | S | S | I | R | S | R | S | R | S | S | S | I | I | R | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S | I | S | I | I | S | R | |
| SA2 exposed to SNI | R | I | S | I | R | S | R | S | R | I | I | S | R | I | S | R | S | S | S | S | I | S | R | I | I | S | R | R | S | I | | |
| SA2 exposed to SHY | R | I | R | I | R | I | R | S | R | R | S | S | R | I | S | R | I | I | S | S | I | R | I | R | S | I | S | I | R | S | R | |
| SE not exposed | R | S | S | R | R | S | R | R | R | R | S | S | I | I | S | S | I | S | S | S | S | R | S | R | S | S | S | I | I | S | R | |
| SE exposed to TSP | R | R | I | R | R | I | I | R | R | I | S | S | I | R | R | R | R | R | S | S | R | R | S | I | S | R | I | R | I | R | R | |
| SE exposed to SNI | I | I | S | I | I | R | R | R | R | I | S | I | I | S | S | I | S | S | S | S | I | S | R | S | I | S | S | I | S | S | I | |
| SE exposed to SHY | I | I | S | I | I | S | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | I | R | S | S | S | R | S | R | S | S | S | S | I | S | R | |
| SH not exposed | R | S | S | R | R | S | R | S | R | R | S | S | I | I | S | S | I | S | I | R | S | R | S | R | S | R | S | R | R | S | S | |
| SH exposed to TSP | R | R | I | R | R | I | R | I | R | R | I | S | R | R | R | I | R | R | R | R | R | R | R | S | I | S | R | I | R | I | R | |
| SH exposed to SN | I | R | S | R | I | R | R | R | R | S | R | I | I | S | S | I | I | I | I | S | R | S | R | R | R | I | R | R | I | R | R | |
| SH exposed to SH | R | R | I | I | R | I | R | R | R | I | S | R | S | S | S | I | I | S | I | I | R | S | R | R | I | S | I | R | S | R | | |
| SI not exposed | R | S | S | I | R | S | R | R | R | R | I | S | I | I | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | R | S | S | R | S | S | R | |
| SI exposed to TSP | R | I | S | R | R | S | R | R | R | R | I | S | I | I | S | S | S | S | S | I | I | I | R | S | R | R | S | S | R | I | S | R |
| SI exposed to SNI | R | R | R | I | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | R | I | R | S | S | S | R | I | R | R | S | I | R | R | S | R | R | |
| SI exposed to SHY | R | R | R | I | R | R | R | R | R | I | S | R | S | S | R | I | R | S | S | I | R | S | R | R | I | S | R | R | S | R | R | |
| SK not exposed | R | S | S | I | R | I | R | R | R | R | R | S | I | R | R | S | S | S | I | S | S | S | R | R | R | R | R | R | R | S | I | |
| SK exposed to TSP | R | R | I | R | R | I | R | R | R | I | S | R | R | R | R | I | I | R | R | I | R | R | R | S | I | S | R | I | R | I | R | |
| SK exposed to SNI | I | R | R | I | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S | S | S | I | R | S | R | I | R | R | R | R | R | S | S | |
| SK exposed to SHY | I | R | I | I | I | R | R | R | R | I | R | R | R | R | R | I | I | I | S | S | I | R | S | R | I | R | R | R | R | S | R | |
| ST1 not exposed | I | I | S | R | I | S | R | S | R | R | S | S | S | S | S | I | S | S | S | I | R | S | R | S | S | S | I | I | S | I | | |
| ST1 exposed to TSP | R | R | S | R | R | S | R | S | R | I | S | I | R | R | R | I | R | R | R | S | R | R | S | R | R | S | I | S | R | I | R | |
| ST1 exposed to SNI | R | I | R | I | R | I | R | S | R | I | S | S | R | S | I | S | I | I | S | S | S | R | S | R | I | S | S | R | I | S | S | |
| ST1 exposed to SHY | I | R | R | R | I | R | R | S | R | I | I | S | S | S | R | R | I | R | S | S | S | R | I | R | S | S | I | R | S | I | I | |
| ST2 not exposed | R | S | S | R | R | S | R | R | R | R | R | S | R | S | S | S | S | S | S | I | S | R | S | R | R | R | S | I | R | S | R | |
| ST2 exposed to TSP | R | R | I | R | R | R | R | R | R | I | I | S | R | R | R | R | I | S | R | S | R | R | I | I | I | R | S | R | R | R | R | |
| ST2 exposed to SNI | R | I | S | I | R | R | R | R | R | I | I | I | I | S | I | S | I | S | S | S | S | R | S | R | R | R | S | I | R | S | R | |
| ST2 exposed to SHY | R | R | I | I | R | R | R | R | R | I | I | R | S | R | I | R | S | S | S | I | R | S | R | R | R | I | I | R | S | R | R | |
| S1 not exposed | I | S | S | I | I | S | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | R | S | S | S | S | R | S | S |
| S1 exposed to TSP | R | I | S | R | R | I | R | R | R | R | I | I | I | S | S | S | S | S | S | I | I | R | S | R | R | S | S | R | R | S | R | |
| S1 exposed to SNI | I | R | R | I | I | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | S | S | S | I | S | S | I | R | I | S | I | R | S | I | |
| S1 exposed to SHY | I | I | R | R | I | I | R | R | R | R | I | I | R | R | S | S | I | S | R | S | I | R | S | R | I | I | S | R | R | S | R | |
| SV not exposed | I | S | S | R | I | I | R | S | R | I | S | S | I | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | R | R | I | R | S | S | R | |
| SV exposed to TSP | I | S | S | R | I | S | R | I | R | R | S | S | I | S | S | S | I | S | S | S | S | R | S | R | R | I | S | I | R | S | I | |
| SV exposed to SNI | I | R | R | I | I | I | R | S | R | S | I | S | I | S | I | I | I | I | S | I | S | R | S | R | R | R | R | R | R | S | R | |
| SV exposed to SHY | R | I | I | I | R | I | R | S | R | S | S | S | R | S | S | S | I | S | S | S | S | R | S | R | R | R | I | R | R | S | R | |

SH, spectinomycin (100 µg); AK, amikacin (30 µg); CN, gentamicin (10 µg); K, kanamycin (30 µg); S, streptomycin (10 µg); TOB, tobramycin (10 µg); RD, rifampicin (5 µg); AMP, ampicillin (10 µg); P, penicillin G (10 units); TIC, ticarcillin (75 µg); AMC, amoxicillin/clavulanic acid (30 µg); SAM, ampicillin/sulbactam (20 µg); TZP, piperacillin/tazobactam (110 µg); KF, cephalothin (30 µg); KZ, cefazolin (30 µg); FOX, cefoxitin (30 µg); CTX, cefotaxime (30 µg); CAZ, ceftazidime (30 µg); FEP, cefepime (30 µg); IPM, imipenem (10 µg); ATM, aztreonam (30 µg); S3, sulphonamides (300 µg); SXT, trimethoprim/sulphamethoxazole (25 µg); TEC, teicoplanin (30 µg); C, chloramphenicol (30 µg); NA, nalidixic acid (30 µg); CIP, ciprofloxacin (5 µg); ENR, enrofloxacin (5 µg); TE, tetracycline (30 µg); FOS, fosfomycin (50 µg); F, nitrofurantoin (300 µg).

SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12: i-; SV, *Salmonella* Virchow.

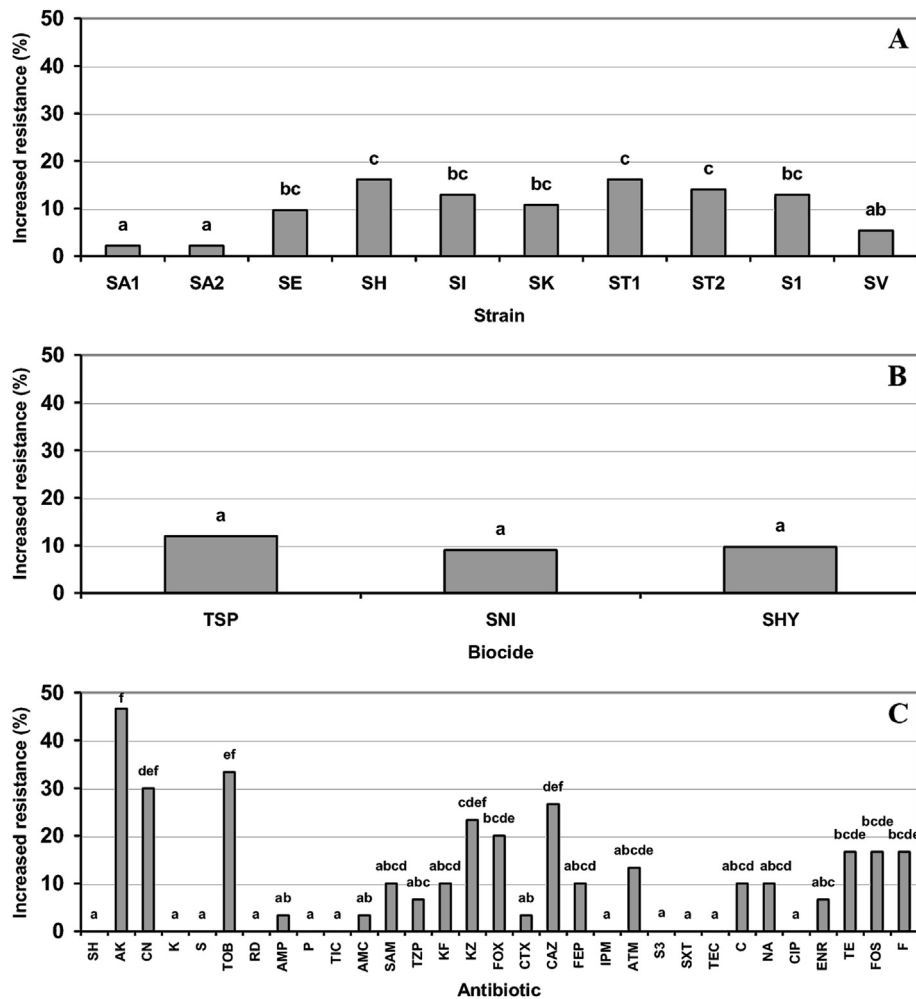
TSP, trisodium phosphate; SNI, sodium nitrite; SHY, sodium hypochlorite.

R, resistant strain; I, strain of intermediate susceptibility; S, susceptible strain; exposed strains with increased resistance to antibiotics (relative to unexposed strains) are shaded; exposed strains not having increased susceptibility to antibiotics are not shaded. The increase in resistance was defined as a change from S (before exposure) to R (after exposure) according to the CLSI guidelines.

agents. After several passages through gradually higher concentrations of biocides, the maximum concentration of TSP that allowed bacterial growth was 13.50 mg/mL for all strains. However, *Salmonella* strains differed in their response to exposure to sub-lethal concentrations of SNI and SHY, suggesting that adaptation to these compounds is strain-dependent. The maximum tolerable

concentrations were 30.38 mg/mL of SNI (45.56 mg/mL for SA1), or 0.68 mg/mL of SHY (1.01 mg/mL for SH and 1.52 mg/mL for SI).

Before and after exposure to increasing sub-inhibitory concentrations of biocides, strains were screened for susceptibility to 31 antibiotics. The antibiotic resistance patterns of the strains tested are shown in Table 2. Before exposure, strains showed resistance to



SA1, *Salmonella* Agona; SA2, *Salmonella* Anatum; SE, *Salmonella* Enteritidis; SH, *Salmonella* Hadar; SI, *Salmonella* Infantis; SK, *Salmonella* Kentucky; ST1, *Salmonella* Thompson; ST2, *Salmonella* Typhimurium; S1, *Salmonella* 1, 4, (5), 12: i-; SV, *Salmonella* Virchow.

TSP, trisodium phosphate; SN, sodium nitrite; SH, sodium hypochlorite.

SH, spectinomycin (100 µg); AK, amikacin (30 µg); CN, gentamicin (10 µg); K, kanamycin (30 µg); S, streptomycin (10 µg); TOB, tobramycin (10 µg); RD, rifampicin (5 µg); AMP, ampicillin (10 µg); P, penicillin G (10 units); TIC, ticarcillin (75 µg); AMC, amoxicillin/clavulanic acid (30 µg); SAM, ampicillin/sulbactam (20 µg); TZP, piperacillin/tazobactam (110 µg); KF, cephalothin (30 µg); KZ, cefazolin (30 µg); FOX, ceftaxime (30 µg); CTX, cefotaxime (30 µg); CAZ, ceftazidime (30 µg); FEP, cefepime (30 µg); IPM, imipenem (10 µg); ATM, aztreonam (30 µg); S3, sulphonamides (300 µg); SXT, trimethoprim/sulphamethoxazole (25 µg); TEC, teicoplanin (30 µg); C, chloramphenicol (30 µg); NA, nalidixic acid (30 µg); CIP, ciprofloxacin (5 µg); ENR, enrofloxacin (5 µg); TE, tetracycline (30 µg); FOS, fosfomycin (50 µg); F, nitrofurantoin (300 µg).

Columns in the same graph with no letters in common are significantly ($P < 0.05$) different.

Fig. 1. Percentage of cultures showing increased resistance to antibiotics after exposure to sub-lethal concentrations of biocides. The increase in resistance was defined as a change from susceptible (before exposure) to resistant (after exposure) according to the CLSI guidelines. Graph A: comparison between strains (considering simultaneously all biocides and antibiotics); Graph B: comparison between biocides (considering simultaneously all strains and antibiotics); Graph C: comparison between antibiotics (considering simultaneously all strains and biocides).

6 (ST1), 8 (S1), 9 (SV), 10 (SE), 11 (SA2, SI), 12 (SA1, SH), 14 (SK) or 15 (ST2) antibiotics. The exposure of strains to increasing sub-inhibitory concentrations of biocides was associated with reductions in the susceptibility to several antibiotics, and strains moved from the category of “susceptible” (implying that infections due to bacteria will probably respond to that antibiotic) to that of “resistant” (implying that infections due to bacteria will probably not respond to that antibiotic), according to the guidelines used. In a number of cases, the increase in resistance was modest, and strains moved from “susceptible” to “intermediately susceptible”, or from “intermediately susceptible” to “resistant” (Table 2). For various additional cultures and antibiotics, the diameter of inhibition zones in exposed cells decreased with regard to unexposed, but did not exceed the limit of resistance according to the CLSI guidelines. It has been suggested that even a modest change in susceptibility would still be significant because it might confer a growth advantage on a strain (Braudaki & Hilton, 2004). In all cases the strains belonged to the same group (resistant, susceptible or intermediate susceptibility) in the two replicates performed with a three-month interval.

The changes in the antibiotic-resistance profiles after exposure to biocides were observed for different classes of antibiotics, suggesting that the mechanisms of tolerance to biocides are associated with a broad spectrum mechanism (e.g. efflux pumps or permeability alterations) and cause reduced susceptibility to compounds with diverse chemical structures, as previously suggested (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

It would appear that the present study is the first to compare the effects of exposure to increasing sub-inhibitory concentrations of three different biocides widely used in food processing facilities (TSP, SNI and SHY) on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella* strains. Published studies with different biocides and bacterial strains provide different perspectives on the emergence of bacterial resistance due to use of biocides. Randall et al. (2007) observed that the use of certain types of disinfectants can increase bacterial resistance to various disinfectants and to antibiotics. These authors exposed eight *S. enterica* serotype Typhimurium strains to different farm disinfectants (tar oil phenol, oxidizing compound, aldehyde-based disinfectant or quaternary ammonium compound [QAC]). Results differed depending on the disinfectant and the strain tested. Exposure to oxidizing compounds notably decreased susceptibility to ciprofloxacin and to various disinfectants by inducing the expression of the AcrAB–TolC efflux system. These authors concluded that the potential for this type of compound to drive resistance to ciprofloxacin is a real concern and may provide a selective pressure for the selection and/or maintenance of ciprofloxacin-resistant strains in the farm environment in the absence of ciprofloxacin itself. Other authors have also observed that exposure to increasing sub-lethal concentrations of biocides selects for antibiotic resistance in *Salmonella* strains (Condell et al., 2012; Karatzas et al., 2007).

On the other hand, several studies show that the use of biocides at sub-lethal doses doesn't increase resistance to antibiotics (Ledder, Gilbert, Willis, & McBain, 2006; Thomas, Maillard, Lambert, & Russell, 2000). It has been suggested that the variable results observed in research reports indicate that there is a need for further studies addressing the impact of the use of biocides and the emergence of antibiotic resistance (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

The impact of biocide exposure on reduced susceptibility to antibiotics depended on the *Salmonella* strain and the antibiotic families tested (Fig. 1). SA1 and SA2 showed a smaller ($P < 0.05$) number of increased resistances (2 for each strain) than the remaining strains (from 5 to 15). This variability is in agreement with previous findings (Alonso-Hernando et al., 2009; Braudaki & Hilton, 2004), and suggests that changes in the pattern of

susceptibility to antibiotics after exposure to biocides might be strain-specific rather than species- or genus-specific. This makes it very difficult to predict the behavior of a strain after sub-lethal exposure to biocides, even if data on related strains are available.

Major differences were observed between the antibiotics tested, with aminoglycosides (AK, CN and TOB) and cephalosporins (especially KZ, FOX and CAZ) showing the highest increased resistances. Both classes of antibiotics are known efflux pump substrates (Condell et al., 2012). These results are noteworthy in view of the fact that cephalosporins are among the therapeutic options for treating human infections by *Salmonella* in young patients (Álvarez-Fernández et al., 2012).

4. Conclusions

Results in this study demonstrated that *in vitro* exposure of multi-drug resistant *S. enterica* strains to sub-lethal concentrations of biocides, which might occur during multiple steps in the food chain, may reduce the susceptibility of the cultures to commonly used antibiotics. However, it should be emphasized that results in this paper derive from laboratory based experiments and further investigations under practical field conditions would be needed to substantiate these findings. Moreover, additional investigations are required to determine the molecular mechanisms underlying the induction of phenotypic resistance to antibiotics by TSP, SNI and SHY.

Acknowledgments

The authors wish to thank the Junta de Castilla y León (Project LE013A10-2) and the Ministerio de Ciencia e Innovación (Project AGL2011-29645) for the financial support.

References

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., & Alonso-Calleja, C. (2009). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control*, 20(12), 1108–1111.
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., & Capita, R. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 281–287.
- Braudaki, M., & Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 73–78.
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11–48.
- CLSI. (2008). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals*. Approved Standard M31-A3. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K. A., Walsh, C., Burgess, C., et al. (2012). Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(9), 3087–3097.
- Díez-García, M., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31(2), 173–180.
- EFSA. (2013). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4), 3129–3378.
- Karatzas, K. A., Webber, M. A., Jorgensen, F., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V., & Humphrey, T. J. (2007). Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(5), 947–955.
- Kim, D., & Day, D. F. (2007). A biocidal combination capable of sanitizing raw chicken skin. *Food Control*, 18(10), 1272–1276.
- Ledder, R. G., Gilbert, P., Willis, C., & McBain, A. J. (2006). Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 *ex-situ* environmental and human isolates. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1132–1140.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., et al. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for

- mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1273–1280.
- SCENIHR. (2009). *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. 19 January 2009. Available at http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf.
- Stanojević, D., Čomić, L., Stefanović, O., & Solujić-Sudolak, S. (2010). *In vitro* synergistic antibacterial activity of *Salvia officinalis* L. and some preservatives. *Archives of Biological Science Belgrade*, 62(1), 175–183.
- Thomas, L., Maillard, J.-Y., Lambert, R. J. W., & Russell, A. D. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. *Journal of Hospital Infection*, 46(4), 297–303.