



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

TESIS DOCTORAL

**“CARACTERIZACIÓN DE VARIOS GRUPOS MICROBIANOS EN CARNE  
Y PREPARADOS CÁRNICOS: RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS,  
CAPACIDAD PARA FORMAR BIOFILM Y SUSCEPTIBILIDAD A  
DIFERENTES TRATAMIENTOS DESCONTAMINANTES”**

**Ana Castaño Arriba**

**Programa de Doctorado de Ciencias Veterinarias y de los Alimentos**

**Dirigida por:**

***Dr. Carlos Alonso Calleja***

Catedrático del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

***Dra. Rosa Capita González***

Catedrática del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**León, 2023**





**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“CARACTERIZACIÓN DE VARIOS GRUPOS MICROBIANOS EN CARNE  
Y PREPARADOS CÁRNICOS: RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS,  
CAPACIDAD PARA FORMAR BIOFILM Y SUSCEPTIBILIDAD A  
DIFERENTES TRATAMIENTOS DESCONTAMINANTES”**

**“CHARACTERIZATION OF SEVERAL MICROBIAL GROUPS IN MEAT AND MEAT  
PREPARATIONS: RESISTANCE TO ANTIBIOTICS, ABILITY TO FORM BIOFILM  
AND SUSCEPTIBILITY TO DIFFERENT DECONTAMINANT TREATMENTS”**

**Ana Castaño Arriba**

**León, 2023**



El trabajo recogido en la presente Memoria ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (INIA; RTA2014-00045-C03-02), el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (RTI2018-098267-R-C33), la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (LE164G18 y LE018P20) y el Plan Operativo de Empleo Juvenil (Iniciativa de Empleo Juvenil, Fondo Social Europeo).



*“Todas las cosas son imposibles, mientras lo parecen.”*

Concepción Arenal (1820-1893)



## **Agradecimientos**

Cuando comienzas a realizar un doctorado sabes que será un trabajo duro, pero solo cuando lo estás desarrollando te das cuenta de los altibajos por los que discurre, con sus momentos fluidos y con sus atascos. Es en estos últimos momentos cuando más se percibe la ayuda de los demás. Así, es importante recordar que la contribución de mucha gente durante todo el proceso es el que hace posible terminarlo con éxito. Así, escribo estas líneas con el fin de expresar mi reconocimiento y agradecimiento:

A los catedráticos Carlos Alonso Calleja y Rosa Capita, Directores de esta tesis, gracias a los cuales tomé la decisión de matricularme en este programa de doctorado y sin los cuales este trabajo no habría sido posible. Ellos son los que me han guiado durante todo el proceso con mucha dedicación, paciencia y esfuerzo.

A mis compañeros del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. A Cristina Rodríguez Melcón, siempre dispuesta a echarme una mano, incluso en su tiempo libre, y cuya compañía fue la responsable de que disfrutara enormemente los viajes a los congresos. A Camino González Machado, por su generosa contribución al estudio del crecimiento de biofilms y por el mimo que puso durante su desarrollo. A David Jiménez de Juan, que hizo el congreso de Tarragona mucho más ameno.

A Javier Sanz, siempre dispuesto a echarme una mano acompañada de buen humor. A Rosana, Eva y Eugenia, que me regalaron tiempo prestándome su ayuda con el dosificador, la olla y el autoclave. A Eutiquio, por su energía mañanera, cuyo esfuerzo diario me hizo la vida más fácil. A Ignacio, que lo sustituyó en tan ardua tarea. A María, artífice de un agradable entorno de trabajo. A la sonrisa de Elba y la charla amena de María González.

A mi familia, que, aunque no ha colaborado de forma tangible, me ha dado apoyo, consejo y fuerza cuando más lo he necesitado. En especial a mis padres, mi hermano Alberto, Mónica, Selena, Júpiter, Juli, Nazareth, Adrián, Robin, Nieves e hijos, Claudio, Conchita e Isa. A Iván, por su especial habilidad para producir motivación instantánea.

A mis amigos Helen, Dani, Chema, Arrate, Olga, Isaac, Saúl, Fernando, Carmen, Sara, Isa y Alicia, siempre preparados para escuchar, reír y disfrutar de la vida.

Y, por último, pero no por ello menos importante, gracias a la Universidad de León y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos por acogerme en esta aventura y proporcionarme los recursos esenciales para este trabajo.

A mi familia, que tantas veces recogió mi alma.

A Iván, por su optimismo infinito.

A Mario, mi último y mejor descubrimiento.





**ÍNDICES**

---



# ÍNDICE GENERAL

<b>Índice de tablas</b> .....	<b>I</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>V</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>VII</b>
<b>Glosario</b> .....	<b>XI</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>XVII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. CARNE: DEFINICIÓN Y TIPOS</b> .....	<b>1</b>
1.1. CARNE .....	1
1.2. DERIVADOS CÁRNICOS .....	1
1.3. CARNE FRESCA .....	1
1.4. CARNE PICADA .....	1
1.5. PREPARADOS DE CARNE .....	2
1.6. PRODUCTOS CÁRNICOS .....	2
<b>2. PRODUCCIÓN, CONSUMO E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR CÁRNICO</b> .....	<b>2</b>
2.1. EN EL ÁMBITO MUNDIAL .....	2
2.1.1. Producción .....	2
2.1.2. Consumo .....	3
2.1.3. Importancia económica .....	4
2.2. EN LA UNIÓN EUROPEA .....	5
2.2.1. Producción .....	5
2.2.2. Consumo .....	6
2.2.3. Importancia económica .....	7
2.3. EN ESPAÑA .....	8
2.3.1. Producción .....	8
2.3.2. Consumo .....	9
2.3.3. Importancia económica .....	10
2.4. EN CASTILLA Y LEÓN .....	11
2.4.1. Producción .....	11
2.4.2. Consumo .....	12

<b>3. BROTES ALIMENTARIOS TRANSMITIDOS POR LA CARNE Y SUS DERIVADOS</b>	<b>12</b>
3.1. EN EL ÁMBITO MUNDIAL	12
3.2. EN LA UNIÓN EUROPEA	13
3.3. EN ESPAÑA	19
3.4. EN CASTILLA Y LEÓN	20
<b>4. SEGURIDAD Y CALIDAD DE LA CARNE</b>	<b>22</b>
4.1. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS PERMITIDOS POR LEGISLACIÓN	22
4.2. CALIDAD DE LA CARNE	27
4.2.1. Señales de calidad o de búsqueda	27
4.2.2. Atributos de calidad	28
4.3. IMPORTANCIA PARA LOS CONSUMIDORES	32
4.4. EXPECTATIVAS DE CALIDAD DEL CONSUMIDOR	32
<b>5. COLOR DE LA CARNE FRESCA</b>	<b>33</b>
5.1. COLOR INSTRUMENTAL	37
<b>6. USO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE CARNE</b>	<b>39</b>
6.1. EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTIMICROBIANOS	40
6.2. INCONVENIENTES DEL USO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA CARNE	43
6.3. FOSFATO TRISÓDICO Y ÁCIDOS ORGÁNICOS	44
6.3.1. Fosfato trisódico	44
6.3.2. Ácido cítrico	46
6.3.3. Ácido ascórbico	46
6.3.4. Ácido láctico	47
6.4. LEGISLACIÓN	47
<b>7. BIOFILMS</b>	<b>49</b>
7.1. FORMACIÓN DE LOS BIOFILMS	52
7.2. RESISTENCIA DE LOS BIOFILMS	54
<b>8. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS</b>	<b>56</b>
8.1. DESARROLLO DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS	59
8.2. RESISTENCIAS EN LA CADENA ALIMENTARIA Y EN CARNE	60
8.3. MEDIDAS ANTE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	61
8.4. PRINCIPALES BACTERIAS PATÓGENAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS	63

---

<b>9. ENTEROBACTERIAS</b> .....	<b>65</b>
<b>10. ENTEROCOCOS</b> .....	<b>68</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>73</b>
<b>CAPÍTULO I. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÁCIDO LÁCTICO AL 4%, ÁCIDO CÍTRICO AL 2% Y AL 4%, Y FOSFATO TRISÓDICO AL 10% SOBRE CARNE DE VACUNO</b> .....	<b>77</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	78
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	80
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	86
<b>CAPÍTULO II. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL FOSFATO TRISÓDICO AL 8%, ÁCIDO ASCÓRBICO AL 2% Y ÁCIDO LÁCTICO AL 2% SOBRE CARNE DE CONEJO</b> .....	<b>101</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	102
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	104
<b>RESULTADOS</b> .....	108
<b>DISCUSIÓN</b> .....	118
<b>CAPÍTULO III. DIVERSIDAD, RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE PREPARADOS CÁRNICOS DE VACUNO, CERDO, POLLO Y PAVO</b> .....	<b>129</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	129
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	132
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	135
<b>CAPÍTULO IV. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE ENTEROCOCOS AISLADOS DE PREPARADOS DE CARNE ROJA Y AVES DE CORRAL</b> .....	<b>147</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	147
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	150
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	153
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>165</b>

<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>171</b>
---	------------

<b>ANEXO I: PUBLICACIONES</b> .....	<b>217</b>
-------------------------------------	------------

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción de carne a nivel mundial en 2021 (FAOSTAT) .....	3
Tabla 2. Mercado de la carne a nivel mundial en 2021 (FAO, 2022b) .....	5
Tabla 3. Producción de carne en la Unión Europea en 2021 (FAOSTAT) .....	6
Tabla 4. Mercado de la carne en la Unión Europea en 2021 (FAO, 2022b) .....	7
Tabla 5. Producción de carne en España en 2021 (FAOSTAT) .....	8
Tabla 6. Consumo de carne fresca en España en 2021 (MAPA, 2022e) .....	10
Tabla 7. Comercio exterior de carne en España en 2021 (MAPA, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d) .....	11
Tabla 8. Serotipos más frecuentes de casos confirmados de <i>Salmonella</i> en la Unión Europea en 2021 (EFSA-ECDC, 2022) .....	15
Tabla 9. Serotipos de <i>Salmonella</i> aislados de animales y comida en la Unión Europea en 2021 (EFSA-ECDC, 2022) .....	16
Tabla 10. Serotipos más frecuentes de brotes confirmados de STEC en la Unión Europea en 2021 (EFSA-ECDC, 2022) .....	17
Tabla 11. Presencia de <i>Campylobacter</i> en carne fresca y derivados de distinto origen animal en la Unión Europea en 2021 (EFSA-ECDC, 2022) .....	18
Tabla 12. Brotes de origen alimentario en Castilla y León en 2021 (Consejería de Sanidad, 2022) .....	21
Tabla 13. Criterios de seguridad alimentaria del Reglamento 2073/2005 para carne y productos derivados (Reglamento (CE) 2073/2005) .....	23
Tabla 14. Criterios de higiene de los procesos del Reglamento 2073/2005 para carne y productos derivados (Reglamento (CE) 2073/2005) .....	25
Tabla 15. Porcentaje de los principales microorganismos patógenos que presentan resistencia a antibióticos en España y en Europa en 2020 (ECDC y OMS, 2022) .....	58

Tabla 16. Ranking de los microorganismos patógenos con resistencias a antibióticos de mayor a menor importancia ( <i>OMS Pathogens priority list working group, 2018</i> ) .....	63
Tabla 17. Temperaturas y tiempos de incubación para determinar los recuentos de diversos grupos microbianos .....	84
Tabla 18. Recuento de diversos grupos microbianos de muestras de carne de vacuno tratadas y no tratadas .....	89
Tabla 19. Valores de pH de muestras de carne de vacuno tratadas y no tratadas .....	91
Tabla 20. Valores de los parámetros de color, olor y aceptabilidad general del análisis sensorial de muestras de carne de vacuno tratadas y no tratadas .....	93
Tabla 21. Valores de color (espacio CIE L*a*b*) de muestras de carne de vacuno tratadas y no tratadas .....	97
Tabla 22. Temperatura media y pH medio de los tratamientos aplicados a paletillas de conejo .....	106
Tabla 23. Recuento de la flora o microbiota aerobia viable de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas sin inocular .....	109
Tabla 24. Recuento de la flora o microbiota aerobia viable de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas inoculadas con <i>Listeria monocytogenes</i> .....	110
Tabla 25. Recuento de la flora o microbiota aerobia viable de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas inoculadas con <i>Salmonella</i> Hadar .....	111
Tabla 26. Recuento de la flora o microbiota aerobia viable de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas inoculadas con SARM .....	112

---

Tabla 27. Recuento de la flora o microbiota aerobia viable de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas inoculadas con EFRV .....	113
Tabla 28. Valores medios de pH de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas .....	114
Tabla 29. Valores de los parámetros de color, olor y aceptabilidad general del análisis sensorial de paletillas de conejo no tratadas y tratadas .....	115
Tabla 30. Valores de color (espacio CIE L*a*b*) de paletillas de conejo no tratadas y tratadas .....	117
Tabla 31. Identificación y origen (especie animal) de 200 cepas de enterobacterias aisladas de preparados cárnicos de carne roja y aves de corral .....	136
Tabla 32. Número y porcentaje de cepas de enterobacterias multirresistentes, resistentes y sensibles aisladas de preparados cárnicos de carne roja y de ave .....	137
Tabla 33. Capacidad de formación de biofilm de diversas especies de enterobacterias aisladas de preparados cárnicos de carne roja y de ave .....	142
Tabla 34. Patrones de resistencia a antibióticos en 200 aislados de enterococos de preparados cárnicos .....	156



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de carne en 2021 (FAOSTAT) .....	9
Figura 2. Sello de certificación ecológica de la Unión Europea (Reglamento (UE) 271/2010) .....	31
Figura 3. Sellos oficiales de los Consejos Reguladores de Agricultura Ecológica de las CC.AA. ....	31
Figura 4. Sellos de Denominación de Origen Protegida y de Indicación Geográfica Protegida (MAPAMA, 2017) .....	31
Figura 5. Esquema de la percepción de la calidad experimentada por el consumidor (adaptado de Fernqvist y Ekelund, 2014) .....	33
Figura 6. Grupo hemo de la mioglobina (Castaños, 2015) .....	34
Figura 7. Diagrama de las distintas formas de la mioglobina en carne (adaptado de Hunt <i>et al.</i> , 2012) .....	35
Figura 8. Imagen del color de una pieza de carne recién cortada (Lorés, 2012) .....	35
Figura 9. Esquema del espacio CIE L*a*b* (adaptado de Hunt <i>et al.</i> , 2012) .....	38
Figura 10. Estructura química del fosfato trisódico .....	44
Figura 11. Estructura química del ácido cítrico .....	46
Figura 12. Estructura química del ácido ascórbico .....	46
Figura 13. Estructura química del ácido láctico .....	47
Figura 14. Microfotografía de un biofilm sobre una superficie metálica (Donlan y Costerton, 2002) .....	49
Figura 15. Esquema de la formación de un biofilm (adaptado de Monds y O'Toole, 2009) .....	54
Figura 16. Porcentaje de cepas aisladas de SARM en Europa en 2020 (ECDC y OMS, 2022) .....	64

<b>Figura 17.</b> Porcentaje de cepas aisladas de EFRV en Europa en 2020 (ECDC y OMS, 2022) .....	65
<b>Figura 18.</b> Ficha utilizada para realizar el análisis organoléptico .....	85
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de cepas de enterobacterias susceptibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados .....	139
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de cepas no productoras de biofilm y de cepas débiles, moderadas y fuertes productoras de biofilm aisladas de preparados cárnicos de vacuno, cerdo, pollo y pavo .....	141
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de cepas de enterococos susceptibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados .....	158
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de cepas de enterococos débiles, moderadas y fuertes productoras de biofilm aisladas de carne de vacuno, cerdo, pollo y pavo .....	160

## ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido Ascórbico
<b>AC</b>	Ácido Cítrico
<b>AENOR</b>	Asociación Española de Normalización y Certificación
<b>AL</b>	Ácido Láctico
<b>API</b>	<i>Analytical Profile Index</i> (Índice de Perfil Analítico)
<b>APPCC</b>	Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP en inglés)
<b>aw</b>	actividad del agua
<b>BP</b>	<i>Baird-Parker agar</i> (agar Baird-Parker)
<b>BPH</b>	Buenas Prácticas de Higiene
<b>CC.AA.</b>	Comunidades Autónomas
<b>CDC</b>	<i>Center for Disease Control and Prevention</i> (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades, EE.UU.)
<b>CE</b>	Comunidad Europea
<b>CFR</b>	<i>Code of Federal Regulation</i> (Código de Regulaciones Federales, EE.UU.)
<b>CIE</b>	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i> (Comisión Internacional de Iluminación)
<b>CLSI</b>	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio, EE.UU.)
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> (Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas)
<b>DFD</b>	<i>Dark, Firm, Dry</i> (carnes oscuras, duras y secas)
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>DOP</b>	Denominación de Origen Protegida
<b>e<sup>-</sup></b>	electrón
<b>EC</b>	<i>European Commission</i> (Comisión Europea)
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i> (Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades)
<b>eCFR</b>	<i>electronic Code of Federal Regulations</i> (Código electrónico de Regulaciones Federales)

## Abreviaturas

---

<b>ed.</b>	edición
<b>EE.UU.</b>	Estados Unidos
<b>EFRV</b>	<i>Enterococcus faecium</i> Resistente a la Vancomicina
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i> (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency's</i> (Agencia Europea de Medicamentos)
<b>EN</b>	<i>European Norm</i> (Norma Europea)
<b>et al.</b>	<i>et alii</i> (y otros)
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
<b>FAOSTAT</b>	estadísticas de la FAO
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i> (Administración de Alimentos y Drogas, EE.UU.)
<b>Fe<sup>2+</sup></b>	hierro ferroso
<b>Fe<sup>3+</sup></b>	hierro férrico
<b>FT</b>	Fosfato Trisódico
<b>g</b>	gramos
<b>GAP-AMR</b>	<i>Global Action Plan on Antimicrobial Resistance</i> (Plan de Acción Global sobre Resistencia a Antibióticos)
<b>GPO</b>	<i>United States Government Publishing Office</i> (Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos)
<b>GRAS</b>	<i>Generally Recognized As Safe</i> (Generalmente Reconocido Como Seguro, EE.UU.)
<b>ICMSF</b>	<i>International Commission on Microbiological Specifications for Foods</i> (Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos)
<b>IGP</b>	Indicación Geográfica Protegida
<b>IND</b>	prueba de producción de indol en las galerías API 20E
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estadística (España)
<b>ISO</b>	<i>International Standardization Organization</i> (Organización Internacional de Normalización)
<b>KAA</b>	<i>Kanamycin Aesculin Azide agar</i> (agar Kanamicina Esculina Azida)

<b>kg</b>	kilogramos
<b>L</b>	litros
<b>log</b>	logaritmo
<b>MAPA</b>	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (España)
<b>MAPAMA</b>	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (actualmente Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y Ministerio para la Transición Ecológica, España)
<b>MCI</b>	Ministerio de Ciencia e Innovación (España)
<b>MCIU</b>	Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (España)
<b>MHA</b>	<i>Mueller-Hinton Agar</i> (Agar Mueller-Hinton)
<b>MRS</b>	<i>Man, Rogosa, Sharpe agar</i> (agar de Man, Rogosa y Sharpe)
<b>MSA</b>	<i>Mannitol Salt Agar</i> (Agar Manitol Salado)
<b>MSCBS</b>	Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social (actualmente Ministerio de Sanidad, España)
<b>O<sub>2</sub></b>	oxígeno molecular
<b>OCLA</b>	<i>Oxoid Chromogenic Listeria Agar</i> (Agar Cromogénico para <i>Listeria</i> de Oxoid)
<b>OECD</b>	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i> (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico [OCDE])
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>OMC</b>	Organización Mundial del Comercio
<b>OMPI</b>	Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PALCAM</b>	<i>Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol</i> (agar selectivo para <i>Listeria</i> con cloruro de litio, sulfato de polimixina B, acriflavina-HCl y ceftazidima)
<b>PCA</b>	<i>Plate Count Agar</i> (Agar de recuento estándar)
<b>PIB</b>	Producto Interior Bruto
<b>pp.</b>	páginas
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>PSE</b>	<i>Pale, Soft, Exudative</i> (carnes pálidas, blandas y exudativas)

## Abreviaturas

---

<b>QPS</b>	<i>Qualified Presumption of Safety</i> (Calificado como Supuestamente Seguro)
<b>RAE</b>	Real Academia Española
<b>RASFF</b>	<i>The Rapid Alert System for Food and Feed</i> (Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos)
<b>RVS</b>	<i>Rappaport-Vassiliadis broth</i> (caldo de enriquecimiento Rappaport-Vassiliadis)
<b>SARM</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a la Meticilina
<b>SCVPH</b>	<i>Scientific Committee on Veterinary measures relating to Public Health</i> (Comité Científico de medidas Veterinarias relativo a la Salud Pública)
<b>SEIMC</b>	Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica
<b>spp.</b>	especies
<b>STEC</b>	<i>Escherichia coli</i> productora de toxina Shiga
<b>subsp.</b>	subespecie
<b>TDA</b>	prueba del triptófano desaminasa en las galerías API 20E
<b>TSA</b>	<i>Tryptone Soya Agar</i> (Agar Soja Triptona)
<b>TSB</b>	<i>Tryptone Soya Broth</i> (Caldo Soja Triptona)
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>ufc</b>	unidades formadoras de colonias
<b>vol.</b>	volumen
<b>VP</b>	prueba de Voges-Proskauer en las galerías API 20E
<b>VRBA</b>	<i>Violet Red Bile Agar</i> (Agar Violeta Rojo Bilis)
<b>VRBGA</b>	<i>Violet Red Bile Glucose Agar</i> (Agar Violeta Rojo Bilis Glucosa)

## GLOSARIO

**a\***: coordenada rojo/verde. Parámetro del sistema del color CIE L\*a\*b\*.

**Ácidos orgánicos**: ácidos débiles con una alta capacidad de disociación lo que les permite entrar dentro de la célula y provocar el descenso del pH debido a los iones formados (Rajkovic *et al.*, 2010).

**Agente etiológico**: todo agente capaz de provocar una enfermedad.

**Análisis sensorial**: evaluación normalizada utilizando los sentidos de determinadas características (aspecto, color, sabor, textura u olor) de los alimentos.

**Antibióticos**: “sustancia química capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis” (Real Academia Española [RAE], 2014).

**Atributos de calidad**: son las cualidades que el consumidor atribuye a un producto, bien porque ya lo ha consumido o porque se ha formado una imagen determinada sobre él (Steenkamp, 1990).

**b\***: coordenada amarillo/azul. Parámetro del sistema del color CIE L\*a\*b\*.

**Biofilm**: formación constituida por un conjunto de bacterias dentro de una matriz polimérica extracelular producida por ellas, que constituye la forma en la que la gran mayoría de bacterias vive en estado natural (Costerton *et al.*, 1978).

**Brote alimentario**: intoxicación de dos o más personas que han enfermado por ingerir una misma fuente alimentaria (Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos [RASFF], 2018).

**c\***: croma o saturación del color. Parámetro del sistema del color CIE L\*a\*b\*.

**Carne**: partes comestibles de los ungulados domésticos, las aves de corral, los lagomorfos y de los animales de caza, incluida la sangre (Reglamento (CE) 853/2004).

**Carne fresca:** “la carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósfera controlada” (Reglamento (CE) 853/2004, p. 16).

**Carne picada:** “la carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1% de sal” (Reglamento (CE) 853/2004, p. 16).

**Color instrumental:** representación objetiva del color en tres ejes elaborada por la Comisión Internacional de Iluminación (Hunt *et al.*, 2012).

**Compuesto antimicrobiano:** sustancia activa de origen sintético o natural que destruye microorganismos, impide su crecimiento o su capacidad para reproducirse en animales o humanos, excluyendo a los antivirales y a los antiparasitarios (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria [EFSA], 2010).

**Criterios microbiológicos:** “criterio que define la aceptabilidad de un producto, un lote de productos alimenticios o un proceso, basándose en la ausencia, presencia o número de microorganismos, y/o en la cantidad de sus toxinas/metabolitos, por unidad de masa, volumen, superficie o lote” (Reglamento (CE) 2073/2005, p. 2).

**Deoximioglobina:** forma de la mioglobina desoxigenada con el grupo hemo reducido. Confiere un tono púrpura a la carne (Hunt *et al.*, 2012).

**Derivados cárnicos:** “productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o despojos de... [bóvidos, ovinos, cápridos, suidos, équidos, camélidos, cetáceos y aves], sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo” (Decreto 2484/1967, p. 16).

**Descontaminación de la carne:** tratamiento que reduce tanto el número de microorganismos patógenos como la carga microbiana total de la superficie de la carne de canales, despojos comestibles o despieces de carne (Moreno García, 2006).

**Enterobacterias:** familia heterogénea de bacilos Gram negativos que no forman esporas, generalmente son anaerobios facultativos. En términos generales, son catalasa positivos y oxidasa negativos, reducen el nitrato a nitrito y son capaces de

fermentar la glucosa y otros azúcares, en algunos casos, con producción de gas (Farmer III *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2017).

**Enterococos:** género que incluye cocos Gram positivos catalasa negativos, anaerobios facultativos con metabolismo homofermentativo capaces de fermentar la glucosa a ácido láctico y de hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares. Suelen agruparse en parejas o formando cadenas cortas (Teixeira *et al.*, 2007).

**Espectrocolorímetro:** instrumento utilizado para medir el color de forma objetiva.

**h\*:** *hue* (en inglés) o matiz del color. Parámetro del sistema del color CIE L\*a\*b\*.

**Metamioglobina:** forma de la mioglobina desoxigenada con el grupo hemo oxidado. Confiere un tono rojo pardo a la carne (Hunt *et al.*, 2012).

**L\*:** luminosidad del color. Parámetro del sistema del color CIE L\*a\*b\*.

**Microorganismos alterantes:** en microbiología alimentaria son los microorganismos que degradan los alimentos, provocando cambios en la textura, color, sabor y olor de estos.

**Microorganismos patógenos:** todos aquellos microorganismos que pueden provocar enfermedades en humanos.

**Mioglobina:** proteína globular formada por una parte proteica o globina y por un anillo hemo que contiene un átomo de hierro en su interior. Es el pigmento típico de la carne (Ordóñez Pereda *et al.*, 1998).

**Oximioglobina:** forma de la mioglobina oxigenada con el grupo hemo reducido. Confiere un tono rojo cereza brillante a la carne (Hunt *et al.*, 2012).

**Preparados de carne:** “la carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca” (Reglamento (CE) 853/2004, p. 16).

**Productos cárnicos:** “los productos transformados resultantes de la transformación de la carne o de la nueva transformación de dichos productos transformados, de modo que la superficie de corte muestre que el producto ha dejado de poseer las características de la carne fresca” (Reglamento (CE) 853/2004, p. 18).

**Resistencia a antibióticos:** “ocurre cuando bacterias, parásitos, virus y hongos se hacen resistentes a los medicamentos antimicrobianos que se utilizan para tratar las infecciones que causan” (Organización Mundial de la Salud [OMS], Organización Mundial de la Propiedad Intelectual [OMPI] y Organización Mundial del Comercio [OMC], 2016, p. 1).

**Resistencia a múltiples fármacos:** “la no susceptibilidad adquirida a al menos un agente de tres o más categorías de antibióticos (uno o más de los cuales se administran en la práctica clínica)” (Magiorakos *et al.*, 2012).

**Señales de calidad o de búsqueda:** es la información que se desprende de un producto y que utilizan los consumidores en el punto de venta para tomar una decisión de compra (Olson y Jacoby, 1972).



**RESUMEN**

---



## RESUMEN

Se realizaron cuatro ensayos diferentes, algunos de los cuales abarcaron varios objetivos de esta Tesis Doctoral.

Las investigaciones descritas en los capítulos I y II tienen por objetivos: determinar si la prevalencia y/o niveles de contaminación con microorganismos patógenos e indicadores de falta de higiene en carne se ajustan a la normativa vigente y si el uso de diferentes tratamientos químicos de descontaminación reduce significativamente los niveles microbianos de la carne, tanto inmediatamente después del tratamiento como a lo largo del almacenamiento en refrigeración; si no modifica los parámetros de color instrumental de la superficie de la carne y las características sensoriales de la carne.

En el capítulo I se describe el estudio realizado con varios descontaminantes sobre carne de vacuno. Se recogieron 13 muestras del cuello de canales de vacuno de un matadero de León destinadas al análisis microbiológico, de pH, análisis sensorial y color instrumental. Estos análisis se realizaron por triplicado tanto el día del tratamiento como los 1, 3 y 6 días posteriores en las muestras control y las tratadas con ácido láctico y fosfato trisódico, y por duplicado en las muestras tratadas con ácido cítrico. Antes de tratar estas piezas, se determinó la higiene general de la carne mediante pruebas para detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. y el recuento de *Staphylococcus aureus*. Después, las muestras se trataron con ácido láctico al 4%, ácido cítrico al 2 o al 4%, fosfato trisódico al 10% o se dejaron sin tratar como control. Una vez tratadas, se determinó la carga de la microbiota aerobia mesófila viable, la microbiota o flora psicrotrofa, *Pseudomonas*, *Pseudomonas* fluorescentes, micrococos, coliformes fecales, enterobacterias, enterococos y bacterias ácido lácticas en la superficie de una pieza de carne de 28 cm<sup>2</sup>. Además, se midió el pH. Mediante un panel de cata se valoró el color, el olor y la aceptabilidad general en una escala del 1 al 9. En la determinación instrumental del color se utilizó un espectrocólorímetro para medir los parámetros del sistema CIE L\*a\*b\* del color. A partir de estos valores se calculó la saturación (c\*) y el matiz (h\*). En términos generales, los tratamientos analizados redujeron la carga microbiana y la mantuvieron más baja respecto de las muestras control, siendo el tratamiento con ácido cítrico al 2% el más eficaz. La carne tratada con fosfato trisódico

mostró una calidad sensorial similar a las muestras sin tratar el día del tratamiento, pero a lo largo del tiempo fue el ácido cítrico al 2% el que obtuvo las puntuaciones más altas. El ácido láctico no mostró una mejora en la calidad sensorial de la carne, ya que produjo zonas anómalas similares a carne cocida. En cuanto al color, las muestras tratadas con ácidos orgánicos mostraron más luminosidad que las no tratadas. En relación al tono rojizo, las muestras tratadas con fosfato trisódico lo mantuvieron a lo largo del tiempo y las tratadas con ácido cítrico presentaron el segundo valor más alto tras las no tratadas.

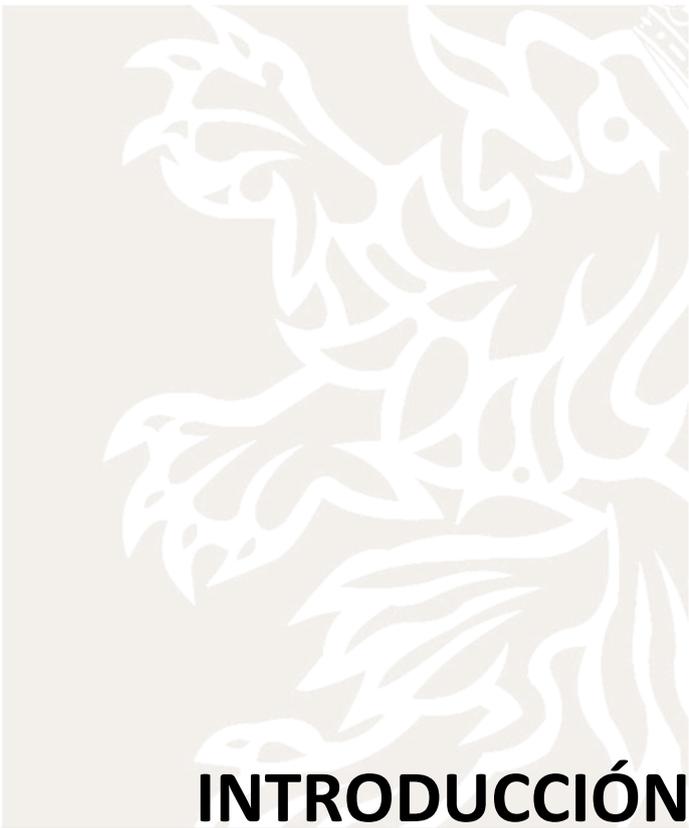
El segundo estudio analizó el efecto del fosfato trisódico (8%), ácido ascórbico (2%) y ácido láctico (2%) sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. Hadar, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (EFRV) en la superficie de paletillas de conejo obtenidas en un hipermercado de León (España). La temperatura de almacenamiento fue de 3 °C. 120 paletillas fueron destinadas al recuento de la microbiota aerobia viable y la medición del pH; y otras 24, al análisis sensorial y a la determinación del color instrumental. Estas últimas no fueron inoculadas, mientras que las demás se sumergieron en una solución con uno de los cuatro microorganismos patógenos o se dejaron sin inocular, y después se sumergieron en la solución de tratamiento o en agua del grifo (control). Finalizado el tratamiento se midió el pH. El recuento de la microbiota aerobia viable (PCA, 30 °C/ 72 h) se realizó sobre una loncha fina de 7 cm<sup>2</sup> de la superficie. El análisis sensorial se hizo mediante una cata hedónica de 6 catadores en una escala de 9 puntos del color, olor y aceptabilidad sensorial. Con un espectrocolorímetro se midió la luminosidad (L\*), la coordenada rojo/verde (a\*) y la amarillo/azul (b\*). Con estos valores se calcularon la saturación (c\*) y el matiz (h\*). Estas determinaciones se llevaron a cabo por triplicado el día del tratamiento y cada día durante 7 días. Los tratamientos analizados no redujeron de forma significativa la microbiota aerobia viable el día del tratamiento, pero sí redujeron los niveles de patógenos inoculados, especialmente el ácido láctico. A medida que transcurrió el tiempo de almacenamiento, los recuentos se mantuvieron más bajos en las muestras tratadas, sobre todo en las muestras tratadas con fosfato trisódico. El ácido láctico provocó manchas claras y oscuras en la superficie de la carne con un blanqueamiento progresivo a lo largo de los días, reduciendo su calidad sensorial. En la cata hedónica el tratamiento con fosfato trisódico obtuvo puntuaciones similares a las de

las muestras no tratadas y, junto con el ácido ascórbico, fue el que mejor mantuvo la calidad sensorial. El parámetro rojo/verde no varió entre tratamientos ni con el tiempo. El parámetro amarillo/azul fue menor en las muestras tratadas con fosfato trisódico y ácido ascórbico, aumentando a lo largo del tiempo en todas las muestras.

La tercera investigación, expuesta en el capítulo III, tiene como objetivo conocer los patrones de resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biofilms de especies de enterobacterias aisladas de preparados de carne roja y aves de corral. Se analizaron un total de 44 muestras de preparados de carne de vacuno, cerdo y ave. Los recuentos medios ( $\log_{10}$  ufc/g) de enterobacterias fueron  $1,99 \pm 0,99$  (preparados de carne de vacuno),  $1,96 \pm 1,44$  (cerdo),  $2,09 \pm 0,92$  (pollo) y  $2,17 \pm 1,06$  (pavo) ( $P > 0,05$ ). Se identificaron 200 cepas de enterobacterias y se distinguieron 13 géneros (21 especies), incluidas especies que producen infecciones. Los géneros más comunes fueron *Escherichia* (32,5% de las cepas), *Serratia* (17,0%), *Hafnia* (12,5%) y *Salmonella* (12,0%). Se analizó la susceptibilidad a 15 antibióticos de las cepas aisladas mediante la técnica de difusión en disco. Un total de 126 cepas (63% de las cepas) fueron multirresistentes (con resistencia a dos o más antibióticos), 46 (23%) fueron resistentes a un antibiótico y 28 (14%) fueron sensibles a todos los antibióticos. El número medio de resistencias por cepa fue de  $2,53 \pm 2,05$ . Se observó un mayor número promedio de resistencias ( $P < 0,05$ ) en las cepas aisladas de pavo ( $3,14 \pm 2,55$ ) que en las cepas aisladas de vacuno ( $2,15 \pm 1,22$ ), cerdo ( $2,16 \pm 1,39$ ) o pollo ( $2,44 \pm 2,22$ ). Al menos el 50% de las cepas mostraron resistencia o susceptibilidad reducida a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima o estreptomina, considerados agentes antimicrobianos de importancia crítica en la medicina humana. Setenta y nueve cepas (39,5%), 60 cepas (30,0%) y 46 cepas (23,0%) fueron productoras de biofilms débiles, moderadas y fuertes (ensayo de cristal violeta), respectivamente. Esta investigación evidencia que las bacterias presentes en los preparados de carne y aves de corral representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

El último estudio, descrito en el capítulo IV, investigó la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biofilm de 200 cepas de enterococos aislados de preparados de carne de vacuno (51 cepas), cerdo (47), pollo (50) y pavo (52) adquiridos en el noroeste de España. Se analizó la susceptibilidad frente a quince antibióticos de importancia clínica mediante el método de difusión en disco. El número medio de

resistencias por cepa fue  $4,48 \pm 1,59$ . Tomando las cepas resistentes junto con las que mostraron una susceptibilidad reducida, el número total de resistencias por cepa fue de  $6,97 \pm 2,02$ . Dos cepas (1,0%) fueron resistentes a un solo antibiótico, 21 cepas (10,5%) presentaron resistencia a dos, una cepa (0,5%) fue resistente a tres y 176 cepas (88,0%) mostraron resistencia múltiple a tres o más categorías de antibióticos. La prevalencia de la resistencia varió entre 0,5% (gentamicina) y 100,0% (kanamicina). Todas las cepas produjeron biofilms en placas de micropocillos de poliestireno, lo cual se determinó mediante el ensayo de cristal violeta. Las cepas se clasificaron como de capacidad débil (51 cepas; densidad óptica promedio a 580 nanómetros ( $DO_{580}$ ) =  $0,206 \pm 0,033$ ), moderada (78 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $0,374 \pm 0,068$ ) o fuerte (71 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $1,167 \pm 0,621$ ) para producir biofilm ( $P < 0,05$ ). Las cepas aisladas de preparados de carne de vacuno produjeron los biofilms más notables ( $P < 0,05$ ). Los resultados de este estudio indican que los preparados de carne y aves de corral son reservorios de cepas de enterococos resistentes a antibióticos capaces de formar biofilm. La manipulación cuidadosa de estos productos alimenticios durante la preparación, evitando la contaminación cruzada y asegurando una cocción completa, es la mejor manera de prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos.



# **INTRODUCCIÓN**

---



# INTRODUCCIÓN

## 1. CARNE: DEFINICIÓN Y TIPOS

### 1.1. CARNE

Se define carne como “las partes comestibles de los ungulados domésticos, las aves de corral, los lagomorfos y de los animales de caza, incluida la sangre”, según el anexo I del Reglamento (CE) nº 853/2004. De acuerdo con este mismo Reglamento, los ungulados domésticos incluyen a las especies bovinas, porcinas, ovinas, caprinas y solípedos domésticos.

### 1.2. DERIVADOS CÁRNICOS

Según el Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español, se denomina derivados cárnicos a “los productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o despojos de... [bóvidos, ovinos, cápridos, suidos, équidos, camélidos, cetáceos y aves] y sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo.” Además, diferencia los diversos tipos de derivados cárnicos en salazones, ahumados y adobados; tocinos; embutidos, charcutería y fiambres; extractos y caldos de carne, y tripas.

El Reglamento (CE) nº 853/2004 establece la distinción entre carne fresca, picada, preparados de carne y productos cárnicos.

### 1.3. CARNE FRESCA

“La carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósfera controlada.”

### 1.4. CARNE PICADA

“La carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1% de sal.”

### 1.5. PREPARADOS DE CARNE

“La carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que ha sido sometida a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca.”

### 1.6. PRODUCTOS CÁRNICOS

“Los productos transformados resultantes de la transformación de la carne o de la nueva transformación de dichos productos transformados, de modo que la superficie de corte muestre que el producto ha dejado de poseer las características de la carne fresca.”

## 2. PRODUCCIÓN, CONSUMO E IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL SECTOR CÁRNICO

### 2.1. EN EL ÁMBITO MUNDIAL

#### 2.1.1. Producción

Aunque la pandemia del COVID-19 ha tenido un impacto negativo (-1,7%) en el sector cárnico, acusando el descenso que ya experimentaba la producción de carne ([Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura \[FAO\], 2020a](#)), durante el año 2021, se produjo un aumento del 4,5% en la producción de carne en el mundo respecto del año anterior, alcanzando las 355,5 millones de toneladas ([FAO, 2022b](#)). El descenso observado años anteriores se debe a la caída en la producción de carne de cerdo ocasionada por la peste porcina africana en países asiáticos y en la producción de carne de vacuno en Estados Unidos y Australia ([FAO, 2020a](#)). A largo plazo, se espera un crecimiento en la producción de carne impulsado por China, Brasil, Australia y Vietnam ([FAO, 2022a](#)).

La producción en 2021 de diferentes tipos de carne referida en miles de toneladas se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Producción de carne a nivel mundial en 2021 ([FAOSTAT](#))

Tipo de carne	Miles de toneladas
<b>Carne (Total)</b>	357.392
<b>Pollo</b>	121.588
<b>Cerdo</b>	120.372
<b>Vacuno</b>	72.446
<b>Pavo</b>	5.792
<b>Conejo</b>	862
<b>Otras</b>	36.332

Según el informe del mercado de la carne elaborado por la FAO ([2022b](#)), en 2021 la producción de carne de vacuno, de ave y de cerdo aumentó un 0,7%, 1,3% y 11,5% respectivamente, comparada con el año anterior. En millones de toneladas, se traduce en 72,5 millones de toneladas de carne de vacuno, 137,8 de carne de ave y 122,5 de carne de cerdo ([FAO, 2022b](#)). El notable aumento en la producción de carne de cerdo es lo que más ha contribuido al incremento en la producción total de carne ([FAO, 2022b](#)). Las zonas del mundo con mayor producción de carne de conejo son Europa meridional y Asia, siendo Europa meridional y la zona mediterránea los principales consumidores. China es el mayor productor de este tipo de carne, gracias a un alto desarrollo y mejoras tecnológicas en este sector ([Jerney et al., 2017](#)), aunque en la actualidad otros países, como Hungría y Argentina, están incrementando la producción de este tipo de carne ([Wu, 2022](#)).

### 2.1.2. Consumo

Se estima que el consumo mundial de carne per cápita fue de 44,9 kilogramos en el año 2021. Lo que supuso un aumento del 3,5% respecto del 2020 (43,4 kg) ([FAO, 2022a](#)).

En la última década, la demanda de carne a nivel mundial ha aumentado debido, en su mayor parte, al crecimiento de la demanda en China ([Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico \[OECD\]-FAO, 2018](#)). En 2031 se prevé un aumento del 15% en el consumo de la carne, aunque no será correlativo al aumento de la

población, puesto que el consumo per cápita se reducirá en algunas regiones ([OECD-FAO, 2022](#)). En países en desarrollo, este aumento será cinco veces mayor que en los países desarrollados debido al aumento de la población y las tasas de crecimiento ([OECD-FAO, 2020](#)).

En cuanto a la demanda de carne de vacuno a largo plazo, se espera que crezca hasta los 76 millones de toneladas en los próximos diez años. También aumentará el consumo de carne de cerdo, hasta las 129 millones de toneladas, sobre todo en países de América latina ([OECD-FAO, 2022](#)). La [OECD junto con la FAO en su informe de perspectivas agrícolas de 2022](#) establece que en la próxima década el consumo de carne de ave alcanzará en 2031 las 154 millones de toneladas. Este tipo de carne experimentará el mayor crecimiento respecto de otras carnes, sobre todo en los países en desarrollo debido a su bajo precio.

### 2.1.3. **Importancia económica**

En 2022 se estima que el comercio mundial de carne y productos cárnicos fue de 42,3 millones de toneladas, lo que supuso un aumento moderado respecto de 2021 (0,5%) en el que fueron 42,1 millones de toneladas ([FAO, 2022a](#)).

Las importaciones de carne en 2021 se redujeron en Asia y Europa, sobre todo en China gracias al aumento de su producción interna. El aumento de importaciones en el resto de continentes compensó esta reducción ([FAO, 2022b](#)). Brasil y Estados Unidos fueron los países que más contribuyeron a las exportaciones de carne con 8,35 y 8,69 miles de toneladas respectivamente ([FAO, 2022b](#)).

Como muestra la tabla 2, el comercio de carne de vacuno en 2021 fue el que más aumentó respecto del año anterior, mientras que en el comercio de carne de cerdo se observa una reducción comparado con el año 2020 ([FAO, 2022b](#)).

Tabla 2. Mercado de la carne a nivel mundial en 2021 ([FAO, 2022b](#))

Tipo de carne	Importaciones		Exportaciones	
	Miles de toneladas	Variación respecto del 2020 (%)	Miles de toneladas	Variación respecto del 2020 (%)
<b>Carne (Total)</b>	40.137	2,2	42.054	0,9
<b>Vacuno</b>	11.529	3,9	12.083	2,8
<b>Cerdo</b>	12.621	-0,4	12.716	-2,1
<b>Carne de ave<sup>(1)</sup></b>	14.561	3,3	15.839	2,2

<sup>(1)</sup> Incluye carne de pollo, pavo y otras aves.

## 2.2. EN LA UNIÓN EUROPEA

### 2.2.1. Producción

Entre 2020 y 2021 la producción total de carne en la Unión Europea aumentó un 0,07% ([FAO, 2022b](#)) (tabla 3). Durante el año 2018 la peste porcina se extendió por el este asiático reduciendo las exportaciones de carne de cerdo desde China. Esta circunstancia provocó un aumento en las exportaciones desde la Unión Europea de este tipo de carne, acompañado de un aumento de precio en el mercado interior ([FAO, 2019a](#), [2020a](#)). Ahora se espera que se produzca una reducción en la producción de vacuno y de carne de cerdo. Aunque la Unión Europea se ha mantenido como el segundo mayor productor del mundo de carne de cerdo, solo por detrás de China ([FAO, 2022a](#), [2022b](#)).

A pesar de que en 2017 se contuvieron los brotes de gripe aviar de alta patogenicidad que habían afectado a la producción de carne de ave, el crecimiento se vio limitado y fue de un 1,2% en 2018 y un 1,6% en 2019, datos que contrastan con el crecimiento del 4% de los 4 años anteriores ([FAO, 2017](#), [2018](#), [2019b](#), [2020b](#)). Durante el año 2020 la producción de carne de ave se redujo un 9,7% y después aumentó un 0,5% en 2021 ([FAO, 2020b](#), [2022b](#)).

**Tabla 3.** Producción de carne en la Unión Europea en 2021 ([FAOSTAT](#))

Tipo de carne	Miles de toneladas
<b>Carne (Total)</b>	44.249
<b>Cerdo</b>	23.615
<b>Pollo</b>	10.764
<b>Vacuno</b>	6.882
<b>Pavo</b>	1.815
<b>Conejo</b>	119
<b>Otras</b>	1.054

### 2.2.2. Consumo

El consumo de carne en la Unión Europea entre 2020 y 2022 fue de 37.937 miles de toneladas con un consumo per cápita de 67,5 kilogramos. El consumo de carne de vacuno, de cerdo y de ave fue respectivamente de 6.637, 18.666 y 11.965 miles de toneladas. Siendo el consumo per cápita de cada uno de ellos de 10,3, 32,4 y 23,4 kilogramos ([Comisión Europea \[EC\], 2022](#)).

En la próxima década, se prevé una reducción del consumo total de carne, puesto que se espera que también descienda el consumo per cápita. Este descenso en el consumo per cápita se explica por una mayor preocupación social ante el bienestar animal y la contaminación, cuestiones de salud y el envejecimiento de la población, ya que la población de edad avanzada consume menos carne ([EC, 2019, 2022](#)).

Respecto al tipo de carne, se espera una disminución en el consumo de carne de cerdo y vacuno, favoreciendo el aumento del consumo de la de ave, la cual es más barata y los consumidores la perciben más saludable ([EC, 2022](#)).

### 2.2.3. Importancia económica

En 2021, se importaron desde la Unión Europea 1.321 miles de toneladas de carne (tabla 4), con una caída del 10,6% respecto del 2020 ([FAO, 2022b](#)). La carne de vacuno sufrió una reducción del 8,8% en las importaciones, hasta los 310 miles de toneladas. De la carne que más se importó fue de la de ave (598 miles de toneladas) a pesar del descenso del 5,7% respecto del año anterior ([FAO, 2022b](#)).

En relación a las exportaciones, estas experimentaron una reducción del 5,5% comparado con el año anterior debido, en parte, a la reducción del 3,5% en las exportaciones de carne de cerdo, como se observa en los datos de la tabla 4. Aunque la Unión Europea sigue siendo el mayor exportador de carne de cerdo del mundo a pesar de esta reducción ([FAO, 2022b](#)). Respecto a la exportación de carne de ave, la Unión Europea se mantiene en el tercer puesto, por detrás de Brasil y Estados Unidos, a pesar de una reducción del 9,4% en estas ([FAO, 2022b](#)).

Tabla 4. Mercado de la carne en la Unión Europea en 2021 ([FAO, 2022b](#))

Tipo de carne	Importaciones		Exportaciones	
	Miles de toneladas	Variación respecto del 2020 (%)	Miles de toneladas	Variación respecto del 2020 (%)
<b>Carne (Total)</b>	1.321	-10,6	8.356	-5,5
<b>Vacuno</b>	310	-8,8	901	-2,4
<b>Cerdo</b>	105	-36,7	5.198	-3,5
<b>Carne de ave<sup>(1)</sup></b>	598	-5,7	2.178	-9,4

<sup>(1)</sup> Incluye carne de pollo, pavo y otras aves.

### 2.3. EN ESPAÑA

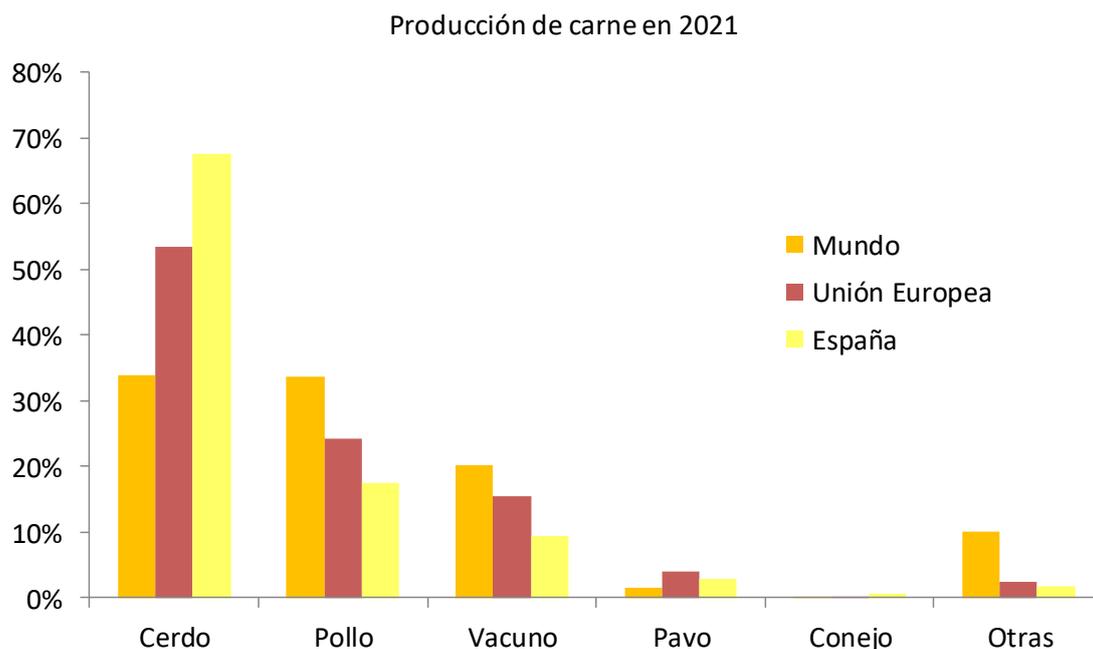
#### 2.3.1. Producción

Tabla 5. Producción de carne en España en 2021 ([FAOSTAT](#))

Tipo de carne	Miles de toneladas
Carne (Total)	7.649
Cerdo	5.180
Pollo	1.331
Vacuno	718
Pavo	225
Conejo	51 (año 2020)

La producción total de carne en España en el 2021 fue de 7.649 miles de toneladas (tabla 5). La mayor producción fue de carne de cerdo con 5.180 miles de toneladas. La producción de carne de pollo fue de 1.331 y la de vacuno de 718 miles de toneladas. De carne de pavo se produjeron 225 miles de toneladas y de la de conejo, 51.

En 2021 se produjeron 5,2 millones de toneladas de carne de cerdo, situando a España como el tercer productor de carne de cerdo en el mundo, por detrás de China y EE.UU. ([Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación \[MAPA\], 2022c](#)). En la figura 1 se observa, tanto en Europa como en España, que en 2021 la carne de cerdo es la que representa la mayor proporción en cuanto a la producción total de carne. Esto también sucede a escala mundial, pero de forma menos acusada.



**Figura 1.** Porcentajes de la producción mundial, europea y española de carne de cerdo, pollo, vacuno, pavo, conejo y otras, en 2021 ([FAOSTAT](#)). Las barras representan el porcentaje de cada tipo de carne producida respecto del total de carne.

En 2021, Francia, España e Italia abarcaron más del 85% de toda la producción europea de carne de conejo a pesar de que en España la producción ha sufrido un fuerte descenso del 7,7% con 47,5 toneladas ([MAPA, 2022a](#)).

### 2.3.2. Consumo

Según el último informe del consumo de alimentos en España, en 2021 ([MAPA, 2022e](#)) el consumo per cápita en alimentación en el hogar fue de 731,89 kilogramos o litros con un gasto medio de 2.425 euros. El gasto en carne supuso un 19,9% del presupuesto asignado a alimentación y bebidas, con un consumo per cápita de 44,7 kilogramos, lo que supuso un 10,3% menos respecto del año anterior.

El consumo per cápita en 2021 de carne fresca, congelada y transformada fue de 31,98, 1,19 y 11,57 kilogramos respectivamente. Respecto del año anterior, el consumo de carne fresca disminuyó un 11,5%, de carne congelada un 6,9% y de carne transformada un 6,5%. Dentro de la carne transformada se incluyen los embutidos, salazones y fiambres ([MAPA, 2022e](#)).

Tabla 6. Consumo de carne fresca en España en 2021 ([MAPA, 2022e](#))

	Carne consumida (%)	kilogramos per cápita
<b>Carne fresca</b>	<b>100</b>	<b>31,98</b>
<b>Carne pollo</b>	37,71	12,06
<b>Carne cerdo</b>	30,14	9,64
<b>Carne vacuno</b>	14,85	4,75
<b>Carne ovino/caprino</b>	3,50	1,12
<b>Carne conejo</b>	2,50	0,80
<b>Resto carnes<sup>(1)</sup></b>	11,32	3,62

<sup>(1)</sup> Incluye otras carnes frescas y despojos.

Respecto del origen de la carne (tabla 6), la carne más consumida fue la de pollo (37,7%) con 12,06 kilogramos por persona en 2021, un 11,6% menos que en 2020. Le siguió la de cerdo (30,1%) con un consumo per cápita de 9,64 kilogramos, lo que supuso un 11,8% menos que el año anterior y la de vacuno (14,8%), cuyo consumo se redujo un 11,2% hasta 4,75 kilogramos por persona. En cuanto a la de conejo, fueron 0,80 kilogramos per cápita, un 14% menos interanual ([MAPA, 2022e](#)).

### 2.3.3. Importancia económica

En 2019, la industria de la alimentación supuso un 16,3% de la facturación total de la industria situándola a la cabeza respecto del resto de industrias ([Instituto Nacional de Estadística \[INE\], 2022](#)).

Como se observa en la tabla 7, se importaron 207 miles de toneladas de carne de vacuno en 2021 ([MAPA, 2022d](#)) y 349 miles de toneladas de carne porcina, de las cuales, la mayoría se importaron desde la Unión Europea ([MAPA, 2022c](#)). En relación a la carne de ave, se alcanzaron las 222 miles de toneladas ([MAPA, 2022b](#)) y el sector cunícola importó 1.575 toneladas de carne, un 8,2% más respecto del año anterior ([MAPA, 2022a](#)).

En 2021, las exportaciones del sector cárnico alcanzaron los 9.708 millones de euros ([MAPA, 2023](#)). En relación a la carne de vacuno, se exportaron 344 miles de toneladas, un 1,1% más que el año anterior ([MAPA, 2022d](#)). España es uno de los principales exportadores de la Unión Europea de carne porcina, con una estimación de 3,09 millones de toneladas. China y Francia fueron los destinos principales de este tipo de carne dado que importaron 1.209 y 293 miles de toneladas respectivamente ([MAPA, 2022c](#)). En cuanto a la carne de ave, se exportaron 285 miles de toneladas ([MAPA, 2022b](#)) y de carne de conejo se alcanzaron las 9.644 toneladas ([MAPA, 2022a](#)).

**Tabla 7.** Comercio exterior de carne en España en 2021 ([MAPA, 2022a](#), [2022b](#), [2022c](#), [2022d](#))

		Vacuno	Cerdo	Ave	Conejo
<b>Importaciones (toneladas)</b>	<b>UE</b>	193.114	346.963	198.472	1.575
	<b>Países terceros</b>	13.799	2.162	24.389	0,01
	<b>Total</b>	<b>206.913</b>	<b>349.125</b>	<b>222.861</b>	<b>1.575</b>
	<b>Variación respecto del año anterior (%)</b>	5,1	12,3	1,0	8,2
<b>Exportaciones (toneladas)</b>	<b>UE</b>	235.677	1.215.897	180.713	8.830
	<b>Países terceros</b>	108.297	1.875.369	103.956	814
	<b>Total</b>	<b>343.974</b>	<b>3.091.266</b>	<b>284.669</b>	<b>9.644</b>
	<b>Variación respecto del año anterior (%)</b>	1,1	3,5	16,7	37,8

## 2.4. EN CASTILLA Y LEÓN

### 2.4.1. Producción

En 2021 el número de explotaciones mixtas y destinadas a ganado para carne de vacuno eran 12.397, con una producción de carne de 111,3 miles de toneladas. La producción aumentó un 0,45% respecto del año anterior, siendo Castilla y León la segunda comunidad de España con la mayor producción de este tipo de carne con un 15,5% del total ([MAPA, 2022d](#)). En 2021 se cuenta con 8.540 explotaciones de ganado porcino, esta cifra representa el 9,8% del total de explotaciones de España, situando a Castilla y León como la cuarta en España con más explotaciones, por detrás de Galicia, Extremadura y

Andalucía. En cuanto a la producción de carne de cerdo en 2021, se produjeron 631 toneladas, siendo la tercera después de Cataluña y Aragón con un 12,2% ([MAPA, 2022c](#)). El número de granjas de producción en estado de alta en enero de 2022 destinadas a carne de ave eran 451. La producción total de este tipo de carne fueron 130.191 toneladas en 2021, un 9,8% del total de la producción en España ([MAPA, 2022b](#)). En cuanto al sector cunícola, la producción de carne fue de 11.297 toneladas en 2021. Esta cantidad representó el 21,3% de la producción española, situándola a la cabeza de España ([MAPA, 2022a](#)).

### 2.4.2. Consumo

En Castilla y León el consumo per cápita en alimentación se situó por encima de la media nacional con 651 kilogramos o litros y un gasto medio de 1.653 euros en 2021 ([MAPA, 2022e](#)). En esta comunidad se consumieron 52,22 kilogramos per cápita de carne fresca, cifra que se encuentra por encima de la media nacional y la sitúa a la cabeza de España. Según el tipo de carne, fue la primera en España en consumo per cápita de carne de cerdo (12,9 kg), la segunda con el mayor consumo de carne de vacuno (6,8 kg), la novena en el consumo de carne conejo (1,0 kg) y la octava en el consumo de carne de pollo (13,0 kg) ([MAPA, 2022e](#)).

## 3. BROTES ALIMENTARIOS TRANSMITIDOS POR LA CARNE Y SUS DERIVADOS

Según el informe anual de 2020 de la RASFF ([2021](#)), la presencia de microorganismos patógenos fue el mayor riesgo asociado al consumo de carne y productos derivados. Los patógenos de los que se recibieron más notificaciones fueron *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*.

### 3.1. EN EL ÁMBITO MUNDIAL

A nivel mundial, estimar el número de brotes alimentarios no es fácil, debido a la heterogeneidad en el tipo de alimentación, agentes etiológicos, clima y los sistemas de vigilancia y control de enfermedades transmitidas por alimentos de cada región del mundo. Además, no todos los países aportan suficientes datos para realizar estimaciones precisas ([OMS, 2015b](#)).

En 2015, la Organización Mundial de la Salud realizó una estimación sobre la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria. Este informe refleja que el número de casos de infecciones alimentarias en 2010 fue alrededor de 600 millones. Dentro de estos casos, la mayoría fueron enfermedades diarreicas con cerca de 550 millones de casos que provocaron 230 mil muertes. Los agentes etiológicos de enfermedades diarreicas que provocaron más casos fueron norovirus (125 millones de casos) y *Campylobacter* spp. (96 millones de casos). Este último, junto con otras bacterias, ocasionaron 350 millones de casos con 187 mil fallecidos. Dentro de estas bacterias destacaron *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* productora de toxina Shiga, *Salmonella enterica* no tifoidea, *Shigella* spp. y *Vibrio cholerae*. Aunque hubo diferencias entre regiones según el nivel de ingresos, ya que, en aquellas con ingresos bajos, *Escherichia coli* enteropatógena, *Escherichia coli* enterotoxigénica y *Vibrio cholerae* fueron los principales agentes de enfermedades diarreicas; mientras que, en aquellas con ingresos altos, el agente principal fue *Campylobacter* spp. Las regiones en las que se observó una mayor carga poblacional con enfermedades transmitidas por alimentos fueron África, Asia Sudoriental y el Mediterráneo Oriental ([OMS, 2015b](#)).

La Red de Alerta Rápida de Alimentos y Piensos recibió 3.862 notificaciones sobre riesgos alimentarios en 2020, de las cuales el 37% se clasificó como alerta ([RASFF, 2021](#)). Según la información aportada a esta red, fuera de la Unión Europea el mayor riesgo asociado a carne de ave y derivados fue *Salmonella*. Dentro de la categoría de carne, las notificaciones más recurrentes fueron para carne de pollo de Polonia (273).

### 3.2. EN LA UNIÓN EUROPEA

Según el informe de 2021 de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades ([EFSA-ECDC, 2022](#)), el 57% de los brotes alimentarios tuvo su origen en alimentos de origen animal. La carne y sus derivados provocaron 77 brotes, lo que representa un 21,7% del total (355). Los factores que contribuyeron a los distintos brotes alimentarios fueron: la contaminación cruzada, los ingredientes contaminados sin procesar, los manipuladores infectados, las incidencias

en la temperatura y tiempo de almacenamiento, los tratamientos de calor o enfriamiento insuficientes y el agua potable contaminada ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

Dentro de la Unión Europea en 2021 ([RASFF, 2021](#)), el mayor riesgo asociado a la carne y sus productos derivados fue la presencia de microorganismos patógenos.

En la carne y derivados, los agentes causales de los brotes alimentarios en 2021 fueron *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, STEC (*Escherichia coli* productora de toxina Shiga), *Yersinia*, toxinas de *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y otras toxinas bacterianas inespecíficas ([EFSA-ECDC, 2022](#)). Respecto de las notificaciones realizadas a la RASFF ([2021](#)), dentro de los agentes etiológicos asociados a carne distinta de ave y derivados, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* patógena fueron los principales. En relación a la carne de ave y derivados, los avisos fueron relativos a *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*.

### Salmonella

En 2021 se confirmaron 60.050 casos de salmonelosis en humanos. Es la segunda zoonosis más habitual en la Unión Europea tras los casos producidos por *Campylobacter*. El número de casos relacionados con brotes alimentarios aumentó un 14,3% en el intervalo anual, con una mayor incidencia durante los meses de verano. Un 19,6% de las personas infectadas requirieron de hospitalización con un 0,11% de mortalidad ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

En 2021, la carne de cerdo provocó un 3,9% de todos los brotes seguido de la carne de pollo y derivados que ocasionaron un 2,8% después de los huevos y derivados, comidas mixtas y productos de panadería ([EFSA-ECDC, 2022](#)). De hecho, dentro de las notificaciones más habituales realizadas ante el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos en 2020 ([RASFF, 2021](#)), la presencia de *Salmonella* en carne de ave y productos derivados fue la notificación más habitual entre los alimentos de origen animal. Los productos alimentarios con más presencia de *Salmonella* fueron la carne separada mecánicamente y la carne de ave en distintas preparaciones ([EFSA-ECDC, 2022](#)). Respecto de la carne fresca, se detectó esta bacteria en el 4,4% de carne de pollo, en un 3,5% de

carne de pavo, en carne de cerdo en el 1,5% de las muestras y en carne bovina en un 0,3% ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

En la tabla 8 se muestran los serotipos de *Salmonella* más frecuentes. La suma de los casos provocados por los tres serotipos más habituales (*Salmonella enterica* Enteritidis, *S. enterica* Typhimurium y *S. enterica* Typhimurium monofásica) alcanza el 79% de todos los casos analizados ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

**Tabla 8.** Serotipos más frecuentes de casos confirmados de *Salmonella* en la UE en 2021 ([EFSA-ECDC, 2022](#))

Serotipos	Casos	%
Enteritidis	23.634	64,6
Typhimurium	4.027	11,0
Typhimurium monofásica	1.269	3,5
Infantis	633	1,7
Derby	239	0,6
Otros	6.777	18,6
<b>Total</b>	<b>36.579</b>	<b>100</b>

El origen animal de los cinco serotipos principales aislados de casos humanos de salmonelosis en 2021 se detalla a continuación ([EFSA-ECDC, 2022](#)) y la caracterización de serotipos (son de origen animal) en los aislamientos procedentes de carne de animales de abasto y animales vivos estudiados, en la tabla 9.

- *S. enterica* Enteritidis: se detectó principalmente en pollos y gallinas ponedoras.
- *S. enterica* Typhimurium: se aisló, sobre todo, en pollo, cerdos y gallinas ponedoras.
- *S. enterica* Typhimurium monofásica (1,4,[5],12:i:-): la carne de cerdo fue la fuente principal y la segunda, el pollo.
- *S. enterica* Infantis: las aves, sobre todo el pollo y su carne, son los principales reservorios animales de este serotipo.

- *S. enterica* Derby: donde más se aisló fue en cerdos y, en menor medida, se encontró en pavos.

**Tabla 9.** Serotipos de *Salmonella* aislados de carne de animales de abasto y animales vivos en la UE en 2021 ([EFSA-ECDC, 2022](#))

Serotipos	Origen (%)			
	Vacuno y su carne	Porcino y su carne	Pollo y su carne	Pavo y su carne
Enteritidis	Sin datos	Sin datos	<b>70,0</b>	Sin datos
Typhimurium	Sin datos	29,7	<b>43,2</b>	9,1
Typhimurium monofásica	Sin datos	<b>65,4</b>	21,2	Sin datos
Infantis	Sin datos	Sin datos	<b>95,2</b>	Sin datos
Derby	0,0	<b>75,3</b>	Sin datos	13,5

El origen se refiere no solo a la carne sino también al ganado en vivo. Las cifras destacadas representan el mayor porcentaje de cada serotipo.

### Listeria monocytogenes

En 2021, los brotes de listeriosis en humanos fueron 23, un 14% más que el año anterior, adquiridos en su mayoría (67,9%) dentro de la Unión Europea. Entre 2017 y 2021 no se ha observado una variación en el número de casos. Esta zoonosis provoca un alto número de hospitalizaciones, un 46,1% de los casos confirmados, y una mortalidad del 11,5% de los casos con resultado conocido, mostrando una tendencia al alza desde 2008 ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

Debido a que esta bacteria se destruye durante la cocción del alimento y que los criterios microbiológicos para ella, recogidos en el Reglamento (CE) nº 2073/2005, se refieren a alimentos listos para el consumo, su presencia en alimentos crudos no siempre es declarada. Durante 2021, en muestras estudiadas en la Unión Europea los mayores porcentajes de *Listeria monocytogenes* aislada de alimentos listos para consumir fueron los siguientes: en el 3,5-5,4% de pescado y productos de la pesca, en el 2,7-3,9% de productos de carne de vacuno o cerdo, en el 2,5% de frutas y hortalizas y en el 4,6% de

quesos duros de leche de oveja sin pasteurizar o tratada a baja temperatura. En relación al origen de la carne, en los productos de carne de cerdo se halló este patógeno en el 2,7% de las muestras, en los de carne de ave en un 1,3% y en los de carne de vacuno en un 3,9% ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

#### *Escherichia coli* productora de toxina Shiga

Los casos confirmados de infecciones con STEC alcanzaron los 6.084 en 2021, la mayoría (71,6%), adquiridas dentro de la Unión Europea. Entre 2017 y 2021 no se observa ninguna tendencia creciente ni decreciente en el número de infecciones con este microorganismo. Al igual que enfermedades provocadas por otras bacterias, la aparición de los casos presenta picos estacionales que coinciden con los meses de verano. Un 14,8% de los casos conocidos requirió de hospitalización con un índice de mortalidad de 0,3% en el caso de las infecciones notificadas ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

En la siguiente tabla (tabla 10) se muestra el porcentaje de cada serotipo de STEC que fueron detectados en algunos brotes de origen alimentario. El serotipo O26 fue asociado al 34,0% de los casos con síndrome hemolítico urémico seguido del serotipo O157 (19,6%). A pesar de que el serotipo O157 es el primero de la lista, su porcentaje respecto del resto de serotipos está disminuyendo, especialmente frente al O26, cuyo porcentaje lleva aumentando desde 2014 ([EFSA-ECDC, 2019, 2022](#)).

**Tabla 10.** Serotipos más frecuentes de brotes confirmados de STEC en la UE en 2021 ([EFSA-ECDC, 2022](#))

Serotipos	Casos	%
<b>O157</b>	9	37,5
<b>O26</b>	6	25,0
<b>O103</b>	5	20,8
<b>O12</b>	1	4,2
<b>O91</b>	1	4,2
<b>O145</b>	1	4,2
<b>O146</b>	1	4,2
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>100</b>

En el año 2021, en un 1,5% de las muestras de alimentos analizadas se encontró STEC, la mayoría en productos de panadería, queso y carne y productos de vacuno. Dentro de la carne y los productos derivados, se aisló STEC en un 2,3%. En carne bovina fresca se detectó STEC en un 5,7% de las muestras; en carne fresca de cerdo, en un 16,6%, y en otro tipo de carne, en un 7,9% ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

### Campylobacter

El número de casos en humanos de campilobacteriosis durante el 2021 fue 127.840, un 2,1% más que el año anterior ([EFSA-ECDC, 2022](#)). De los 249 brotes notificados, 7 de ellos tuvieron su origen en la ingesta de carne de pollo y 3 en carne bovina y derivados. La carne y la leche son las dos fuentes principales de esta bacteria ([EFSA-ECDC, 2022](#)). Dentro de los casos confirmados, *Campylobacter jejuni* fue la especie que provocó más casos (88,4%) seguida de *Campylobacter coli* (10,1%), *C. fetus* (0,18%), *C. upsaliensis* (0,12%) y *C. lari* (0,09%) ([EFSA-ECDC, 2022](#)). En la tabla 11 se detallan los porcentajes en carne fresca, según su especie de procedencia, con presencia de *Campylobacter*. Se observa que la carne fresca de pavo fue la mayor fuente de esta bacteria ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

**Tabla 11.** Presencia de *Campylobacter* en carne fresca y derivados de distinto origen animal en la UE en 2021 ([EFSA-ECDC, 2022](#))

<b>Tipos de carne</b>	<b>Presencia de <i>Campylobacter</i> en carne fresca (%)</b>
<b>Pavo</b>	12,9
<b>Pollo</b>	11,5
<b>Cerdo</b>	2,5
<b>Vacuno</b>	0,5

### Yersinia

La yersiniosis fue la zoonosis con más avisos en la Unión Europea con 21 brotes en 2021 que generaron 125 casos confirmados. De estos casos, un 11,2 requirió hospitalización ([EFSA-ECDC, 2022](#)). La especie más común aislada en humanos en 2021 fue *Yersinia enterocolitica*. Apenas hay datos sobre los brotes ocasionados por esta bacteria ya que no existen protocolos normalizados entre países ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

### 3.3. EN ESPAÑA

En 2020, el sistema de alerta RASFF ([2021](#)) recibió 193 notificaciones procedentes de España, un 30,8% menos que el año anterior. A pesar de que en el año 2020 el turismo en España se redujo casi al mínimo debido a la pandemia del COVID 19, España fue en 2019 el segundo destino más visitado del mundo, después de Francia, con 83,7 millones de turistas. Los turistas extranjeros dejaron ese año 92.278 millones de euros, un aumento del 2,8% respecto del año anterior ([INE, 2020](#)). La importancia de este sector implica que los brotes debidos al consumo de alimentos contaminados se deban tener muy en cuenta.

### Salmonella

El número de casos confirmados en 2020 fue 4.950, un 56,7% menos respecto del año anterior, esta reducción se observa en los dos últimos años ([Ministerio de Ciencia e Innovación \[MCI\], 2022b](#)). En 2018 se detectó la presencia de *Salmonella* Typhimurium en fuet producido en España, lo cual fue objeto de una alerta alimentaria en la red de alerta europea ([RASFF, 2019](#)).

### Listeria

En 2018 España se confirmaron 432 casos de listeriosis, un 30,8% más que el año anterior ([Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades \[MCIU\], 2019](#)). La tendencia se muestra al alza desde el año 2014, pero el aumento se debe a una mejora del sistema de vigilancia epidemiológico ([EFSA-ECDC, 2019](#)). En agosto de 2019 se declaró la alerta sanitaria debido a un brote de *Listeria monocytogenes* asociado a carne mechada producida en Andalucía. Provocó una gran alarma social con más de 200 casos, 6 abortos y 3 muertos. Además, afectó a turistas extranjeros ([Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social \[MSCBS\], 2019](#)).

### Escherichia coli productora de toxina Shiga

Desde 2014 se observa un aumento en el número de casos de STEC ([EFSA-ECDC, 2019](#)), siendo 136 los casos confirmados en 2020 ([MCI, 2023](#)). Un 30,9% de los casos requirió hospitalización con 3 casos de síndrome hemolítico urémico y una persona fallecida ([MCI, 2023](#)).

### Campylobacter

En 2021, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica ([MCI, 2022a](#)) notificó 11.670 casos de campilobacteriosis. De las especies aisladas, *Campylobacter jejuni* fue la más abundante con 6.114 aislamientos, seguida de *C. coli* (797).

En Europa, durante 2021, un 28,1% de los casos de campilobacteriosis asociados a estancias en otros países se produjeron en España. Lo que supuso el país con más casos de este tipo (882) ([EFSA-ECDC, 2022](#)).

### Yersinia

Los casos confirmados de yersiniosis en 2021 fueron 444 ([EFSA-ECDC, 2022](#)), un 14,9 menos que en 2020 (510 casos) y un brote confirmado en España ([MCI, 2022c](#)).

## 3.4. EN CASTILLA Y LEÓN

En 2021, los brotes epidémicos relacionados con agua y alimentos representaron un 57,1% (24 brotes) del total de brotes, siendo 1 de origen hídrico. Estos brotes ocasionaron 211 casos, con 26 hospitalizados (54,9%) sin fallecidos. Entre los meses de junio y septiembre se notificaron 13 brotes, la mayoría de los brotes de todo el año con un 54,2%. Las provincias con más brotes fueron Ávila (7), Burgos (4) y León (4) como se muestra en la tabla 12 ([Consejería de Sanidad, 2022](#)).

Tabla 12. Brotes de origen alimentario en Castilla y León en 2021 ([Consejería de Sanidad, 2022](#))

Provincia	Nº brotes	Nº casos	Hospitalizados	
			Nº	%
Ávila	7	23	2	8,7
Burgos	4	27	4	14,8
León	4	16	4	25,0
Palencia	3	60	2	3,3
Salamanca	1	39	1	2,6
Segovia	0	0	0	0,0
Soria	2	17	8	47,1
Valladolid	1	19	0	0,0
Zamora	2	10	5	50,0
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>211</b>	<b>26</b>	<b>12,3</b>

Entre los alimentos implicados, el huevo o productos derivados provocaron el 20,8% de los brotes alimentarios, mientras que la carne estuvo implicada en seis brotes. De los microorganismos aislados, *Salmonella* provocó 9 de los brotes (37,5%), afectando a 46 personas y provocando un alto número de personas hospitalizadas (21; 45,7%). El 66,7% (6 brotes) correspondió a *Salmonella* Enteritidis; el 22,2% (2), a *Salmonella* Typhimurium, y el 11,1% restante (1), a *Salmonella* spp. ([Consejería de Sanidad, 2022](#)).

En 7 brotes con 55 casos, dentro de los cuales 1 requirió de hospitalización, el agente fue desconocido. Los brotes restantes correspondieron a *Campylobacter jejuni* (3 brotes; 43 afectados), *Staphylococcus*/enterobacterias (1; 46), *Clostridium perfringens* (1; 9), *Streptococcus* (1; 7), *Shigella flexneri* (1; 3), y *Cryptosporidium* spp. (1; 2). De estos brotes, 12 casos precisaron hospitalización ([Consejería de Sanidad, 2022](#)).

La carne estuvo implicada en 6 brotes, lo que supuso un 25% del total de brotes alimentarios, con 35 casos y tres personas hospitalizadas ([Consejería de Sanidad, 2022](#)).

#### 4. SEGURIDAD Y CALIDAD DE LA CARNE

Para que la carne sea considerada de calidad, no solo es necesario que se adecúe a la legislación vigente, sino que también sea aceptable para el consumidor. Desde el punto de vista normativo, el objetivo primordial es evitar los riesgos sanitarios derivados de malas prácticas higiénicas y de manipulación. Aun así, un producto puede cumplir todos los requisitos higiénico-sanitarios pero ser rechazado por los consumidores. Por tanto, la seguridad y la calidad esperada deben conjugarse a la hora de poner carne a la venta.

##### 4.1. LÍMITES MICROBIOLÓGICOS PERMITIDOS POR LEGISLACIÓN

A pesar de que los consumidores europeos perciben la carne europea como segura ([Verbeke et al., 2010a](#)), la presencia de microorganismos patógenos en este alimento supone un grave peligro sanitario ([RASFF, 2021](#)). Esto hace necesario la toma de medidas higiénico-sanitarias para evitar brotes alimentarios en la población.

En relación a la carne fresca y los productos cárnicos, existe legislación vigente que regula estas medidas, como el Reglamento (CE) nº 853/2004, de 29 de abril, en el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal o el Reglamento de Ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión, de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) nº 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales.

Los criterios microbiológicos que determinan los límites permitidos de microorganismos patógenos y sus toxinas en determinados alimentos se recogen en el Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión. Los criterios microbiológicos relativos a la carne y derivados se especifican en las siguientes tablas (tabla 13 y tabla 14).

Tabla 13. Reglamento 2073/2005 (R (CE) 2073/2005, de 15 de noviembre).

## Capítulo 1. Criterios de seguridad alimentaria

Categoría de alimentos	Microorganismo	Número de unidades de la muestra	Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100 ufc/g <sup>(1)</sup>	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
		5	No detectado en 25 g <sup>(2)</sup>	EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales <sup>(3)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
Carne picada y preparados de carne destinados a ser consumidos crudos	<i>Salmonella</i>	5	No detectado en 25 g	EN ISO 6579-1	Productos comercializados durante su vida útil
Carne picada y preparados de carne a base de carne de aves de corral destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	No detectado en 25 g	EN ISO 6579-1	Productos comercializados durante su vida útil
Carne picada y preparados de carne a base de especies distintas a las aves de corral destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	No detectado en 10 g	EN ISO 6579-1	Productos comercializados durante su vida útil
Productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo de salmonela	<i>Salmonella</i>	5	No detectado en 25 g	EN ISO 6579-1	Productos comercializados durante su vida útil
Productos cárnicos hechos a base de carne de aves de corral, destinados a ser consumidos cocinados	<i>Salmonella</i>	5	No detectado en 25 g	EN ISO 6579-1	Productos comercializados durante su vida útil

<sup>(1)</sup> Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

<sup>(2)</sup> Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando éste no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

<sup>(3)</sup> Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con  $\text{pH} \leq 4,4$  o  $a_w \leq 0,92$ , productos con  $\text{pH} \leq 5,0$  y  $a_w \leq 0,94$ , y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.

Tabla 14. Reglamento 2073/2005 (DOUE, 2015).  
Capítulo 2. Criterios de higiene de los procesos. Carne y productos derivados

Categoría de alimentos	Microorganismo	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		(n) Nº unidades muestra	(c) Nº unidades con valores entre m y M	(m) mínimo	(M) máximo			
Canales bovinas, ovinas caprinas y equinas	Recuento de colonias aerobias			3,5 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	ISO 4833	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
	Enterobacteriaceae			1,5 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	2,5 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	ISO 21528-2	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
Canales porcinos	Recuento de colonias aerobias			4,0 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	ISO 4833	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
	Enterobacteriaceae			2,0 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	3,0 log ufc/cm <sup>2</sup> media logarítmica diaria	ISO 21528-2	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso
Canales bovinas, ovinas caprinas y equinas	<i>Salmonella</i>	50 (10 sesiones consecutivas de muestreo)	2 (cuando se detecta salmonela)	No detectado en la zona examinada por canal		EN ISO 6579-1	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio, revisión de los controles del proceso y del origen de los animales
	<i>Salmonella</i>	50 (10 sesiones consecutivas de muestreo)	5 (cuando se detecta salmonela)	No detectado en la zona examinada por canal		EN ISO 6579-1	Canales después de su faenado pero antes del enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen

Categoría de alimentos	Microorganismo	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio	Acción en caso de resultados insatisfactorios
		(n) Nº unidades muestra	(c) Nº unidades con valores entre m y M	(m) mínimo	(M) máximo			
Canales de pollos de carne y pavos	<i>Salmonella</i>	50 (10 sesiones consecutivas de muestreo)	7 (cuando se detecta salmonela)	No detectado en 25 g de una muestra conjunta de piel del cuello		EN/ISO 6579	Canales tras el enfriamiento	Mejoras en la higiene del sacrificio y revisión de los controles del proceso, del origen de los animales y de las medidas de bioseguridad en las explotaciones de origen
Carne picada	Recuento de colonias aerobias (criterio no aplicado para venta al por menor, cuando la vida útil es menor a 24 horas)	5	2	5x10 <sup>5</sup> ufc/g	5x10 <sup>6</sup> ufc/g	ISO 4833	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
	<i>Escherichia coli</i> (indicador de contaminación fecal)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas
	<i>Escherichia coli</i> (indicador de contaminación fecal)	5	2	500 ufc/g o cm <sup>2</sup>	5 000 ufc/g o cm <sup>2</sup>	ISO 16649-1 o 2	Final del proceso de fabricación	Mejoras en la higiene de la producción y mejoras en la selección y/o el origen de las materias primas

## 4.2. CALIDAD DE LA CARNE

Una vez alcanzados los requisitos higiénico-sanitarios de la carne, es el turno de determinar las cualidades que los consumidores valoran durante la elección de una carne u otra. Sin embargo, no todos los consumidores le dan la misma importancia a esas cualidades o atributos, complicando su evaluación objetiva ([Henchion et al., 2014](#)). La diversidad de opiniones se debe a factores socioeconómicos, edad o género, y otros como la frecuencia de consumo de un producto ([Bernabéu et al., 2018](#)). Aparte de que las características de un alimento ni tienen la misma importancia para los consumidores ni aportan la misma información. El modelo de la calidad de Steenkamp ([1990](#)) distingue las señales de calidad o de búsqueda, de los atributos de calidad.

### 4.2.1. Señales de calidad o de búsqueda

Es la información que se desprende de un producto y que utilizan los consumidores en el punto de venta para tomar una decisión de compra. Olson y Jacoby ([1972](#)) las dividen en intrínsecas y extrínsecas.

#### Señales intrínsecas

Son las que se infieren a través de las características inherentes al producto, que son las propias de su aspecto físico. Entre las características intrínsecas de la carne de vacuno más importantes para los consumidores están la cantidad de grasa visible e intermuscular, seguidos del color de la carne y de la grasa. En relación a la cantidad de grasa, los consumidores prefieren carne con poca grasa tanto visible como intermuscular ([Ngapo et al., 2017](#)), aunque esto pueda provocarles insatisfacción cuando la consumen ([Realini et al., 2014](#)). Respecto de la carne de cerdo, el color y la grasa visible también son las características con más peso para los consumidores, mientras que la cantidad de grasa intermuscular y el goteo tienen menos importancia. Al igual que para la carne de vacuno se prefiere la carne con poca grasa visible porque es más saludable, aunque suponga una pérdida en calidad sensorial ([Grunert et al., 2015](#); [Ngapo et al., 2018](#)).

### Señales extrínsecas

Las señales extrínsecas son las que se perciben asociadas al producto, aunque no sean propias de él. En el caso de la carne, suele ser la información contenida en la etiqueta: fecha de consumo, indicadores de calidad (tales como marcas o logos de reconocimiento de calidad), origen, alimentación del animal, producción y procesado. También se incluyen el lugar de compra y el tipo de envasado.

La etiqueta del envase contribuye a que el consumidor forme sus propios atributos de credibilidad, aunque la percepción subjetiva sobre el producto dependa del nivel de conocimiento que el consumidor tenga sobre las denominaciones impresas en ella ([Samant et al., 2016](#)). Entre la diversa información contenida en la etiqueta, la marca es una de las señales de calidad que más tienen en cuenta los consumidores en el punto de venta ([Banović et al., 2009](#)).

Algunas etiquetas poseen un reconocimiento de la calidad que determina la aceptabilidad de la carne y lo que un consumidor está dispuesto a pagar por ella ([Meyerding et al., 2018](#)). Esta característica, en carne de vacuno, es la que tiene más importancia después del origen y del precio ([Henchion et al., 2017](#)). De hecho, los consumidores están dispuestos a pagar más por una carne con etiqueta de calidad que sin ella ([Meyerding et al., 2018](#)).

#### 4.2.2. **Atributos de calidad**

Son las cualidades que el consumidor atribuye a un producto, bien porque ya lo ha consumido o porque se ha formado una imagen determinada sobre él. Estos atributos se dividen a su vez en las propiedades de experiencia y de credibilidad ([Steenkamp, 1990](#)).

#### Propiedades de experiencia

Son las que forman parte de la opinión del consumidor después del consumo del alimento. Esta experiencia condicionará la decisión sobre una futura compra del mismo producto ([Banović et al., 2009](#)) y en carne se asocia con el sabor, olor, ternura y jugosidad ([Henchion et al., 2014](#); [Troy y Kerry, 2010](#)). En relación a la ternura de la carne en vacuno, existen diferencias según el tipo de consumidor. Por género, las mujeres tienen más en cuenta la calidad general de la carne, mientras que los hombres se centran más en la

garantía de la ternera. En cuanto a la edad, los consumidores más jóvenes no tienen tanto en cuenta la calidad sensorial ([Verbeke et al., 2010b](#)). Además, el tipo de cocinado y las preferencias culturales y personales también difieren entre los consumidores, lo que complica determinar una ternera ideal ([Verbeke et al., 2010b](#)).

### Propiedades de credibilidad

Estas características reflejan cualidades del producto que el consumidor no puede evaluar ni confirmar después del consumo, tales como los beneficios que tiene para la salud o el bienestar de los animales de los que proviene. Los atributos de credibilidad están cobrando mayor importancia y son un factor que modifica la percepción que los consumidores tienen sobre la calidad de la carne ([Regan et al., 2018](#)). [Fernqvist y Ekelund \(2014\)](#) dividieron las características de credibilidad en siete categorías principales:

- Salud: es la percepción que tienen los consumidores sobre los productos saludables y difiere según la edad y el género ([Fernqvist y Ekelund, 2014](#)).
- Comida orgánica: esta categoría incluye aspectos relacionados con la salud y aspectos éticos. Este tipo de productos se indican mediante reclamos en la etiqueta de productos naturales o ecológicos. Como sería, por ejemplo, el sello para alimentos orgánicos de la Unión Europea ([Reglamento \(UE\) 271/2010](#)) (figura 2) o los sellos oficiales de las distintas comunidades autónomas que certifican la producción ecológica (figura 3). Esta característica es más valorada por los consumidores que otras como las etiquetas de bienestar en carne de vacuno ([Meyerding et al., 2018](#)). Las razones para comprar carne orgánica (ecológica) son la percepción de que es más segura, más sana, una producción respetuosa con el medioambiente y tiene mejores estándares de bienestar animal ([Van Loo et al., 2010](#)).
- Origen: El origen es una característica que influye mucho en los consumidores. En la mayoría de estudios, los consumidores prefieren la carne de origen local, ya que se percibe como de más calidad y confianza ([Bernabéu et al., 2018](#); [Meyerding et al., 2018](#); [Realini et al., 2014](#); [Telligman et al., 2017](#)). Además, existen distintas figuras que identifican el origen concreto del producto, tales como las DOP (Denominación de Origen Protegida) o las IGP (Indicación Geográfica Protegida)

(figura 4). Estas figuras que indican el área geográfica o la región donde se ha producido la carne mejoran la valoración que tienen los consumidores de sus características intrínsecas y su calidad ([Banović et al., 2009](#)).

- **Marca:** la marca no solo es una señal extrínseca del producto, sino que también influye sobre las expectativas y sobre la percepción de las señales de calidad intrínsecas ([Banović et al., 2009](#)).
- **Métodos de producción:** los consumidores confían más en los métodos tradicionales que en los más innovadores, ya que se muestran reacios a la utilización de nuevas tecnologías en el procesado de la carne mostrando preferencia por la carne procesada de forma más tradicional ([De Barcellos et al., 2010](#)). A pesar de ello, las etiquetas de producción ecológica tienen menos impacto frente a otros atributos, como describen Bernabéu *et al.* ([2018](#)) en relación a la carne de cordero.
- **Ética:** en esta categoría se incluyen la sostenibilidad y el bienestar animal, tales como los “free-range” para carne de ave, regulados por el Reglamento (CE) nº 543/2008. Los consumidores asocian unas buenas prácticas de producción y de técnicas que aseguren el bienestar animal con una mejor calidad de la carne ([Regan et al., 2018](#)) y, de hecho, están dispuestos a pagar más por productos que certifiquen ese bienestar ([Napolitano et al., 2010](#)). Esto mismo sucede con las etiquetas con reclamos sobre la sostenibilidad del proceso productivo, que provocan un aumento en la percepción de la calidad y la aceptabilidad de la carne. Esto conlleva un cambio en la percepción de las características organolépticas asociado a esos reclamos ([Samant y Seo, 2016](#)). Los consumidores también están dispuestos a pagar más por los sistemas alternativos, por encima de los relativos a bienestar animal, las etiquetas sobre la huella de carbono y las etiquetas orgánicas-ecológicas ([Van Loo et al., 2014](#)).
- **Nombres descriptivos de alimentos e ingredientes:** esta categoría es la que menos influencia tiene sobre los consumidores según Fernqvist y Ekelund ([2014](#)).

A pesar de estas características, el consumidor prefiere una carne de buena apariencia y sabor para repetir su compra ([Fernqvist y Ekelund, 2014](#)).



Figura 2. Sello de certificación ecológica de la UE (Reglamento (UE) 271/2010).



Figura 3. Sellos oficiales de los Consejos Reguladores de Agricultura Ecológica de las CC.AA.



Figura 4. Sellos que identifican a los productos con Denominación de Origen Protegida e Indicación Geográfica Protegida (Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente [MAPAMA], 2017).

### 4.3. **IMPORTANCIA PARA LOS CONSUMIDORES**

La importancia que tienen los atributos y señales de la carne para los consumidores difiere según autores. Henchion *et al.* ([2017](#)) realizaron una revisión bibliográfica para determinar las cualidades de carne de vacuno más valoradas por los consumidores. El ranking obtenido en orden creciente fue el siguiente:

- |  |                                     |
|--|-------------------------------------|
| 1. Origen  | 11. Salud/ nutrición/ peso corporal |
| 2. Precio  | 12. Color de la carne               |
| 3. Certificado/ etiquetas/ marca/<br>información | 13. Comodidad                       |
| 4. Cantidad de grasa visible                     | 14. Seguridad                       |
| 5. Sabor   | 15. Problemas medioambientales      |
| 6. Bienestar animal                              | 16. Apariencia                      |
| 7. Sistema de producción/<br>alimentación        | 17. Jugosidad                       |
| 8. Frescura/ vida útil                           | 18. Trazabilidad                    |
| 9. Natural/ orgánico                             | 19. Tecnologías de procesado        |
| 10. Terneza                                      | 20. Lugar de la compra              |
|  | 21. Envase                          |
|  | 22. Cría                            |

### 4.4. **EXPECTATIVAS DE CALIDAD DEL CONSUMIDOR**

Varios estudios sostienen que la opinión después del consumo de un producto puede verse modificada según las señales percibidas con anterioridad ([Fernqvist y Ekelund, 2014](#); [Grunert \*et al.\*, 2004](#); [Meyerding \*et al.\*, 2018](#)), ya que los atributos organolépticos pueden pasar a un segundo plano debido a las expectativas de calidad que otros factores, como el precio o aspectos referidos al bienestar animal, han generado en el consumidor ([Merlino \*et al.\*, 2018](#)).

En la figura 5 se muestra la influencia de las señales de búsqueda, los atributos de calidad y otros factores personales y de contexto sobre las expectativas del consumidor. Además, se observa que las expectativas pueden modificar la percepción de la calidad durante el consumo ([Fernqvist y Ekelund, 2014](#)).

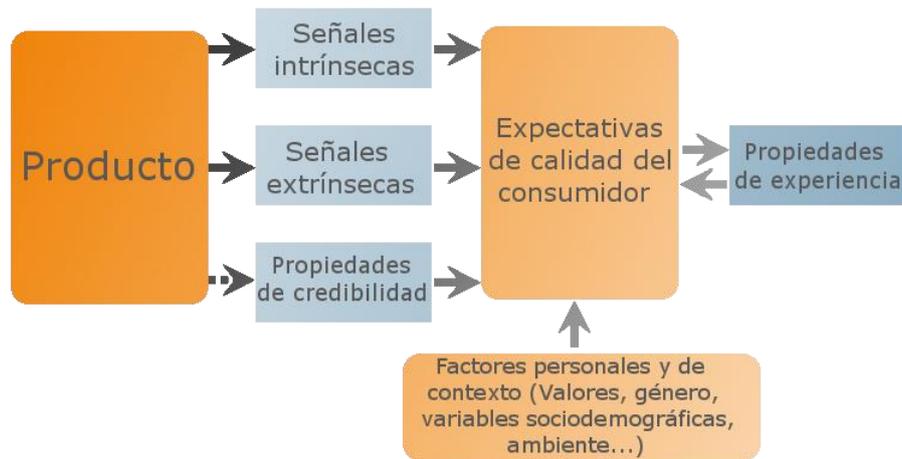


Figura 5. Percepción de la calidad experimentada por el consumidor basada en el conjunto de señales y atributos de calidad (adaptado de [Fernqvist y Ekelund, 2014](#)).

## 5. COLOR DE LA CARNE FRESCA

El color de una pieza de carne es una de sus características más importantes, puesto que es lo que valoran los consumidores para determinar la frescura de la carne ([Mancini y Hunt, 2005](#)).

La mayoría de estudios se refiere al color en carne de vacuno, como el de [Ledward \(1985\)](#), el de [Mancini y Ramanathan \(2014\)](#) o el de [Holman et al. \(2017\)](#), por citar algunos ejemplos. Pero el color de la carne difiere entre especies, por ejemplo, el color esperado en la pechuga de pollo es un blanco rojizo, debido a la falta de pigmentos en el músculo, mientras que en vacuno el consumidor prefiere un rojo brillante ([Realini et al., 2014](#)). También la genética, alimentación ([Corino et al., 1999](#)), sistema de estabulado ([Mancini y Hunt, 2005](#)) y tipo de músculo del animal hacen variar el color de la carne ([Potthast, 1987](#)).

El pigmento responsable del color típico de la carne es la mioglobina y otros compuestos derivados de esta. En menor medida, la hemoglobina y el citocromo C también aportan matices al color ([Mancini y Hunt, 2005](#)). La mioglobina es una proteína globular formada por una parte proteica o globina y por un anillo hemo (figura 6) que contiene un átomo de hierro en su interior. Este átomo se encuentra unido a cuatro nitrógenos y a la globina a través de una histidina, de tal manera que queda un sexto enlace libre. Este enlace permite al hierro unirse a otros sustratos y ganar o perder un

electrón. Esta característica es la que determina las variaciones de la mioglobina, las cuales presentan distinto espectro de absorción y, por tanto, distinto color ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

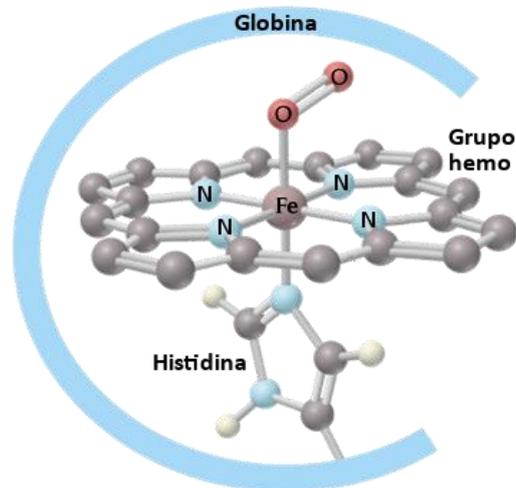


Figura 6. Grupo hemo de la mioglobina. En este caso se encuentra en forma de oximioglobina ([Castaños, 2015](#)).

El grupo hemo se puede encontrar en estado oxidado ( $\text{Fe}^{3+}$ ) o reducido ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Sólo cuando el hierro está reducido puede unirse a otras moléculas ([Judge et al., 1989](#)). Cuando el hierro de la mioglobina se encuentra oxidado no se puede unir a otras moléculas y en este estado se denomina metamioglobina ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

La mioglobina puede transformarse, mediante diversas reacciones de forma reversible ([Mancini y Hunt, 2005](#)), dando lugar a tres moléculas de distinto color, como se observa en la figura 7. La deoximioglobina, que tiene un tono púrpura típico de la carne envasada al vacío y del músculo recién cortado; la oximioglobina, de color rojo cereza brillante, y la metamioglobina, de color rojo pardo ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

Cuando la deoximioglobina se expone al oxígeno se produce oximioglobina, la cual puede convertirse en metamioglobina. Primero se transforma en deoximioglobina por deoxigenación, y después se oxida en metamioglobina. La metamioglobina puede volver al estado de deoximioglobina mediante la reducción del átomo de hierro del grupo hemo ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

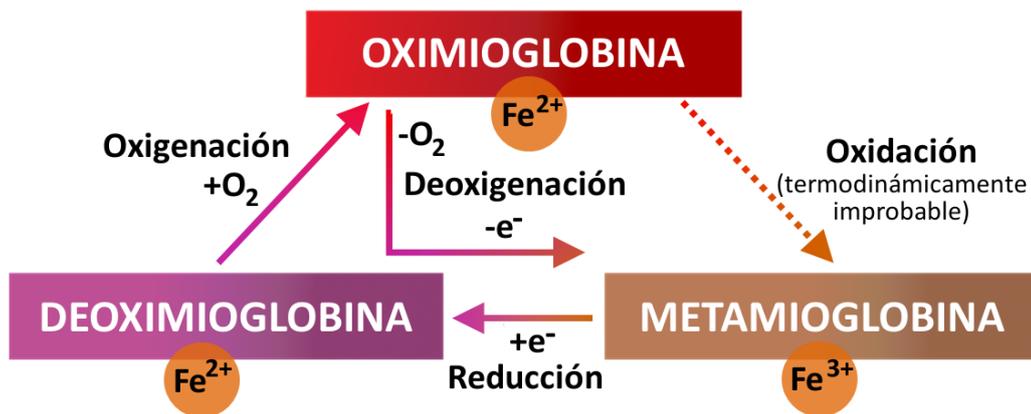


Figura 7. Diagrama que muestra las reacciones que sufre la mioglobina en la carne provocando diferentes coloraciones (adaptado de [Hunt et al., 2012](#)).

El interior de la carne fresca es de color púrpura rojizo, ya que predomina la deoximioglobina que se forma por reducciones de la metamioglobina al reaccionar únicamente con el agua del interior de la carne. Cuando se realiza un corte transversal en la carne se observan tres capas diferentes (figura 8). La capa externa, que ha estado expuesta al oxígeno, es del color rojo brillante de la oximioglobina. La capa intermedia, de color pardo, está formada por metamioglobina y la del interior, por deoximioglobina. La exposición del corte al aire durante 35-40 minutos provoca una coloración rojo brillante en toda la superficie debido a la formación de oximioglobina ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

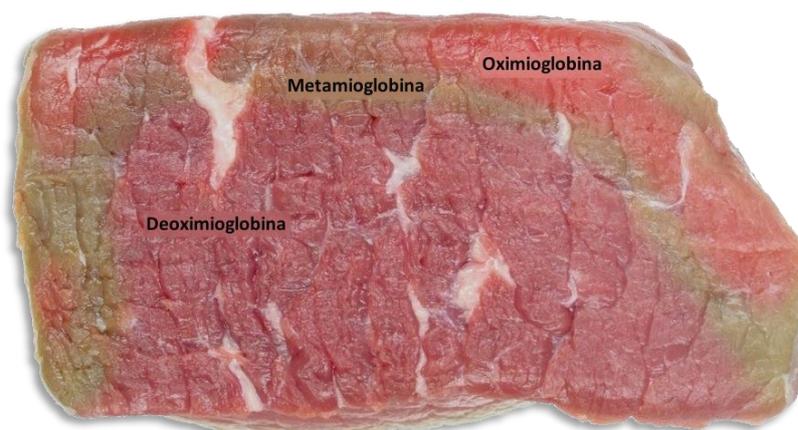


Figura 8. Imagen que muestra como se distribuyen las distintas formas de la mioglobina en una pieza de carne de vacuno recién cortada. La parte superior es la que estaba en contacto con el aire y, por tanto, con el oxígeno que ha producido la oximioglobina que aporta el color rojo brillante ([Lorés, 2012](#)).

La decoloración de la superficie de la carne por la formación de metamioglobina depende del consumo de oxígeno y la actividad reductora del sistema. Este último es el factor más importante en la mayoría de circunstancias. La actividad reductora de la metamioglobina es la capacidad del músculo para convertir metamioglobina a deoximioglobina mediante enzimas que consumen oxígeno del músculo. Esta capacidad se encuentra afectada por el tiempo, la temperatura y el pH ([Ledward, 1985](#)).

El papel de la mitocondria en el consumo de oxígeno en la carne determina los cambios de color durante la maduración ([Mancini y Ramanathan, 2014](#)). A medida que pasa el tiempo, la mitocondria reduce su actividad, lo que disminuye su consumo de oxígeno. Esto favorece la producción de oximioglobina a partir de deoximioglobina, que provoca el color rojo brillante en la carne ([Dikeman, 2017](#)). Pero el descenso de actividad de la mitocondria con el transcurrir del tiempo también reduce la estabilidad del color. Esto se debe a un menor número de reacciones de reducción de la metamioglobina para formar deoximioglobina, a partir de la cual se regenera la oximioglobina ([Mancini y Ramanathan, 2014](#)).

Además de la actividad reductora del sistema y el consumo de oxígeno de la mitocondria, existen otros factores que afectan a la formación del color en la carne. Uno de ellos es la oxidación lipídica que consume oxígeno y acelera la oxidación de la oximioglobina del músculo ([Monahan et al., 2005](#)). Otro es la cantidad de fibras rojas en el músculo que afecta a la estabilidad de la carne y las reacciones de oxidorreducción de la mioglobina ([Renerre y Labas, 1987](#)). El contenido de glucógeno en el músculo, el pH y la temperatura son otros ([Mancini y Hunt, 2005](#)). Por ejemplo, una temperatura alta y un pH bajo aumentan la formación de metamioglobina ([Ledward, 1985](#)), teniendo en cuenta que el pH varía durante la maduración de la carne después del sacrificio ([Kozioł et al., 2015](#)).

El tipo de envasado de la carne fresca afecta a la formación de pigmentos. La carne envasada al vacío tiene el color púrpura de la desoximioglobina que se transforma en rojo brillante cuando la pieza toma contacto con el aire ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)). En algunos casos se emplean atmósferas protectoras. Por ejemplo, la inclusión de monóxido de carbono provoca la formación de carboximioglobina al reaccionar con la oximioglobina, compuesto de color rojo brillante relativamente estable ([Mancini y Hunt, 2005](#)).

En casos de carne de baja calidad como las carnes PSE (*pale, soft, exudative*; pálidas, blandas y exudativas) y DFD (*dark, firm, dry*; oscuras, duras y secas) existe un cambio de color característico además de los cambios en textura y jugosidad.

Las carnes PSE suelen aparecer en carnes de origen porcino. Se producen cuando el descenso del pH durante la maduración es muy rápido y se combina con una temperatura elevada cercana a 37 °C. Esto reduce la capacidad de retención de agua del músculo por la desnaturalización de las proteínas miofibrilares. El agua extracelular refleja más la luz, lo que se traduce en carne de color pálido. Además, el pH bajo afecta a la estructura de los pigmentos y, por tanto, al color ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

Las carnes DFD, que aparecen más habitualmente en carne de vacuno, se producen cuando la cantidad de glucógeno en el músculo es baja, de manera que el pH no se reduce lo suficiente durante la maduración, dando lugar a una alta capacidad de retención de agua. El color oscuro de este tipo de carne se debe a la gran cantidad de agua intracelular que refleja menos luz blanca y absorbe más color ([Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

### 5.1. COLOR INSTRUMENTAL

En 1976, la comisión CIE (Comisión Internacional de Iluminación) elaboró el espacio de color CIE  $L^*a^*b^*$  para representar el color de manera objetiva (figura 9). Este sistema establece el color en tres ejes ([Hunt et al., 2012](#)):

- La luminosidad ( $L^*$ ) se representa en el eje Z. Los valores varían entre el 0 (negro) y 100 (blanco). Las medidas instrumentales de  $L^*$  y de  $a^*$  se intuyen fácilmente en el color del músculo ([Mancini y Hunt, 2005](#)).
- La coordenada rojo/verde ( $a^*$ ) se indica en el eje X y abarca del -60 (verde) al +60 (rojo). Este es el parámetro que más tienen en cuenta los consumidores a la hora de valorar la frescura y aceptabilidad de la carne ([Khlijji et al., 2010](#)) y se ve afectado por el contenido de pigmento y su estado redox ([Mancini y Hunt, 2005](#)).
- La coordenada amarillo/azul ( $b^*$ ), representada en el eje Y, también se encuentra entre -60 (azul) y +60 (amarillo). En relación a la carne, este parámetro se asocia con tonalidades marrones ([O'Sullivan et al., 2003](#)), a pesar de que es un valor que

no se relaciona intuitivamente con ella ([Mancini y Hunt, 2005](#)). El estado redox de la mioglobina influye a este valor ([Mancini y Hunt, 2005](#)).

A partir de estos tres parámetros es posible calcular la saturación o croma ( $c^*$ ) y el matiz o *hue* en inglés ( $h^*$ ) ([Hunt et al., 2012](#)). La saturación ( $c^*$ ) determina la pureza del color, es decir, si un color es más apagado o más vivo ([Tapp III et al., 2011](#)). Su cálculo es de la siguiente forma:

$$c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

$h^*$  es el ángulo que representa las variaciones del color y se calcula mediante la siguiente fórmula ([Tapp III et al., 2011](#)):

$$h_{ab}^* = \arctan \left( \frac{b^*}{a^*} \right)$$

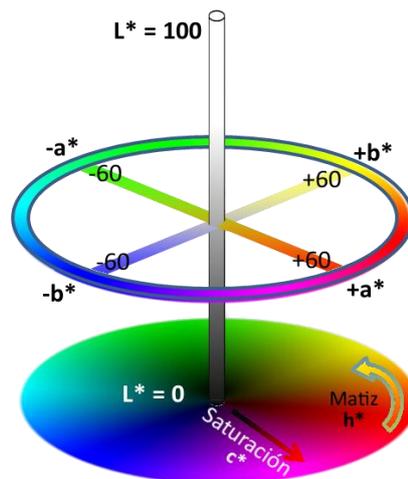


Figura 9. Esquema del espacio CIE L\*a\*b\* (adaptado de [Hunt et al., 2012](#)).

Existe una correlación entre el color instrumental y las preferencias de los consumidores ([Khlijji et al., 2010](#); [Holman et al., 2017](#)). Para medir el color instrumental de la carne se suele utilizar un colorímetro. En la actualidad los más utilizados en Europa son de la marca Minolta. Estos colorímetros determinan varias variables: iluminación, tamaño de la apertura y el ángulo de observación. También se tiene en cuenta el tiempo de exposición de la carne fresca al aire cuando está recién cortada y la especie a la que pertenece la carne ([Tapp III et al., 2011](#)).

## 6. USO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE CARNE

Se define antimicrobiano como “la sustancia activa de origen sintético o natural que destruye microorganismos, impide su crecimiento o su capacidad para reproducirse en animales o humanos, excluyendo a los antivirales y a los antiparasitarios” ([EFSA, 2010](#)).

La descontaminación de la carne es el tratamiento a través del cual se reduce tanto el número de microorganismos patógenos como la carga microbiana total de la superficie de la carne de canales, despojos comestibles o despieces de carne ([Moreno García, 2006](#)). Este proceso es un punto crítico de control dentro de los sistemas APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) de las empresas cárnicas, que no sustituye nunca a las buenas prácticas higiénicas ([Bolder, 1997](#); [Comité Científico de medidas Veterinarias relativo a la Salud Pública \[SCVPH\], 1998](#)).

El mejor momento para realizar los tratamientos es antes de que las bacterias formen biofilms en la carne y se adhieran a esta de forma más resistente, generalmente este momento es después del sacrificio con la carne aún caliente. Debido a que tanto el despiece como la retirada de piel pueden contaminar la carne, en ocasiones el tratamiento se efectúa después de estos procesos. También se puede realizar antes y después de la evisceración ([Moreno García, 2006](#)).

Las técnicas de descontaminación se dividen en tres categorías: físicas, microbiológicas y químicas. Dentro de las físicas existen diversos procesos como el uso de agua caliente de distintos modos: pulverizada, en forma de cascada, baño, vapor o vapor acompañado de vacío para la descontaminación de pequeñas áreas sucias. El inconveniente de trabajar con agua caliente es que puede provocar decoloración en la superficie de la carne. Otro proceso es el uso de radiaciones ionizantes con rayos gamma y beta, pero actualmente este procedimiento provoca rechazo entre los consumidores. Existen otros tratamientos físicos, como los ultrasonidos, las altas presiones, la luz intensa pulsada, los rayos infrarrojos, la radiación ultravioleta o el uso de campos eléctricos pulsados ([Bolder, 1997](#); [Moreno García, 2006](#)). Aunque este último se utiliza sobre todo en alimentos líquidos como zumos o leche ([Rajkovic et al., 2010](#)).

Los tratamientos microbiológicos usan bacterias o sus bacteriocinas para inhibir el crecimiento de la flora microbiana tanto alterante como patógena. El uso de bacterias ácido lácticas o del antibiótico nisina que producen bacterias de la especie *Lactococcus lactis*, serían ejemplos de este tipo de tratamientos ([Moreno García, 2006](#)).

En cuanto a los tratamientos químicos, destaca la aplicación de compuestos clorados (hipoclorito, dióxido de cloro), ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, ácido láctico tamponado, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido ascórbico...), fosfatos inorgánicos (fosfato trisódico, polifosfatos), conservantes orgánicos (benzoatos, propionatos), oxidantes (peróxido de hidrógeno, ozono) y otros, como el cloruro de cetilpiridinio ([Bolder, 1997](#); [Moreno García, 2006](#)).

Dentro de los compuestos clorados, como el hipoclorito sódico o lejía y el dióxido de cloro, el dióxido de cloro es un compuesto altamente oxidante que actúa como biocida ante diversos microorganismos, es muy soluble en agua y su eficacia depende de la concentración y del tiempo que permanezca en contacto con la superficie de la carne. Su aplicación puede ser mediante pulverización o por inmersión ([Rajkovic et al., 2010](#)). Este tipo de compuestos tienen diversos inconvenientes, como la corrosión que producen en diversos materiales, los fuertes olores que desprenden o la irritación ocular que pueden provocar en los operarios ([Moreno García, 2006](#)).

Para utilizarlos, los compuestos descontaminantes se solubilizan en agua potable para pulverizarse sobre la superficie de la carne o para llenar baños donde sumergir canales de ave o despieces.

### 6.1. EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS CON ANTIMICROBIANOS

Existen numerosos estudios que demuestran la efectividad de varios compuestos descontaminantes sobre diferentes tipos de carne.

En carne de vacuno se ha probado que el uso de cloruro de cetilpiridinio, el dióxido de cloro, el ácido láctico y el fosfato trisódico son efectivos para reducir la carga microbiana ([Jiménez-Villarreal et al., 2003b](#)). Además, un estudio de Pohlman *et al.* ([2002b](#)) muestra que el tratamiento con fosfato trisódico al 10% o con cloruro de cetilpiridinio al 0,5% reduce los niveles de *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli*,

coliformes y mesófilos aerobios. En estos estudios se observó que el fosfato trisódico y el cloruro de cetilpiridinio mejoraron el color, la estabilidad de la oximioglobina y redujeron la oxidación lipídica. Asimismo, estos compuestos mostraron la capacidad de prolongar la estabilidad del color sin la formación de olores desagradables ([Pohlman et al., 2002b](#)). Otro estudio ([DeGeer et al., 2016](#)) comprobó la eficacia del metasilicato de sodio y del ácido láctico sobre carne de vacuno y de cerdo, obteniendo buenos resultados sobre patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Listeria monocytogenes*. La inmersión de carne de vacuno en soluciones de ácido acético, ácido cítrico y decanoato sódico también ha mostrado ser efectiva para reducir la carga microbiana ([Kassem et al., 2017](#)).

Igualmente, se ha estudiado la efectividad de diversos compuestos sobre la superficie de carne de pollo. Compuestos como el fosfato trisódico al 12%, el clorito sódico acidificado a 1.200 ppm y el ácido cítrico al 2% son eficaces en la reducción de la carga de microorganismos patógenos inoculados sobre muslos de pollo y sobre la microbiota microbiana ([Alonso-Hernando et al., 2013b](#); [Del Río et al., 2007a](#)). En el caso de los muslos tratados con fosfato trisódico y clorito sódico acidificado se observó un incremento de la reducción de la carga microbiana patógena durante el almacenaje ([Del Río et al., 2007a](#)). Además, el tratamiento con peroxiácidos a 220 ppm también mostró ser eficaz, aunque en menor medida que los anteriores, en reducir tanto la flora patógena como la acompañante ([Del Río et al., 2007a, 2007b](#)). El uso de estos compuestos no afectó a las características organolépticas de los muslos de pollo ([Del Río et al., 2007b](#)). Rahman *et al.* ([2016](#)) realizaron un estudio sobre el tratamiento de carne de pollo con soluciones de cloro, fosfato trisódico y ácido ascórbico en diferentes concentraciones. Todos mostraron ser efectivos en la reducción de la carga microbiana. Aunque con fosfato trisódico y ácido ascórbico la calidad sensorial de la carne se mantuvo aceptable, la solución de cloro afectó al color y al sabor de la carne.

Hay diversos autores que combinan tratamientos físicos y químicos en sus estudios o varios compuestos antimicrobianos. A este uso de varios tratamientos que actúan de forma sinérgica se le denomina *hurdle technology* o tecnología basada en obstáculos ([Moreno García, 2006](#)).

En un experimento sobre carne de pollo en el que se combinaron tratamientos físicos y químicos se concluyó que el uso de fosfato trisódico seguido de un baño en agua caliente y barrido de la superficie resultó ser más eficaz que los tratamientos por separado o duplicados en la reducción de bacterias mesófilas aerobias, *Escherichia coli* y coliformes totales. Aunque redujo la contaminación, este tratamiento modificó la apariencia de la piel volviéndola más oscura y amarillenta ([Singh et al., 2017](#)).

En relación al uso simultáneo de varios antimicrobianos, existen estudios que corroboran su eficacia en la reducción de la carga microbiana y en el mantenimiento de las características sensoriales. El uso de cloruro de cetilpiridinio al 0,5% seguido de fosfato trisódico al 10% ha mostrado ser eficaz para la descontaminación de la superficie de piezas de vacuno, mejorando además el color de la carne. También la aplicación de dióxido de cloro a 200 ppm seguido de cloruro de cetilpiridinio al 0,5% muestra eficacia antimicrobiana sin modificar las características organolépticas ([Jiménez-Villarreal et al., 2003a](#)). El agua ozonada al 1% seguida de la aplicación de otros compuestos tales como ácido acético al 5% o cloruro de cetilpiridinio al 0,5% han mostrado ser efectivos sobre carne de vacuno, al igual que el dióxido de cloro a 200 ppm seguido de fosfato trisódico al 10% ([Pohlman et al., 2002a](#)).

A pesar de los estudios que demuestran que la aplicación conjunta de distintos tratamientos es mejor que la individual, existen estudios con resultados diferentes, como en un trabajo de DeGeer *et al.* ([2016](#)) en el cual se concluye que el uso de ácido láctico y de metasilicato de sodio es más efectivo de forma individual que conjunta sobre vacuno y carne de cerdo.

La efectividad de los tratamientos con antimicrobianos depende de diversos factores según el tipo de compuesto químico y la carne que se trate, así como de la temperatura, el pH, el método utilizado o la concentración.

Los tratamientos no penetran igual en todas las carnes. Sarjit y Dykes ([2015](#)) llevaron a cabo un estudio sobre la eficacia del fosfato trisódico sobre *Campylobacter* y *Salmonella* en carne de pavo y carne de pollo, y concluyeron que este compuesto es más eficaz en carne de pavo que de pollo porque esta última protege mejor a los microorganismos en su superficie. Además, los compuestos antimicrobianos actúan mejor

cuando se aplican sobre el músculo que sobre piel o grasa, ya que estos últimos son elementos en los que el tratamiento no penetra completamente ([Capita et al., 2003](#)).

Las condiciones de temperatura, y en su caso la posible ruptura en la cadena de frío, pueden afectar a la eficacia del tratamiento. Cuando las condiciones de temperatura son constantes o con una ligera ruptura en la cadena de frío, el fosfato trisódico se mostró como el tratamiento más eficaz sobre carne de pollo para controlar el crecimiento de microorganismos psicrotrofos, Gram negativos y Gram positivos. Por otro lado, el clorito sódico acidificado y el ácido cítrico funcionaron mejor cuando la rotura en la cadena de frío fue más pronunciada ([Alonso-Hernando et al., 2013a](#), [2013c](#), [2015](#)).

Aunque generalmente la actuación de los compuestos sobre la carga antimicrobiana es mayor cuanto mayor es la temperatura, existen sustancias antimicrobianas que actúan mejor a temperaturas más bajas. Como por ejemplo el dióxido de cloro, que actúa mejor a 4 °C que a 50 °C ([Alonso-Hernando et al., 2013d](#)). También hay que tener en cuenta que en ocasiones la temperatura a la que se aplican los antimicrobianos no parece afectar a su eficacia ([DeGeer et al., 2016](#)). Es por ello, que la temperatura óptima de tratamiento depende de cada compuesto y debe ser estudiada.

El uso de antimicrobianos modifica el pH de la carne ([Del Río et al., 2007b](#)). La carne tiene un sistema tampón capaz de amortiguar los cambios de pH que les provocan los tratamientos. Aun así, cuando la carne se trata con compuestos que modifican sustancialmente su pH como el fosfato trisódico, que lo aumenta, o el ácido cítrico, que ejerce el efecto contrario, el pH tarda en regularse varios días inhibiendo el crecimiento de los microorganismos en la carne después de haber sido tratada ([Del Río et al., 2007a](#)).

## 6.2. INCONVENIENTES DEL USO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LA CARNE

El uso de tratamientos químicos sobre la superficie de la carne también tiene ciertos inconvenientes, lo cual explica la reticencia que tienen los organismos oficiales de la Unión Europea para legalizarlos.

A veces, los tratamientos aplicados provocan daños subletales a las bacterias. Cuando esto sucede, se puede desencadenar la formación de células resistentes tanto a los tratamientos descontaminantes como a antibióticos ([Capita et al., 2013](#); [Rajkovic et al.,](#)

[2010](#)). Algunos estudios han demostrado que la concentración de uso del antimicrobiano está relacionada con cambios en los parámetros cinéticos del crecimiento de los microorganismos, como el aumento de la tasa de crecimiento de *Salmonella* Enteritidis y *Listeria monocytogenes* al ser expuestas a concentraciones bajas de fosfato trisódico ([Del Río et al., 2008](#)). También se ha observado que las bacterias tratadas a dosis bajas con compuestos antimicrobianos o expuestas a un medio ácido son más resistentes a los tratamientos posteriores ([Alonso-Hernando et al., 2009a, 2009b](#)). Aunque los mecanismos que provocan esta resistencia en las células no están claros, se cree que puede deberse a un cambio de la membrana celular que la hace más rígida y, por tanto, más resistente ([Alonso-Hernando et al., 2010](#)).

Además, la eliminación de la flora acompañante puede provocar un mayor crecimiento de los microorganismos patógenos, como sucede con la utilización de concentraciones altas de ácido cítrico ([Del Río et al., 2008](#)). El aumento del crecimiento de bacterias patógenas frente a la flora alterante después del tratamiento de la carne con antimicrobianos supone un riesgo sanitario para los consumidores ([Alonso-Hernando et al., 2012a](#); [Del Río et al., 2006](#)).

Uno de los inconvenientes que hay que tener en cuenta, a pesar de que no constituyan un riesgo para la salud, son los cambios en la calidad sensorial de la carne. La carne tratada puede adquirir tonalidades, olores y/o sabores no deseados que pueden provocar el rechazo de los consumidores ante su consumo. Un ejemplo es el cambio de color de la carne de vacuno provocado por el uso de ácido acético o de ácido cítrico sobre la superficie de la carne ([Kassem et al., 2017](#)). Ajustando las concentraciones de los compuestos utilizados se puede evitar este problema ([Del Río et al., 2007b](#)).

### 6.3. FOSFATO TRISÓDICO Y ÁCIDOS ORGÁNICOS

#### 6.3.1. Fosfato trisódico

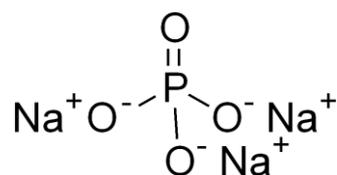


Figura 10. Estructura química del fosfato trisódico.

El fosfato trisódico es una sustancia química considerada GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro) por la FDA (21 ECFR 182.1778) ([Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos \[GPO\], 2021a](#)), que forma cristales transparentes blanquecinos ([EFSA, 2008](#)). Su fórmula química es  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  y en agua se disocia en los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ . Su mecanismo de acción se basa en esta capacidad de disociación que provoca un pH 12 en las soluciones al 1% de este compuesto. Esta alcalinidad rompe los ácidos grasos de la membrana plasmática lo que conduce a la rotura celular. Además, posee una alta capacidad surfactante que permite la eliminación de películas grasas y evita la adherencia de las células en las superficies cuando no se encuentran fuertemente adheridas ([EFSA, 2006](#)).

Este compuesto actúa mejor a mayores temperaturas ([Alonso-Hernando et al., 2013d](#)) y es más eficaz frente a bacterias Gram negativas como enterobacterias, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Campylobacter*, que sobre Gram positivas ([Del Río et al., 2008](#); [Moreno García, 2006](#)).

La concentración antimicrobiana mínima efectiva es del 8% ([EFSA, 2006](#)). Las concentraciones de hasta el 10% no afectan a la calidad organoléptica en carne de pollo e incluso se ha observado una mejora del color con soluciones de hasta el 12% ([Capita et al., 2000](#)).

## ÁCIDOS ORGÁNICOS

Los ácidos orgánicos se utilizan para reducir el número de bacterias sobre la superficie de la carne, aunque su eficacia depende no solo del tipo de ácido, el pH y la temperatura de la solución sino también del pH de la carne, la capacidad tampón de esta, el tipo de carne y la carga microbiana inicial. En general, presentan una eficacia mayor ante bacterias Gram negativas, con algunas excepciones como sobre *Escherichia coli* O157:H7, que presenta una alta resistencia ante el tratamiento con estos ácidos ([Rajkovic et al., 2010](#)).

Por su estructura química, son ácidos débiles con una alta capacidad de disociación que les permite entrar dentro de la célula y provocar el descenso del pH debido a los iones

formados. La acidificación del citoplasma impide el normal desarrollo de las funciones celulares ([Rajkovic et al., 2010](#)). La descontaminación con ácidos orgánicos tiene un efecto bactericida en el momento en el que se aplica y un efecto bacteriostático durante el almacenaje, debido a que la carne no se aclara después del tratamiento ([Moreno García, 2006](#)). El momento más adecuado para el uso de estos descontaminantes es antes del enfriamiento de la carne para que los microorganismos no lleguen a adherirse a la superficie de forma irreversible ([Rajkovic et al., 2010](#)).

Aunque los ácidos orgánicos son eficaces para reducir la carga microbiana, tienen diversos inconvenientes como son el cambio de color y la aparición de olores y sabores extraños en la carne. También pueden facilitar la aparición de células microbianas resistentes cuando ocasionan daños subletales en las células. Como su modo de actuación se basa en el descenso de pH, el sistema tampón que posee la carne puede restarle eficacia. El ácido láctico tamponado mediante la adición de hidróxido de sodio hasta un pH 3 corrige este defecto, y suele utilizarse en canales de ave ([Moreno García, 2006](#)).

### 6.3.2. **Ácido cítrico**

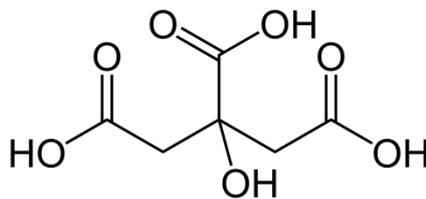


Figura 11. Estructura química del ácido cítrico.

El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico que se encuentra de forma natural en diversas frutas, especialmente en los cítricos como las naranjas. Es una sustancia considerada GRAS por la FDA (21 ECFR 184.1033) ([GPO, 2021b](#)) y que, al contrario que otros ácidos orgánicos, es más eficaz sobre bacterias Gram positivas que sobre las negativas ([Alonso-Hernando et al., 2013b](#); [Del Río et al., 2008](#)).

### 6.3.3. **Ácido ascórbico**

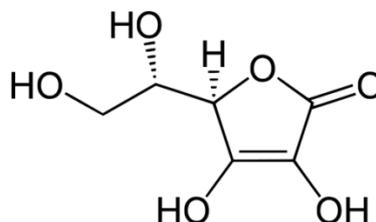


Figura 12. Estructura química del ácido ascórbico.

El ácido ascórbico o vitamina C es un ácido de azúcar que posee un grupo diénol con poder reductor, el cual determina el carácter ácido de esta molécula ([Eddy y Ingram, 1953](#)). Es considerado GRAS por la FDA (21 ECFR 182.3013) ([GPO, 2021a](#)).

Este compuesto, además de inhibir el crecimiento bacteriano por reducción del pH como otros ácidos orgánicos, también dificulta el crecimiento de microorganismos aerobios y libera peróxido de hidrógeno al oxidarse, lo que ocasiona cambios conformacionales de enzimas y proteínas bacterianas, conduciendo a su muerte celular ([Eddy y Ingram, 1953](#)).

#### 6.3.4. Ácido láctico

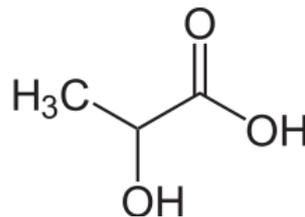


Figura 13. Estructura química del ácido láctico.

El ácido láctico, considerado GRAS por la FDA (21 ECFR 184.1061) ([GPO, 2021b](#)), es una molécula orgánica presente en la leche de los mamíferos y un producto metabólico de las bacterias ácido lácticas. También se encuentra en la carne, ya que se forma en el músculo a partir del glucógeno en condiciones anaerobias.

El ácido láctico a una concentración del 4% sobre carne fresca de vacuno y de cerdo muestra gran eficacia sin apenas modificación de las características organolépticas ([DeGeer et al., 2016](#); [Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)). Aunque el tratamiento con ácido láctico alarga la vida útil y mejora las características sensoriales de la carne tratada, tiende a blanquear la carne ([Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)).

#### 6.4. LEGISLACIÓN

En el artículo 3.2 del Reglamento (CE) nº 853/2004 se recoge que “los operadores de empresa alimentaria no utilizarán para eliminar la contaminación de superficie de los productos de origen animal ninguna sustancia distinta del agua potable o, cuando el Reglamento (CE) nº 852/2004 o el presente Reglamento autorice su uso, distinta del agua limpia, a menos que el uso de dicha sustancia haya sido autorizada.” De lo que se deduce

que es posible el uso de nuevas sustancias descontaminantes siempre y cuando sean autorizadas.

La autorización de un antimicrobiano pasa porque este tenga eficacia probada, sea aceptado por los consumidores, no sea nocivo para la salud y no modifique las características sensoriales de la carne ([Moreno García, 2006](#)).

En 2011 la EFSA determinó que la utilización de ácido láctico no presenta riesgos y que tiene eficacia antimicrobiana probada y acordó que la concentración máxima de tratamiento es de 190 ppm. Según este dictamen, se autorizó en el 2013 el uso de ácido láctico en canales, medias canales o cuartos en el matadero sin ignorar el cumplimiento de las buenas prácticas de higiene y las directrices de los planes APPCC (Reglamento (UE) nº 101/2013, de 4 de febrero, relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos).

La Unión Europea está a la espera de más estudios para la aprobación o no de otras sustancias.

En otros países como Estados Unidos, Canadá o Australia permiten el uso de diversas sustancias como tratamientos descontaminantes sobre la superficie de la carne. En Estados Unidos está autorizada la utilización de dióxido de cloro (21 CFR 173.300) ([GPO, 2021c](#)) en el agua para el enfriamiento de canales de ave a una concentración máxima de 3 ppm ([Servicio de Seguridad e Inspección Alimentaria, 1996](#)). También se utiliza el fosfato trisódico entre el 8 y el 12% para reducir la carga de *Salmonella* y *Campylobacter* en canales de ave y sobre canales de vacuno para reducir *Escherichia coli* O157:H7 ([Moreno García, 2006](#)). Otro compuesto permitido, tanto para la limpieza de carne de ave como de vacuno, es el clorito sódico acidificado (21 CFR 173.325) ([GPO, 2021d](#)), cuya mezcla con ácidos orgánicos en solución también está permitida en unas condiciones determinadas. Para la descontaminación de carne de ave también se permite el uso de peroxiácidos (21 CFR 173.370) ([GPO, 2021e](#)) a concentraciones menores de 220 ppm y el cloruro de cetilpiridinio (21 CFR 173.375) ([GPO, 2021f](#)).

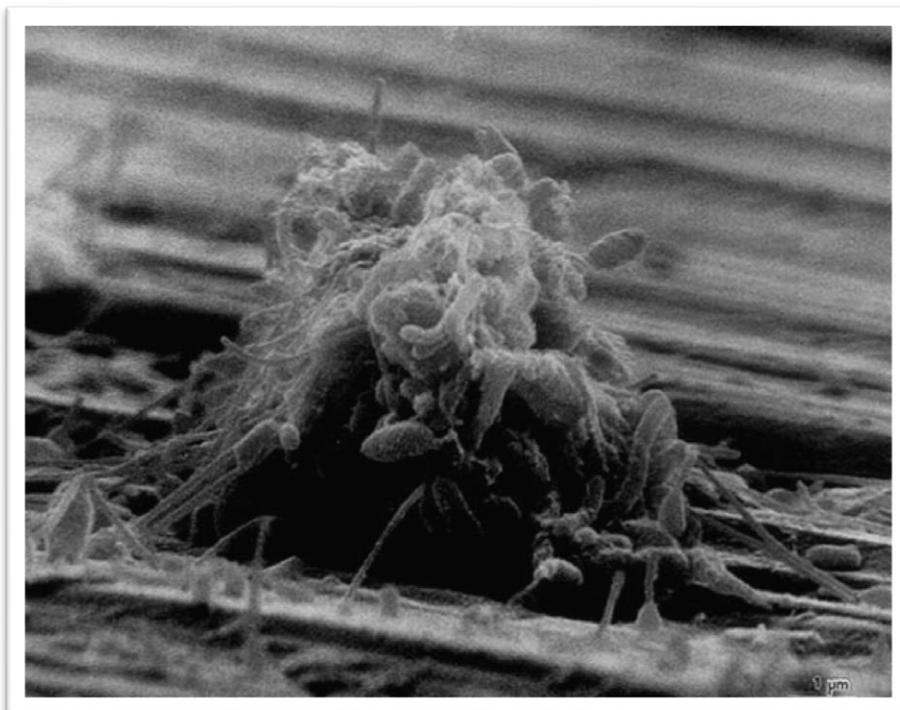
En Canadá se permite lavar las canales con agua clorada como máximo a 50 ppm en el caso de carne de ave y a 20 ppm en el caso de carnes rojas ([Agencia Canadiense de](#)

[Inspección de Alimentos, 2016](#)), al igual que en Australia y Nueva Zelanda que se permite para el enfriamiento de las canales de ave a una concentración de entre 50 y 70 ppm de cloro libre ([Australia Nueva Zelanda, 2005](#)). En estos dos últimos países también se permite el uso de clorito sódico acidificado a concentraciones entre 50 y 150 ppm para canales enteras de ave y entre 500 y 1.200 ppm para despieces tanto de ave como de otras carnes ([Australia Nueva Zelanda, 2003](#)).

## 7. BIOFILMS

Un biofilm es una matriz polimérica extracelular producida por un conjunto de bacterias que viven dentro de ella (figura 14) y que constituye la forma en la que la gran mayoría de bacterias vive en estado natural ([Costerton \*et al.\*, 1978](#)). Estas estructuras pueden afectar a la calidad y a la seguridad de los alimentos, ya que presentan gran adherencia a las superficies constituyendo una forma de resistencia y de propagación de microorganismos patógenos y alterantes ([Abee \*et al.\*, 2011](#)).

La formación del biofilm mejora la supervivencia de las células y les permite expandirse hacia nuevas áreas. Depende fundamentalmente del entorno que les rodea y de factores microbiológicos propios ([Whitehead y Verran, 2015](#)).



**Figura 14.** Microfotografía en microscopio electrónico de barrido de un biofilm sobre una superficie metálica de un sistema de agua industrial ([Donlan y Costerton, 2002](#)).

Los biofilms pueden formarse tanto sobre superficies bióticas como abióticas ([Ordóñez Pereda et al., 2014](#)), con diferente adherencia según el material sobre el que crezcan ([Milan et al., 2015](#)). En el plano clínico, causan infecciones difíciles de erradicar, como la fibrosis quística provocada por *Pseudomonas aeruginosa* ([Bjarnsholt et al., 2013](#)) y contaminan el material médico y de los hospitales ([Jamal et al., 2018](#)).

El crecimiento de biofilms sobre superficies y utensilios que suelen utilizarse en la industria alimentaria también es motivo de preocupación ([Wang et al., 2018](#)). Por ejemplo, Díez-García et al. ([2012](#)) observaron el crecimiento de biofilms de distintos serotipos de *Salmonella enterica* sobre poliestireno, plástico comúnmente utilizado en la industria alimentaria. También el estudio de Da Silva Meira et al. ([2012](#)) demostró la capacidad de *Staphylococcus aureus* de adherirse sobre superficies de acero inoxidable y de polipropileno.

El desarrollo de biofilms en industrias alimentarias y en los hogares supone una fuente de contaminación, si están constituidos mayormente por bacterias alterantes, o de infección, en el caso de estar constituidos por bacterias patógenas ([Bridier et al., 2015](#)). Las zonas de las industrias alimentarias donde se encuentran más biofilms son las que están en contacto continuo con un flujo de materia orgánica, tales como las tuberías. En superficies abiertas es menos probable que los biofilms lleguen a formarse completamente, porque no disponen de la suficiente cantidad de materia orgánica ([Whitehead y Verran, 2015](#)). La adherencia de bacterias sobre la superficie de la carne ([Capita et al., 2004](#)) y en las instalaciones de industrias cárnicas puede provocar contaminaciones cruzadas que implican, no solo la contaminación y pronta alteración de la carne, sino también la posibilidad de contraer alguna enfermedad por parte de los consumidores ([Giaouris et al., 2014](#)).

Los compuestos poliméricos extracelulares que producen las bacterias forman una matriz polimérica extracelular o glicocálix que les permite adherirse entre ellas (cohesión) y a las superficies (adhesión) ([Simões et al., 2010](#)), proporcionándoles estabilidad mecánica y permitiéndoles la comunicación entre ellas ([Abee et al., 2011](#)). La mayor parte de la matriz corresponde a proteínas y polisacáridos ([González-Machado et al., 2018](#); [Tsuneda et al., 2003](#)) y en menor medida a ácidos nucleicos y lípidos ([Kumar et al., 2017](#)).

Aunque los componentes varían según las especies y el ambiente en el que se encuentren ([Kumar et al., 2017](#)). Además, dentro de la matriz existen diversos microcanales por los que circula el agua para transportar nutrientes ([Ordóñez Pereda et al., 2014](#)).

Ejemplos de microorganismos alterantes que pueden formar biofilms serían las especies de los géneros *Pseudomonas* ([Wang et al., 2018](#)) o *Bacillus* ([Ordóñez Pereda et al., 2014](#)). Y ejemplos de microorganismos patógenos, *Listeria monocytogenes* ([Zadernowska et al., 2017](#)), *Salmonella* spp. ([Steenackers et al., 2012](#)) o *Campylobacter jejuni* ([Ordóñez Pereda et al., 2014](#)).

Hasta ahora, la mayoría de estudios se centran en biofilms de una sola especie ([Steenackers et al., 2012](#); [Wang et al., 2018](#); [Zadernowska et al., 2017](#)). Esto no representa el comportamiento de los biofilms naturales, ya que generalmente se componen de diversas especies, incluyendo, en ocasiones, organismos de varios reinos ([Bridier et al., 2015](#); [Burmølle et al., 2014](#)). Las interacciones entre las especies que componen el biofilm pueden ser de competencia, pero también de cooperación, ya que los productos resultantes del metabolismo de una bacteria, un cambio en el medio, como una variación del pH, o la presencia de una cierta especie pueden favorecer el desarrollo de otra ([Burmølle et al., 2014](#)). Actualmente, el conocimiento sobre biofilms mixtos es escaso ([Røder et al., 2016](#)).

Las bacterias dentro de un biofilm se encuentran muy próximas entre sí, de tal manera que se favorece la transferencia de genes mediante conjugación y también por transformación, debido a la existencia de diverso material genético extracelular contenido en la matriz ([Burmølle et al., 2014](#)).

Los biofilms no son solo un problema higiénico-sanitario, sino que también son útiles para el tratamiento de aguas residuales o la eliminación de productos contaminantes. Esto es así gracias a las enzimas que quedan contenidas en la matriz polimérica y que sirven para degradar materia orgánica u otros compuestos ([Burmølle et al., 2014](#)).

### 7.1. FORMACIÓN DE LOS BIOFILMS

Diversos factores afectan a la formación del biofilm, según Donlan ([2002](#)) y Simões *et al.* ([2010](#)), estos serían los más importantes:

- Superficie de contacto ([Rodríguez-Melcón \*et al.\*, 2018](#)): como son la textura o rugosidad ([Whitehead y Verran, 2015](#)), hidrofobicidad, química, carga o la cantidad de materia orgánica. Durante el inicio de formación de un biofilm es necesario que en la superficie se haya adherido materia orgánica ([Dourou \*et al.\*, 2011](#)), dependiendo del tipo de industria alimentaria implicada, el tipo de materia orgánica será diferente.
- Líquido en contacto: velocidad del flujo, pH ([Wang \*et al.\*, 2016](#)), temperatura ([Dourou \*et al.\*, 2011](#)), cationes, presencia de productos antimicrobianos o la disponibilidad de nutrientes. Estos factores determinan la cohesión entre las células de la misma especie o de distinta para formar microcolonias ([Kumar \*et al.\*, 2017](#)).
- Célula: hidrofobicidad de la superficie celular, apéndices extracelulares, sustancias extracelulares poliméricas o la liberación de moléculas señalizadoras. La hidrofobicidad, tanto del exterior de la célula como de la superficie en la que se va a formar el biofilms, desempeña un papel fundamental al actuar como fuerza que mantiene a las bacterias adheridas al sustrato ([Donlan, 2002](#)).

Los mecanismos que provocan la cascada de cambios químicos y físicos en las células planctónicas para que estas se adhieran a las superficies no están claros. Diversas teorías sugieren que este cambio de conformación de la célula se inicia con una señal transmitida por los apéndices, como son los flagelos o los pilis, al tomar contacto con una superficie ([Simões \*et al.\*, 2010](#); [O'Toole y Wong, 2016](#)). Las células planctónicas o de vida libre presentan movilidad, la cual pierden una vez que conforman el biofilm ([Abee \*et al.\*, 2011](#)).

La formación del biofilm (figura 15) comienza con la adhesión de las células planctónicas sobre la superficie gracias a interacciones electrostáticas ([Kumar \*et al.\*, 2017](#)). La adherencia se produce en dos fases. Primero, las células se adhieren de forma reversible, generalmente por un polo de la célula que no permite la adherencia total, y después, de forma irreversible, cuando todo el eje longitudinal de la bacteria se encuentra

en contacto con la superficie ([Petrova y Sauer, 2016](#)). En la superficie de la carne la adherencia también se produce en dos fases. Durante la adhesión reversible, las células bacterianas quedan atrapadas en un film líquido gracias a la hidrofobicidad de las células. En la segunda fase, irreversible, las células comienzan a producir la matriz polimérica extracelular del biofilm ([Selgas et al., 1993](#)).

Las células adheridas comienzan a dividirse y proliferar formando microcolonias cuyo crecimiento sucede de manera organizada mediante la comunicación entre sí a través del *quorum sensing* ([Kumar et al., 2017](#)). El *quorum sensing* es el sistema de comunicación bacteriano que regula la expresión de los genes mediante compuestos químicos denominados moléculas señalizadoras o autoinductores. Solo cuando la población bacteriana ha alcanzado un tamaño determinado, la cantidad de moléculas señalizadoras es suficiente para que las células comiencen a sufrir cambios ([Fugua et al., 1994](#)). Los autoinductores se clasifican en: lactonas homoserinas, producidas por bacterias Gram negativas; oligopéptidos, producidas por bacterias Gram positivas; autoinductor-2, que utilizan especies diferentes para comunicarse, y el autoinductor-3 o *Pseudomonas* quinolona señal ([Turan et al., 2017](#)).

Cuando el biofilm ha terminado de consolidarse se denomina maduro y tiene una estructura determinada que depende del ambiente y de los microorganismos implicados, además de la cantidad y tipo de materia orgánica adherida a la superficie. Los nutrientes del medio también modifican la composición de los polisacáridos extracelulares que componen la matriz, de tal modo que condicionan la arquitectura del biofilm ([Whitehead y Verran, 2015](#)). En este estado, las células pueden liberarse del biofilm por dispersión gracias a la acción del *quorum sensing* que regula la dispersión de células desde el biofilm y la producción de sustancias surfactantes que facilitan esa liberación ([Solano et al., 2014](#)). Además de esta forma activa de liberación de células desde el biofilm maduro, también pueden liberarse de forma pasiva, por erosión o desprendimiento o por desorción de las células que estaban adheridas de forma reversible a la superficie ([Petrova y Sauer, 2016](#)). Es en este biofilm maduro donde se forman las esporas resistentes de las especies que poseen esta capacidad ([Abee et al., 2011](#); [Vlamakis et al., 2008](#)).

Tanto la movilidad celular, como el desarrollo del biofilm y la esporulación, están regulados de forma global por genes que permiten que estos procesos se sucedan uno a otro en este mismo orden ([Abee et al., 2011](#)).

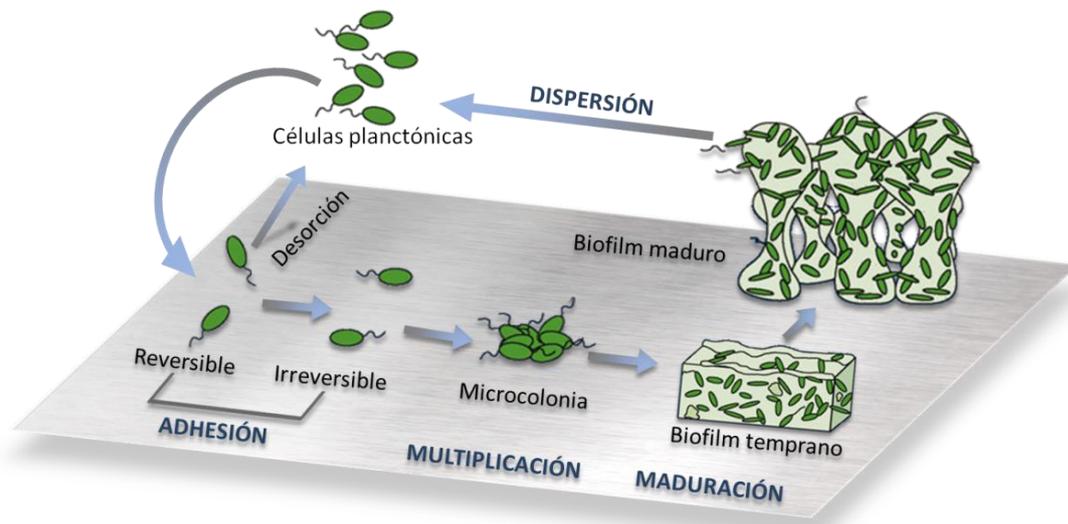


Figura 15. Esquema de la formación de un biofilm (adaptado de [Monds & O'Toole, 2009](#)).

Dentro del biofilm existe un gradiente creciente de adentro hacia afuera de nutrientes y oxígeno, de forma que las células que se encuentran en el exterior crecen a un ritmo mayor que las del interior. Este gradiente provoca diferentes expresiones génicas entre las bacterias creando diversidad fenotípica dentro del biofilm ([Vlamakis et al., 2008](#)). Dentro de esta heterogeneidad existe una fracción de células con baja tasa metabólica que se replican más lentamente. Este tipo de células son más resistentes a los antimicrobianos, y son capaces de revertir su estado al estado planctónico y comenzar el desarrollo de otro biofilm ([Kumar et al., 2017](#)).

### 7.2. RESISTENCIA DE LOS BIOFILMS

La formación de biofilms aumenta la resistencia y la persistencia de los microorganismos a los tratamientos de descontaminación ([Yang et al., 2018](#)). Esta resistencia se debe a múltiples causas tales como la impenetrabilidad del biofilm, la baja tasa de crecimiento de los microorganismos, que provoca la lenta absorción de los antimicrobianos, y otros mecanismos de resistencia, como la variabilidad en la expresión de los genes ([Donlan y Costerton, 2002](#)). Además, los biofilms retienen una gran

concentración de agua, lo cual les protege de la desecación ([Even et al., 2017](#)), y aumenta la transmisión horizontal de diversos genes entre bacterias, lo que les proporciona un mayor número de factores de virulencia ([Kumar et al., 2017](#)).

La matriz polimérica extracelular es una barrera física eficaz que protege a las células bacterianas de las agresiones externas ([Kumar et al., 2017](#)), ya que bloquea el paso de sustancias desinfectantes y atrapa algunas moléculas debido a fuerzas iónicas ([Ordóñez Pereda et al., 2014](#)). Las bacterias con alta capacidad de formación de biofilms y que además poseen resistencia a antibióticos suponen un peligro sanitario en la industria alimentaria, ya que son más resistentes a los procesos de limpieza y desinfección (L+D) gracias a la protección que les ofrece la matriz polimérica extracelular en la que se engloban. El aumento de la persistencia de los microorganismos que esta estructura les confiere no es lo único que determina su patogenicidad, sino que también supone un reservorio de bacterias con capacidad para producir contaminaciones cruzadas en diversos alimentos ([Bridier et al., 2015](#); [Ordóñez Pereda et al., 2014](#)).

Se ha observado que el efecto sinérgico de varias especies permite que los biofilms mixtos sean más resistentes que los biofilms de una sola especie ([Abee et al., 2011](#); [Burmølle et al., 2014](#)). La edad del biofilm también influye sobre la resistencia de este, ya que los biofilms maduros o de más edad son más resistentes que aquellos más jóvenes ([Da Silva Meira et al., 2012](#); [Nguyen y Yuk, 2013](#)).

Existen diversos estudios sobre la eficacia de diversos biocidas, descontaminantes y tratamientos para la eliminación de biofilms bacterianos sobre materiales que suelen encontrarse en las instalaciones de las industrias alimentarias ([Belessi et al., 2011](#)). Los resultados sugieren que la mejor técnica para la eliminación de biofilms es la utilización de tratamientos conjuntos ([Jessen y Lammert, 2003](#); [Kumar et al., 2017](#)). Actualmente, también se está investigando el uso de inhibidores del *quorum sensing* ([Turan et al., 2017](#)).

La eliminación de los biofilms es muy difícil, por lo que la prevención es la mejor estrategia. Retirar los restos de materia orgánica y limpiar de forma sistemática es el tratamiento más efectivo para impedir que las bacterias se adhieran de forma irreversible ([Rodríguez-Melcón et al., 2018](#); [Simões et al., 2010](#)).

### 8. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Un antibiótico es “una sustancia química capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causarles la muerte, por su acción bactericida, y que es producida por un ser vivo o fabricada por síntesis” ([RAE, 2014](#)). Es por ello que han sido ampliamente utilizados para la erradicación de infecciones bacterianas en humanos, animales e incluso en cultivos agrícolas.

Desde el descubrimiento de la penicilina, por Alexander Fleming en 1928, se han ido descubriendo y desarrollando nuevos antibióticos. Pero en la actualidad, la mayoría han generado resistencias y apenas se producen otros nuevos ([Frieri et al., 2017](#)). Según la OMS, OMPI y OMC ([2016](#)), “la resistencia a antibióticos ocurre cuando bacterias, parásitos, virus y hongos se hacen resistentes a los medicamentos antimicrobianos que se utilizan para tratar las infecciones que causan”.

La adquisición de resistencias por parte de las bacterias es inherente a ellas y les ha permitido sobrevivir hasta ahora, pero el uso de antibióticos de forma incorrecta o abusiva está aumentando su número ([Cox y Wright, 2013](#)). Este aumento se ha observado en diversos estudios, como en el de Alonso-Hernando *et al.* ([2012b](#)) donde se observó un aumento desde el 37% hasta el 96% de cepas de *Listeria* aisladas de pollo resistentes al menos a un antibiótico entre los años 1993 y 2006. Otro estudio ([Álvarez-Fernández et al., 2012](#)) también refleja en sus resultados un aumento en el número medio de antibióticos (del 3,98 al 5,00) a los que fueron resistentes diversas cepas de *Salmonella* aisladas de pollo entre los mismos años.

Las infecciones ocasionadas por microorganismos resistentes son más difíciles de erradicar, lo cual produce una mayor mortalidad y un aumento en el gasto sanitario debido al aumento en la duración de la enfermedad que ocasiona largos períodos de hospitalización ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#); [Cosgrove, 2006](#); [Laxminarayan et al., 2013](#)). En Europa, según un informe del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades junto con la Agencia Europea de Medicamentos ([ECDC-EMA, 2009](#)), el número de muertes en Europa asociadas a infecciones con patógenos resistentes asciende a 25.000, con un gasto de 1,5 billones de euros cada año en sanidad y por pérdidas en productividad. En España, el número estimado de muertes debidas a infecciones con estos

microorganismos cada año alcanza la cifra de 35.000 según la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica ([SEIMC, 2018](#)), lo que representa una quinta parte de todas las personas infectadas con bacterias resistentes.

Estas cifras van en aumento y, según un estudio de O'Neil ([2014](#)), el número de muertes en el mundo asociadas a infecciones con patógenos resistentes a antibióticos alcanzará los 10 millones al año en 2050, superando en 1,8 millones a las muertes provocadas por el cáncer. Esto supondrá entre 2014 y 2050 una pérdida de entre 60 y 100 trillones de dólares. En Europa, el número de muertes será de 390.000 según esta predicción. De hecho, en 2019 el número mundial de muertes asociadas a infecciones con patógenos resistentes a antibióticos fue de 1,27 millones de personas ([Murray et al., 2022](#)).

En la tabla 15 se detallan los porcentajes de microorganismos aislados resistentes a ciertos antibióticos en España y Europa según el último informe de la ECDC y OMS ([2022](#)). En algunos casos, resaltados en negrita, los porcentajes de España de determinados microorganismos resistentes son más elevados que la media europea como *Escherichia coli* resistente a aminopenicilinas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenos y a la combinación de fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª generación y aminoglucósidos; *Acinetobacter* spp. resistentes a fluoroquinolonas, aminoglucósidos, carbapenos y a la combinación de todos estos; *Streptococcus pneumoniae* resistente a la penicilina, macrólidos y a la combinación de ambos; *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, y *Enterococcus faecalis* resistente a la gentamicina.

**Tabla 15.** Porcentaje de los principales microorganismos patógenos que presentan resistencia a antibióticos en España y en Europa en 2020 ([ECDC y OMS, 2022](#))

Microorganismo	Antibiótico	España	Europa
<i>Escherichia coli</i>	Aminopenicilinas	<b>57,6</b>	54,6
	Fluoroquinolonas	<b>28,6</b>	23,8
	Cefalosporinas de 3ª generación	14,1	14,9
	Aminoglucósidos	<b>13,6</b>	10,9
	Carbapenos	<b>0,4</b>	0,2
	Fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª generación y aminoglucósidos	<b>6,3</b>	5,7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Fluoroquinolonas	25,7	33,8
	Cefalosporinas de 3ª generación	26,8	33,9
	Aminoglucósidos	20,2	23,7
	Carbapenos	4,7	10,0
	Fluoroquinolonas, cefalosporinas de 3ª generación y aminoglucósidos	16,4	21,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilina-tazobactam	11,0	18,8
	Fluoroquinolonas	18,1	19,6
	Ceftazidima	9,6	15,5
	Aminoglucósidos	8,7	9,4
	Carbapenos	16,6	17,8
	Piperacilina-tazobactam, fluoroquinolonas, ceftazidima, aminoglucósidos y carbapenos	9,1	12,1
<i>Acinetobacter spp.</i>	Fluoroquinolonas	<b>62,6</b>	41,8
	Aminoglucósidos	<b>53,8</b>	37,1
	Carbapenos	<b>61,5</b>	38,0
	Fluoroquinolonas, aminoglucósidos y carbapenos	<b>51,6</b>	34,1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina	<b>20,7</b>	15,6
	Macrólidos	<b>22,2</b>	16,9
	Penicilina y macrólidos	<b>11,8</b>	9,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Metilicina	<b>23,3</b>	16,7
<i>Enterococcus faecalis</i>	Gentamicina	<b>33,9</b>	29,0
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina	1,2	16,8

El aumento del número de resistencias se debe a diversas causas. En el aspecto clínico, la sobreprescripción de los antibióticos por parte de los facultativos, la utilización conjunta de varios antibióticos o de antibióticos de amplio espectro antes de identificar el patógeno a tratar ([Michael et al., 2014](#)) y el abuso o mal uso de los antibióticos por parte de los pacientes ([Zaman et al., 2017](#)) contribuyen a este proceso. La utilización de estos medicamentos en animales, no solo como terapéuticos sino también para su engorde y como profilaxis, ha contribuido al aumento de microorganismos resistentes en su microbiota, convirtiéndolos en reservorios de resistencias ([Nulty et al., 2016](#); [Teuber, 2001](#)). Además, el uso de antibióticos en agricultura para evitar enfermedades y de fertilizantes de origen animal también aumentan la propagación de estas bacterias ([Rather et al., 2017](#)), por ejemplo, en el suelo, donde se han hallado patógenos resistentes ([Cox y Wright, 2013](#)).

#### 8.1. DESARROLLO DE RESISTENCIAS A ANTIBIÓTICOS

El desarrollo de resistencias por parte de los microorganismos forma parte de su evolución natural y es el mecanismo que tienen para sobrevivir a los cambios del medio ([Rodríguez-Rojas et al., 2013](#)). Las bacterias adquieren las resistencias de diversos modos. En ocasiones, se producen mutaciones que favorecen la supervivencia de un determinado grupo frente a cambios ambientales. Aunque estos sucesos no se producen muy a menudo, el gran tamaño de las poblaciones bacterianas y su rápido ritmo de multiplicación, aumentan las probabilidades de que sucedan. Las bacterias también adquieren nuevos genes de forma horizontal mediante conjugación, traducción y transformación, que les confieren diversas características nuevas, como resistencias o mayor virulencia ([Michael et al., 2014](#)). La inclusión de una resistencia tiene un coste para la bacteria, así que suelen adquirirse cuando las condiciones son adversas y pueden proporcionarles una ventaja competitiva que justifique ese gasto. La pérdida de esa función también tiene un coste, por lo que las resistencias suelen mantenerse en el tiempo ([Courvalin, 2016](#)). Las bacterias que están más expuestas a antibióticos desarrollan más resistencias y más rápido debido a esa presión selectiva que permite solo la supervivencia de las que son más resistentes ([Michael et al., 2014](#)).

Los antibióticos pueden contaminar el medio ambiente y provocar reservorios de bacterias resistentes en el suelo o en el agua. Esto se debe a que muchos de ellos no se degradan una vez metabolizados y terminan, a través de los productos de desecho de los animales y humanos, en el medio ambiente ([Founou et al., 2016](#)). En un estudio de Guerrero-Ramos *et al.* ([2016a](#)) se aislaron 55 cepas del género *Enterococcus* de carne de caza silvestre y se observó que todas ellas eran multirresistentes a entre 3 y 10 antibióticos diferentes. La prevalencia de cepas de *Escherichia coli* y *Enterobacter faecalis* resistentes a antibióticos aisladas de carne de palomas domésticas y silvestres no presentó diferencias significativas entre ambos tipos en las investigaciones de Cordero *et al.* ([2019](#)). Esto deja patente la dispersión de microorganismos resistentes que llegan a los animales salvajes.

El gran número de personas que viven en la tierra y la globalización permiten a los organismos que nos infectan propagarse de manera amplia y muy rápida ([Michael et al., 2014](#)). A pesar de esto, existen ciertos microorganismos que no han adquirido resistencias a pesar de haber utilizado antibióticos contra ellos durante años, como es el caso de *Streptococcus pyogenes*, y otros cuyas resistencias se han reducido sin una causa aparente, como es el caso de algunos estafilococos ([Dubourg et al., 2017](#)).

### 8.2. RESISTENCIAS EN LA CADENA ALIMENTARIA Y EN CARNE

Dentro de la cadena alimentaria pueden producirse y propagarse microorganismos resistentes. Las causas son el uso de organismos modificados genéticamente, la adición de microorganismos de forma intencionada o el uso de sustancias antimicrobianas, como desinfectantes o conservantes, que ejercen una presión selectiva sobre los microorganismos de manera que estos generan resistencias no solo ante estos antimicrobianos sino también frente a los antibióticos ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#); [Capita et al., 2013](#); [Molina-González et al., 2014](#)). El aumento de resistencias debido al uso de dosis subinhibitorias de antimicrobianos, entre los que se incluyen los antibióticos, aumentan la capacidad de las bacterias para la transferencia genética horizontal de genes responsables de resistencias ([Jutkina et al., 2018](#)).

El uso de antibióticos en animales destinados al consumo los convierte en reservorios de bacterias resistentes. Esto provoca que puedan propagarse mediante

contacto directo, como el que tienen los operarios con los animales, o por contacto indirecto a través del consumo de carne u otros alimentos derivados ([Founou et al., 2016](#)). En España, una encuesta realizada a facultativos ([De Briyne et al., 2014](#)) revela que los antibióticos críticos para el ser humano que más se usan en animales destinados a alimentación humana son, en relación con el ganado vacuno, las penicilinas, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cefalosporinas de 3ª y 4ª generación y macrólidos, y para el ganado porcino son penicilinas, tetraciclinas, macrólidos, pleuromutilina y polimixina. La mayoría de los antibióticos citados en esta encuesta no son críticos para los seres humanos, específicamente un 74% en vacuno y un 80% en cerdos. Para asegurar que los productos de la industria cárnica son seguros es necesario la implementación de programas de vigilancia y control, además de la cooperación nacional e internacional ([Nulty et al., 2016](#)).

En relación a la carne y sus derivados, existen diversos estudios sobre la resistencia a antibióticos que presentan algunos microorganismos aislados de estos. En un estudio de Doménech et al. ([2015b](#)) se aisló *Salmonella* de carne picada de cerdo y pollo y se observó que un 41% de los aislados fue resistente a tres o más antibióticos. En otro, en el que se aisló *Salmonella* de carne de pollo fresca, un 60% de las cepas fue resistente a tres o más clases de antibióticos, siendo un 80% las que fueron resistentes a uno o más ([Zwe et al., 2018](#)). También, en relación a cepas de *Campylobacter* spp. aisladas de carne de pollo y pavo, el 70% mostró resistencia a un antibiótico y un 26% a más de uno ([Nobile et al., 2013](#)). En otro experimento, el resultado fue de casi un 92% de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollo multirresistentes a dos o más antibióticos ([Álvarez-Fernández et al., 2013](#)).

### 8.3. MEDIDAS ANTE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Aunque este problema no puede ser erradicado del todo ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)), el uso racional de los antibióticos por parte de la población ayudaría a reducir la incidencia de las resistencias ([Ramos et al., 2020](#); [Zaman et al., 2017](#)). El desarrollo de técnicas rápidas de detección puede ayudar a la reducción de la utilización de antibióticos de amplio espectro y, de este modo, utilizarlos de modo más sensato y dirigido hacia el

microorganismo específico que provoque la infección ([Founou et al., 2016](#); [Howard et al., 2013](#)).

Las industrias farmacéuticas no están dispuestas a desarrollar más antibióticos, ya que no les reporta los beneficios que esperan. Por ello, los gobiernos deberían establecer programas para un uso racional de los antibióticos y para políticas de desarrollo de nuevas terapias ([Dodds, 2017](#); [Inoue y Minghui, 2017](#)).

La vigilancia es una parte esencial en el control de este problema y en ella se debe incluir no solo aislados clínicos o de alimentos, sino también muestras del medio ambiente, ya que este puede convertirse en un reservorio de microorganismos resistentes ([Laxminarayan et al., 2013](#); [Roca et al., 2015](#)). Parte de estos microorganismos llegan al ser humano y al medio ambiente a través de los animales destinados al consumo, por lo que se debe reducir el uso de antibióticos sobre ellos y tratar de utilizar otras alternativas ([Founou et al., 2016](#); [Tang et al., 2017](#)). Otra parte, también esencial, es la investigación y el uso de métodos estandarizados en la industria alimentaria ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)).

Una de las medidas más simples y efectivas es el uso de buenas prácticas higiénicas, tales como lavarse las manos con frecuencia, entre la población, en los hospitales y en la industria alimentaria, lo que puede evitar la propagación de microorganismos y, por tanto, de las infecciones que provocan ([Howard et al., 2013](#)). Otro gran instrumento para evitar enfermedades y, de paso, el uso de antibióticos, son las vacunas ([Courvalin, 2016](#)). Actualmente se está estudiando el potencial de la nueva tecnología CRISPR para la inhibición de ciertos fragmentos del genoma que contienen genes que codifican para resistencias ([Dubourg et al., 2017](#)).

Debido a la propagación mundial de este tipo de microorganismos, solo una respuesta global puede dar una solución a este problema ([OMS, OMPI y OMC, 2016](#)). En 2015, la OMS adoptó el Plan de Acción Global sobre Resistencia a Antibióticos (GAP-AMR). Este plan tiene cinco objetivos principales: mejorar el conocimiento sobre los antibióticos, realizar más investigación para obtener más datos, reducir el número de infecciones, optimizar el uso de los antibióticos e invertir más en investigación, nuevas técnicas médicas y vacunas ([OMS, 2015a](#)). La FAO en el [2016](#) también desarrolló un plan sobre

resistencias a antibióticos enfocado a mejorar la conciencia sobre el uso de los antibióticos y sus posibles peligros, además de desarrollar programas de vigilancia, organización legal y buenas prácticas en alimentación y agricultura. Aunque todos estos esfuerzos serán en vano sin la cooperación de todos los implicados ([Tacconelli et al., 2018](#)).

#### 8.4. PRINCIPALES BACTERIAS PATÓGENAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

La mayoría de bacterias resistentes son Gram negativas ya que su pared celular le proporciona protección ante agentes externos ([Courvalin, 2016](#); [Raphael y Riley, 2017](#)). En la tabla 16 se enumeran de mayor a menor importancia bacterias patógenas resistentes a determinados antibióticos. Esta ordenación responde a criterios sobre su tratabilidad (tratamientos implicados y facilidad de realización de los mismos), la mortalidad que ocasionan, la carga que suponen en el cuidado de la salud, la tendencia y la prevalencia de su resistencia, la transmisibilidad de la resistencia, la carga en la comunidad, su posible prevención en el sistema sanitario, la información que existe sobre ellas y su prevención dentro de la comunidad ([OMS Pathogens priority list working group, 2018](#)).

**Tabla 16.** Ranking de los microorganismos patógenos con resistencias a antibióticos de mayor a menor importancia ([OMS Pathogens priority list working group, 2018](#))

Microorganismo	Resistente a
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenos
<i>Escherichia coli</i>	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Klebsiella</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Klebsiella</i> spp.	Carbapenos
<i>Enterobacter</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Serratia</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Proteus</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Enterobacter</i> spp.	Carbapenos
<i>Escherichia coli</i>	Carbapenos
<i>Providencia</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina
<i>Citrobacter</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Morganella</i> spp.	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina

<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas
<i>Salmonella</i> Typhi	Fluoroquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Fluoroquinolonas
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No susceptible a la penicilina
<i>Salmonella</i> no tifoidea	Fluoroquinolonas
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de 3ª generación
<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina

*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (EFRV) son dos patógenos Gram positivos con relevancia de acuerdo a la tabla 16. En relación a SARM, a pesar de que entre 2016 y 2020 el número de casos se ha reducido, en Europa sigue siendo un problema sanitario ya que todavía hay países con porcentajes elevados ([ECDC y OMS, 2022](#)) (figura 16). En España, cobra mayor importancia ya que el número de casos es superior a la media europea. Este patógeno puede ser un problema para personas inmunodeprimidas cuando está presente en alimentos ([Pesavento et al., 2007](#)). El porcentaje de EFRV ha aumentado del 11,6% al 16,8% entre 2016 y 2020, lo que supone un problema en Europa ([ECDC y OMS, 2022](#)) (figura 17). En España supuso un 1,2% durante 2020.

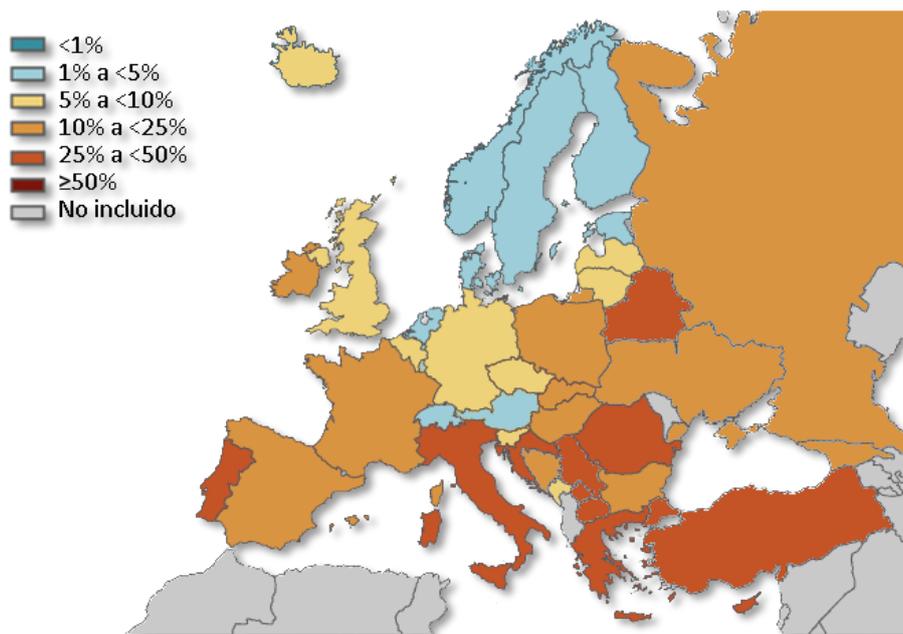


Figura 16. Porcentaje de cepas aisladas invasivas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en Europa en 2020 ([ECDC y OMS, 2022](#)).

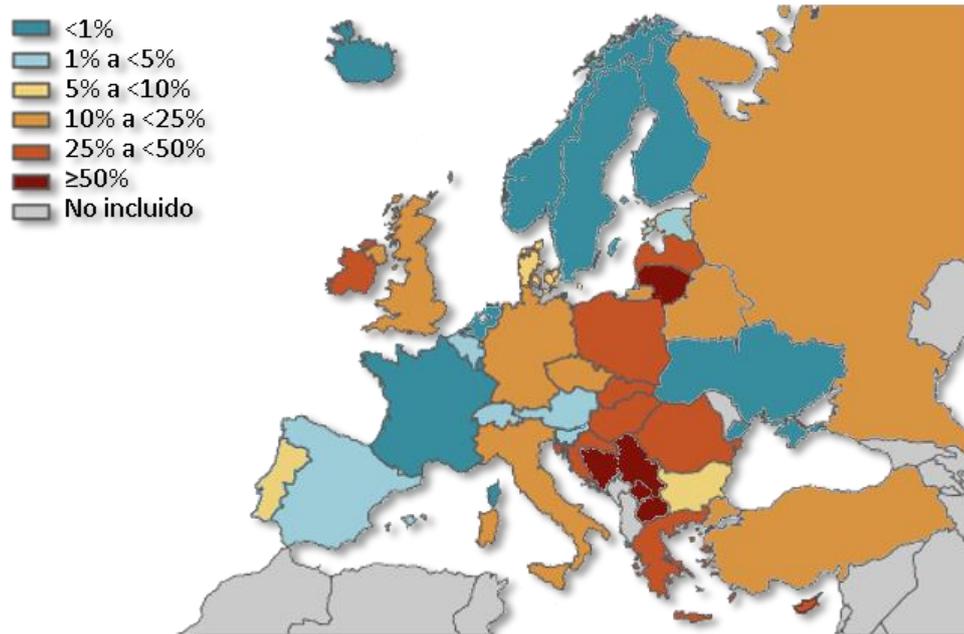


Figura 17. Porcentaje de cepas aisladas invasivas de *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina en 2020 en Europa ([ECDC y OMS, 2022](#)).

## 9. ENTEROBACTERIAS

Enterobacteriaceae es una familia heterogénea de bacilos Gram negativos que no forman esporas. Algunas de estas bacterias son móviles gracias a fimbrias y flagelos, mientras que otras no tienen movilidad. En términos generales, ya que existen géneros que no cumplen todas estas características, son catalasa positivos y oxidasa negativos, reducen el nitrato a nitrito y son capaces de fermentar la glucosa y otros azúcares, en algunos casos, con producción de gas. Generalmente, son anaerobios facultativos ([Farmer III et al., 2007](#); [Jenkins et al., 2017](#)).

Son microorganismos que se pueden encontrar en múltiples hábitats, tales como el suelo, el agua, en las plantas y en el intestino de algunos animales, incluyendo en el del ser humano ([Farmer III et al., 2007](#)). Debido a que forman parte de la flora intestinal, su presencia en determinados alimentos es indicador de contaminación con materia fecal ([Jenkins et al., 2017](#)). Existen ciertas especies patógenas como *Salmonella* y *Escherichia*

*coli*, que pueden transmitirse a través de la carne ([EFSA-ECDC, 2019](#)). Estos patógenos provocan enfermedades gastrointestinales que pueden complicarse y convertirse en infecciones extraintestinales ([Farmer III et al., 2007](#)). La presencia de gran cantidad de enterobacterias en productos cárnicos explica una manipulación no higiénica y/o una conservación inadecuada, lo que favorece la proliferación de estas bacterias ([Stiles y Ng, 1981](#)). En el Reglamento (CE) nº 2073/2005 se definen los límites de enterobacterias, *Escherichia coli* y *Salmonella* que pueden estar presentes en las canales, carne y derivados (tabla 13).

Actualmente, esta familia engloba 51 géneros según la web [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net), de los cuales los principales géneros patógenos que producen infecciones intestinales relacionados con la carne son *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* ([EFSA-ECDC, 2019](#); [OMS, 2015b](#)).

### *Escherichia*

En este género se incluyen cepas móviles y no móviles que suelen encontrarse en el tracto intestinal humano. La especie tipo es *Escherichia coli*, la cual es considerada un indicador de contaminación fecal. Algunas cepas pueden causar, además de las diarreas típicas de las infecciones intestinales, infecciones en el tracto urinario, meningitis y bacteriemia que pueden terminar en sepsis y shock séptico ([Kaper et al., 2004](#); [Nataro et al., 2007](#)).

Existen diversos tipos de *Escherichia coli* diarreogénica, pero las que provocan más brotes son *Escherichia coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) ([OMS, 2015b](#)). Los serogrupos más virulentos de STEC son O157:H7 y O26. El serotipo O157 se encuentra en el intestino del ganado vacuno, tanto en las que son destinadas para leche como para las que son destinadas para carne, y a través de su estiércol pueden llegar al suelo, al agua y a las plantas. Además, este serotipo se propaga fácilmente entre personas ya que no requiere de grandes dosis infectivas ([Nataro et al., 2007](#)).

### *Salmonella*

Algunas cepas de *Salmonella* son no móviles, aunque la mayoría sí lo son. No fermentan la lactosa ni la urea, pero metabolizan el citrato y producen ácido sulfhídrico. Este género contiene dos especies, *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*. La subespecie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* suele formar parte de la microbiota intestinal en humanos y animales de sangre caliente y es la que provoca las infecciones en el ser humano. Dentro de esta subespecie existen cepas no tifoideas que son las que causan las infecciones intestinales y, en ocasiones, infecciones extraintestinales generalmente en personas inmunodeprimidas. Debido a que esta bacteria se encuentra en animales, suele encontrarse en alimentos que han tenido contacto con animales de forma directa o indirecta ([Jenkins et al., 2017](#); [Nataro et al., 2007](#)). El serotipo *Salmonella* Typhi se encuentra solo en humanos ([Farmer III et al., 2007](#)), por lo que se transmite de persona a persona, a través del agua o de alimentos contaminados con heces, y puede llegar a provocar fiebres tifoideas caracterizadas por infecciones sanguíneas. *Salmonella* Paratyphi también provoca una enfermedad con síntomas similares a los que provoca *S. Typhi* ([Nataro et al., 2007](#)).

### *Shigella*

Son bacterias no móviles que no forman gas durante la fermentación de los carbohidratos. Son muy similares a *Escherichia coli* y se diferencian de esta en que son microorganismos en cierto grado anaeróbicos. La especie tipo es *Shigella dysenteriae*. Este género se encuentra en el intestino de humanos y grandes primates, de manera que el modo de propagarse suele ser mediante contacto persona-persona y por prácticas poco higiénicas. Este patógeno provoca diarreas y, en muchos casos, disentería debida a la toxina Shiga que produce. Además, puede llegar a causar síndrome urémico hemolítico ([Jenkins et al., 2017](#); [Nataro et al., 2007](#)).

### *Yersinia*

Este género engloba bacilos más pequeños que el resto de enterobacterias. Son móviles a temperatura ambiente pero no a 37 °C, excepto *Yersinia pestis*, que no es móvil. Las tres especies más patógenas de este grupo, *Y. pestis*, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, contienen un plásmido con factores de virulencia. Además, *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* contienen genes para la producción de

enterotoxinas que pueden provocar infecciones gastrointestinales. *Yersinia enterocolitica* se encuentra, además de en los humanos, animales y medio ambiente, en el cerdo, por lo que es habitual aislarla de carne cruda o de preparados cárnicos de este animal. Es por ello que la carne de cerdo puede provocar infecciones gastrointestinales si se consume cruda o mal cocinada ([Jenkins et al., 2017](#); [Wanger, 2007](#)).

### 10. ENTEROCOCOS

El género *Enterococcus* incluye cocos Gram positivo catalasa negativos que son anaerobios facultativos con metabolismo homofermentativo capaces de fermentar la glucosa a ácido láctico. También son capaces de hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares y suelen agruparse en parejas o formando cadenas cortas. Su temperatura óptima de crecimiento es 35 °C, aunque el rango de temperatura abarca de los 10 °C a los 45 °C ([Teixeira et al., 2007](#)). Además, pueden crecer en un amplio rango de pH y de salinidad, lo que los convierte en organismos muy resistentes que pueden sobrevivir bajo múltiples factores de estrés ([Ramsey et al., 2014](#)). No solo son muy resistentes, sino que también intercambian material genético de forma habitual, lo que provoca la aparición de resistencias que pueden dotarlos de una mayor virulencia ([Ramos et al., 2020](#); [Santagati et al., 2012](#); [Werner et al., 2013](#)).

Hace años, este género se incluía dentro del género *Streptococcus*, pero nuevos estudios genéticos han concluido que son géneros separados ([Schleifer y Kilpper-Bälz, 1987](#)). El genotipo de cada especie de este género suele mostrar afinidad a su hospedador habitual ([Santagati et al., 2012](#)).

Estos microorganismos que forman parte de la microbiota del tracto intestinal humano, y del de otros animales como insectos, anfibios, reptiles, aves y mamíferos ([Byappanahalli et al., 2012](#); [Collins et al., 1986](#); [Švec et al., 2006](#)), también pueden encontrarse en el suelo, en las plantas y en el agua ([Byappanahalli et al., 2012](#)).

Generalmente, las 60 especies de este género no son muy virulentas ([www.bacterio.net](http://www.bacterio.net)), pero en personas de edad avanzada o inmunodeprimidas pueden provocar infecciones graves e incluso la muerte ([Teixeira et al., 2007](#)). El tipo de infección que más provocan son de tipo nosocomial ([Piedrahíta, 2001](#); [Ramos et al., 2020](#)) y las

especies que causan la mayoría de ellas son *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* ([ECDC y OMS, 2022](#)).

Este grupo también establece la calidad higiénica de alimentos y del agua, ya que son indicadores de contaminación fecal. En este género de bacterias también hay especies que actúan durante la fermentación de algunos quesos producidos en la cuenca mediterránea, ya que tienen actividad proteolítica, y en la fermentación de salchichas y carne curada ([Foulquié Moreno et al., 2006](#)). Generalmente, se encuentran en estos alimentos de forma natural, pero en algunos casos pueden añadirse intencionadamente. Por ejemplo, algunas cepas de *Enterococcus faecium* se usan en piensos destinados a animales como aditivo alimentario ([EFSA, 2016](#)). Este tipo de microorganismos también pueden actuar como probióticos ([Foulquié Moreno et al., 2006](#)).

La presencia de estos microorganismos en los animales explica que sean parte de la microbiota o microflora habitual de la carne y productos derivados, aunque no hay una legislación que defina un límite máximo para estos microorganismos en carne, como sí que existe para el agua envasada en el Real Decreto 1799/2010.





**OBJETIVOS**

---



## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

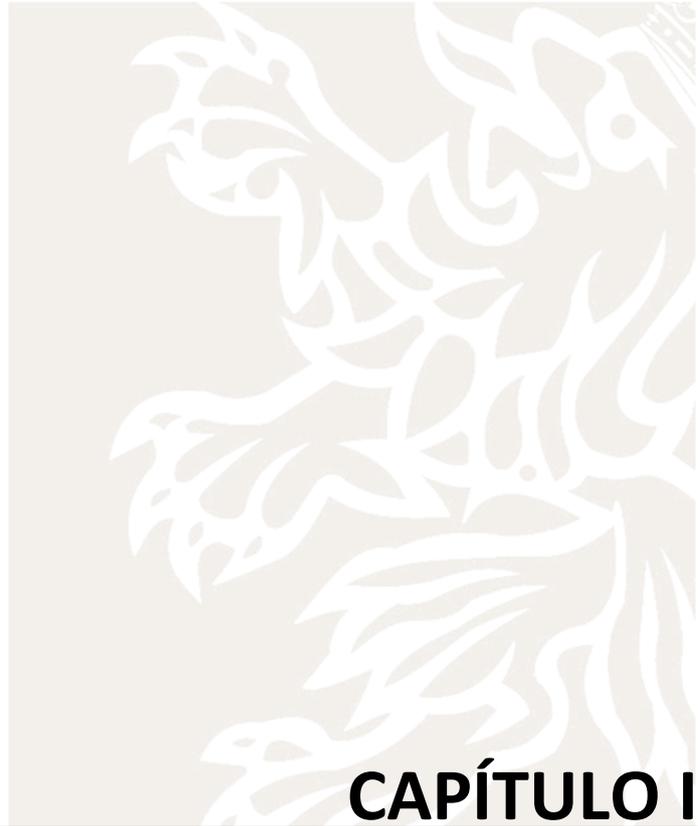
Estudiar diferentes parámetros de calidad microbiológica, físico-química y organoléptica en carne y productos cárnicos de diferentes especies de animales de abasto que influyen en su comercialización y venta. Prestando especial atención a los tratamientos de descontaminación de la carne en vacuno y conejos y, al aislamiento y caracterización de enterobacterias y enterococos, considerando en los aislamientos procedentes de ambos grupos microbianos el perfil de resistencia a antibióticos y su potencial formación de biofilms.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

La presente Tesis Doctoral trata de determinar:

1. Si la prevalencia y/o niveles de contaminación con microorganismos patógenos e indicadores de falta de higiene en carne y preparados cárnicos se ajusta a la normativa vigente.
2. Si el uso de diferentes tratamientos químicos de descontaminación:
  - 2.1. reduce significativamente los niveles microbianos de la carne, tanto inmediatamente después del tratamiento como a lo largo del almacenamiento en refrigeración.
  - 2.2. no modifica los parámetros de color instrumental de la superficie de la carne.
  - 2.3. no modifica las características sensoriales de la carne.
3. Si las cepas microbianas aisladas de preparados cárnicos presentan características fenotípicas y/o genotípicas de especial interés en Salud Pública.





## **CAPÍTULO I**

---

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÁCIDO LÁCTICO AL 4%,  
ÁCIDO CÍTRICO AL 2% Y AL 4%, Y FOSFATO TRISÓDICO  
AL 10% SOBRE CARNE DE VACUNO



## **CAPÍTULO I. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ÁCIDO LÁCTICO AL 4%, ÁCIDO CÍTRICO AL 2% Y AL 4%, Y FOSFATO TRISÓDICO AL 10% SOBRE CARNE DE VACUNO**

En este capítulo se pretende determinar el efecto de varios descontaminantes (ácido láctico (4%), ácido cítrico (2% y 4%) y fosfato trisódico (10%)) sobre la calidad microbiológica y sensorial en carne de vacuno. Se recogieron 13 muestras del cuello de canales de vacuno de un matadero de León destinadas al análisis microbiológico, de pH, análisis sensorial y color instrumental. Estos análisis se realizaron tanto el día del tratamiento como los días 1, 3 y 6 posteriores. Antes de tratar estas piezas, se determinó la calidad higiénica de la carne mediante el análisis de la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. y el recuento de *Staphylococcus aureus*. Una vez tratadas, se determinó la carga de la microbiota aerobia mesófila viable, la flora psicrotrofa, *Pseudomonas*, *Pseudomonas* fluorescentes, micrococos, coliformes fecales, enterobacterias, enterococos y bacterias ácido lácticas en la superficie de una pieza de carne de 28 cm<sup>2</sup>. Además, se midió el pH. Mediante un panel de cata se valoró el color, el olor y la aceptabilidad general en una escala del 1 al 9. En la determinación instrumental del color se utilizó un espectrocolorímetro para medir los parámetros del sistema CIE L\*a\*b\* del color. En términos generales, los tratamientos analizados redujeron la carga microbiana, siendo el tratamiento con ácido cítrico al 2% el más eficaz. La carne tratada con fosfato trisódico mostró una calidad sensorial similar a las muestras sin tratar el día del tratamiento, pero a lo largo del tiempo fue el ácido cítrico al 2% el que obtuvo las puntuaciones más altas. El ácido láctico no mostró mejorar la calidad sensorial de la carne, ya que produjo zonas anómalas similares a carne cocida. En cuanto al color, las muestras tratadas con ácidos orgánicos mostraron más luminosidad que las no tratadas. La carne fresca de vacuno presentó una baja calidad microbiológica, lo que supone un riesgo para la salud de los consumidores. A pesar de su eficacia, el uso de estos tratamientos nunca debe ser un sustituto de las buenas prácticas de higiene.

## INTRODUCCIÓN

Durante 2021, la producción de carne de vacuno superó los 72 millones de toneladas, un 20,3% del total de carne producida ([FAOSTAT](#)). En España, la producción de este tipo de carne en 2021 alcanzó los 718 miles de toneladas ([FAOSTAT](#)), un 9,4% del total, y el consumo ascendió a 4,75 kilogramos per cápita durante 2021 ([MAPA, 2022e](#)). Fue la carne más consumida tras la carne de pollo y cerdo.

El consumo de carne de vacuno, y de la carne en general, puede ser un riesgo para los consumidores debido a la presencia de bacterias patógenas tales como *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* patógena ([EFSA-ECDC, 2022](#); [OMS, 2015b](#); [RASFF, 2021](#)). Para aumentar la seguridad respecto a este alimento, la Unión Europea publicó el Reglamento (CE) nº 853/2004, de 29 de abril, en el que se establecen las normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, así como los criterios microbiológicos permitidos en el Reglamento (CE) nº 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.

Además, la carne puede contener bacterias alterantes cuya actividad metabólica y crecimiento provoca su deterioro, reduciendo la calidad y la aceptación desde el punto de vista de los consumidores ([Henchion et al., 2017](#)). Para determinar la calidad microbiológica de la carne se analiza la carga de determinados grupos microbianos, como los mesófilos aerobios, los microorganismos psicrotrofos, las enterobacterias o los enterococos, que son indicadores de contaminación o marcadores higiénicos en carne que ha sufrido prácticas no higiénicas o manipulaciones inadecuadas ([Jenkins et al., 2017](#); [Rodríguez-Melcón et al., 2017](#); [Stiles y Ng, 1981](#); [Teixeira et al., 2007](#)).

Para reducir la carga microbiana en la superficie de la carne pueden utilizarse diversos tratamientos descontaminantes tales como soluciones de ácidos orgánicos, como el ácido láctico o el ácido cítrico, o de fosfato trisódico ([Bolder, 1997](#); [Moreno García, 2006](#)). De hecho, en la Unión Europea, el Reglamento (UE) nº 101/2013, de 4 de febrero, relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos, autoriza el uso de ácido láctico entre el 2 y el 5% sobre la superficie de las canales, incluyendo medios y cuartos, en los mataderos.

El uso de antimicrobianos puede modificar el pH de la carne ([Del Río et al., 2007a](#), [2007b](#)), de hecho, el modo de acción de los ácidos orgánicos es provocar un descenso de pH que inhibe el crecimiento bacteriano ([Moreno García, 2006](#); [Rajkovic et al., 2010](#)). También puede provocar cambios organolépticos como cambios en el color ([Pohlman et al., 2002a](#), [2002b](#)), que es uno de los atributos que más influyen en los consumidores a la hora de comprar carne ([Banović et al., 2009](#); [Grunert et al., 2004](#); [Henchion et al., 2017](#); [Merlino et al., 2018](#)).

El pigmento responsable del color de la carne de vacuno es la mioglobina ([Mancini y Hunt, 2005](#)). Las variaciones que se producen en esta molécula debido a reacciones de oxido-reducción por el contacto con el oxígeno, se traduce en las típicas tonalidades de la carne que varían entre el rojo pardo, rojo cereza y púrpura ([Mancini y Hunt, 2005](#); [Ordóñez Pereda et al., 1998](#)).

Otros autores ([DeGeer et al., 2016](#); [Kassem et al., 2017](#); [Pohlman et al., 2002a](#), [2002b](#); [Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)) han estudiado el efecto sobre la carga microbiana de diversos tratamientos descontaminantes en carne de vacuno. También existen estudios ([Jiménez-Villarreal et al., 2003a](#), [2003b](#)) sobre el efecto de estos tratamientos sobre la calidad sensorial de la carne, incluyendo el color. Otros estudios determinan el efecto de la aplicación de un tratamiento descontaminante en la superficie de la carne sobre la carga microbiana junto con el efecto sobre la calidad sensorial y el color de la carne ([Kassem et al., 2017](#); [Pohlman et al., 2002a](#), [2002b](#); [Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)).

Con este trabajo se pretende determinar los niveles de *Staphylococcus aureus*, así como la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* en la superficie de carne fresca de vacuno y si el uso de ácido láctico (4%), ácido cítrico (2% y 4%) y fosfato trisódico (10%) reduce significativamente los niveles microbianos de la superficie de la carne, tanto inmediatamente después del tratamiento como a lo largo del almacenamiento en refrigeración (7 °C) durante 6 días. Además, se mide el efecto de estos tratamientos sobre los parámetros de color instrumental y las características sensoriales de la superficie de la carne.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizó el efecto del fosfato trisódico, ácido láctico y ácido cítrico sobre la calidad microbiológica y sensorial de la superficie de carne de vacuno basándose en los estudios de del Río *et al.* (2007b) y de Rodríguez-Melcón *et al.* (2017).

En relación a la calidad microbiológica, se determinó la presencia de patógenos antes del tratamiento y se analizaron, una vez aplicadas las soluciones, la microbiota aerobia mesófila viable, la flora psicrotrofa, *Pseudomonas*, *Pseudomonas* fluorescentes, micrococos, coliformes fecales, enterobacterias, enterococos y bacterias ácido lácticas. Para determinar la calidad organoléptica se realizó un análisis sensorial sobre el olor, el color y la aceptabilidad general en un panel de cata y se midió el color instrumental.

Para estudiar la evolución de la carne tras el tratamiento, estos análisis fueron realizados en los días 0, 1, 3 y 6. Mientras duró el estudio, las piezas de carne se almacenaron a 4°C en contenedores de plástico opacos, previamente desinfectados con alcohol de quemar.

### Recogida de carne cruda de vacuno

El día 0 se realizó la recogida de la carne en el matadero. Para ello, se cortó de manera estéril una pieza de la parte izquierda del cuello de la canal (unos 200 cm<sup>2</sup>) y otra de tamaño similar de la parte derecha del cuello de la misma. Cada canal se consideró una muestra (13 muestras). De esta manera, de cada muestra o canal se obtuvieron dos piezas. Una pieza se utilizó para realizar el análisis microbiológico y medir el pH, mientras que sobre la otra se realizaron el análisis sensorial y la medición del color.

De las piezas de carne se eliminaron las fascias y las capas de grasa, en los casos en que estuviesen presentes, con la ayuda de un bisturí y unas pinzas estériles. La preparación de la carne evita que capas diferentes al músculo interfieran en el análisis del color y homogeneiza la superficie de la carne permitiendo que el tratamiento penetre de igual modo en todas las zonas para que los análisis microbiológicos sean representativos.

## Aislamiento de bacterias patógenas

Antes de tratar la carne con las soluciones descontaminantes, de la pieza destinada para el análisis microbiológico y la medición del pH, se aislaron *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus*. Estos patógenos son frecuentes en la industria alimentaria y su análisis proporciona una idea general de la contaminación inicial de la carne.

DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* (Basado en la norma EN ISO 11290-1:2017 ([Asociación Española de Normalización y Certificación \[AENOR\], 2017b](#)))

Tras la recogida de la carne en el matadero se recortó un trozo de carne de 25 cm<sup>2</sup> en condiciones estériles y se homogeneizó en 225 mL de caldo Fraser semi (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) (1:10) durante 2 minutos en el Stomacher (Masticator Silver Panoramic; 9000520; IUL, Barcelona, España). La bolsa se dejó incubando durante 24 horas a 30 °C. Este paso preliminar constituyó el preenriquecimiento. Después, se añadieron 0,1 mL del caldo incubado a un tubo con 10 mL de caldo Fraser completo (Oxoid Ltd., Wesel, Alemania) y se dejó 24 horas incubando a 37 °C. Cuando terminó la incubación, el caldo fue sembrado en estría sobre medio cromogénico para *Listeria* (OCLA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y sobre medio PALCAM (Oxoid Ltd., Wesel, Alemania). Para ambos medios, la incubación fue de 48 horas a 35 °C. Transcurrido este tiempo se determinó si las colonias crecidas eran *Listeria monocytogenes*. En medio OCLA las colonias crecieron de color verde brillante con halo transparente, mientras que en medio PALCAM crecieron de color amarillo oscuro y halo también oscuro.

DETECCIÓN Y AISLAMIENTO DE *Salmonella* spp. (Basado en la norma EN ISO 6579-1:2017 ([AENOR, 2017a](#)))

Este análisis comenzó con el preenriquecimiento. Para ello, se homogeneizó un trozo de carne de 25 cm<sup>2</sup> en condiciones estériles junto con 225 mL de agua de peptona tamponada (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) (1:10) durante 2 minutos y se incubó durante 24 horas a 41,5 °C. Finalizada la incubación, se añadieron 0,1 mL de la muestra a tubos con 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RVS; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Los tubos se incubaron durante 24 horas a 41,5 °C. Por último, se

sembró en estría por agotamiento en placas con medio Rambach (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C y se anotó la ausencia o presencia de colonias de *Salmonella*, las cuales presentan color fucsia en este medio.

#### RECUESTO DE *Staphylococcus aureus* ([Lancette y Tatini, 1992](#))

Para el recuento de *Staphylococcus aureus* se cortó un trozo de carne de 25 cm<sup>2</sup> y se añadió a 25 mL de agua de peptona (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) al 0,1%, en relación 1:1. Después se homogeneizó y se sembraron 0,1 mL en superficie sobre medio Baird-Parker (BP; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) adicionado con telurito-yema de huevo (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) por duplicado. Una vez sembrado, se incubó durante 48 horas a 37 °C. Tras la incubación se realizó el recuento de las colonias negras con halo transparente.

#### **Tratamiento**

Cada muestra, compuesta por dos piezas de carne, fue sometida a un tratamiento diferente con soluciones acuosas de ácido láctico (AL; 4%; Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania), ácido cítrico (AC; 2% y 4%; Panreac, Castellar del Vallés, Barcelona, España) y fosfato trisódico (FT; 10%; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Una muestra no fue tratada para hacer de control (C). Las soluciones se prepararon con agua del grifo, ya que es lo habitual en los mataderos, esterilizada con anterioridad. Los tratamientos se realizaron por triplicado, excepto en el caso de los tratamientos con ácido cítrico, tanto al 2% como al 4%, que se realizaron por duplicado.

Cada cm<sup>2</sup> de carne fue tratado con 0,1 mL de solución del tratamiento correspondiente. La cantidad exacta de la solución, contenida en un spray, se pulverizó sobre la pieza de carne colocada en posición vertical sobre papel de filtro hasta vaciar el spray. Después, se dejó la pieza durante 1 minuto en posición vertical para que lo sobrante escurriera y el tratamiento penetrara.

Durante el tratamiento se midió tanto la temperatura ambiente como la de la solución sobrante, con un termómetro digital (30.1018; TFA Dostmann, Wertheim, Alemania), y el pH, con un pH-metro (Crison pH25; Crison Instruments SA, España). La

temperatura ambiental fue de  $22,5 \pm 0,7$  °C y la temperatura de cada solución fue la siguiente:  $23,0 \pm 4,2$  °C (AL; 4%),  $24,2 \pm 0,2$  °C (AC; 2%),  $23,3 \pm 1,1$  °C (AC; 4%) y  $22,8 \pm 1,2$  °C (FT; 10%). Los resultados de pH fueron:  $2,1 \pm 0,04$  (AL; 4%),  $2,1 \pm 0,01$  (AC; 2%),  $1,8 \pm 0,06$  (AC; 4%) y  $12,3 \pm 0,07$  (FT; 10%).

### **Análisis microbiológico y pH**

Estas determinaciones se realizaron los días 0, 1, 3 y 6 después del tratamiento.

#### **Análisis microbiológico**

Se cortó una pieza de carne de cada muestra de 28 cm<sup>2</sup> con ayuda de un molde circular de metal, un bisturí y una pinza, todos ellos estériles. Se homogeneizó durante 2 minutos en 28 mL de agua de peptona al 0,01% estéril en relación 1:1. Este homogeneizado se consideró la dilución 0. A partir de la dilución 0 se realizaron 5 diluciones decimales en agua de peptona estéril al 0,1%.

Mediante siembra en superficie (0,1 mL) por duplicado se determinó la carga microbiana de los siguientes microorganismos: microbiota aerobia mesófila viable o mesófilos (agar de recuento estándar (PCA); Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), psicrotrofos (PCA), *Pseudomonas* y *Pseudomonas* fluorescentes (*Pseudomonas* agar; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y micrococos (agar manitol salado (MSA); Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).

Las placas se incubaron a las temperaturas y los tiempos indicados en la tabla 17 para cada tipo de microorganismo.

Mediante siembra en profundidad (1 mL) por duplicado se realizaron los recuentos de los siguientes grupos microbianos tras la incubación a las temperaturas y tiempos indicados en la tabla 17: coliformes fecales (agar violeta rojo bilis (VRBA); Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), enterobacterias (agar violeta rojo bilis glucosa (VRBGA); Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), enterococos (agar kanamicina esculina azida (KAA); Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y bacterias ácido lácticas (agar de Man, Rogosa y Sharpe (MRS); Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).

Tabla 17. Temperaturas y tiempos de incubación para determinar los recuentos de diversos grupos microbianos

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo (horas)	Bibliografía
Flora aerobia viable	PCA	30 °C	72	(Jay, 2002)
Psicrotrofos	PCA	7 °C	10 días	(Cousin <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> agar	25 °C	48	(Anónimo, 1990)
Micrococos	MSA	35 °C	48	(Anónimo, 1990)
Coliformes fecales	VRBA	45 °C	24	(Baird <i>et al.</i> , 1987)
Enterobacterias	VRBGA	35 °C	24	(Baird <i>et al.</i> , 1987)
Enterococos	KAA	41,5 °C	24	(Baird <i>et al.</i> , 1987)
Bacterias ácido lácticas	MRS	30 °C	72	(Baird <i>et al.</i> , 1987)

Una vez finalizada la incubación de las placas se realizó el recuento de las ufc (unidades formadoras de colonias) de cada placa y se realizaron los cálculos pertinentes para determinar el número de  $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup> en la superficie cárnica. El recuento de *Pseudomonas* fluorescentes se realizó colocando las placas de *Pseudomonas* sobre una lámpara de rayos ultravioleta en una habitación oscura para contabilizar las colonias que emitían fluorescencia.

### Determinación del pH

Una vez que se terminaron las siembras se midió el pH del contenido sobrante de la dilución 0 con la ayuda de un pH-metro.

### Análisis sensorial y de color

El tratamiento dado a las piezas destinadas al análisis sensorial y de color fue idéntico y se llevó a cabo al mismo tiempo que en el caso de las piezas destinadas para los análisis microbiológicos y del pH.

### Análisis sensorial

Los días 0, 1, 3 y 6 se realizó el análisis sensorial mediante un panel de cata de entre 6 y 8 catadores dependiendo de su disponibilidad. En este análisis hedónico se midió el color, el olor y la aceptabilidad general en una escala del 1 al 9, siendo el 1 la puntuación correspondiente a un menor agrado por la carne y 9, el mayor (figura 18). Una vez realizado, se calculó la media de los tres parámetros para cada día y muestra.

SENSORIAL Día -----		Fecha: _____							
Muestra: _____									
Catador: _____									
COLOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9
OLOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9
ACEPTABILIDAD GENERAL	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Figura 18. Ficha utilizada para realizar el análisis organoléptico.

### Análisis color

Los días de análisis (0, 1, 3 y 6) se midió el color de la carne en 5 puntos distintos con un espectrocolorímetro (CM-700d; Minolta, Osaka, Japón) calibrado previamente sobre un estándar blanco. Las variables fijadas fueron D65 para la iluminación, modo SCI, tamaño de la apertura de 11 mm para la iluminación y 8 mm para la medida y con un ángulo de observación de 10°. Así se obtuvieron los parámetros  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  del espacio del color CIE  $L^*a^*b^*$ . De cada parámetro se realizó la media de los 5 puntos y, a partir de los valores de  $a^*$  y  $b^*$ , se calculó la saturación ( $c^*$ ) y el matiz ( $h^*$ ) mediante estas fórmulas:  $c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  y  $h^* = \arctan (b^* / a^*)$ .

### Análisis estadístico

Las medias obtenidas de los recuentos entre los diversos tratamientos para los mismos días se compararon mediante el test de Student-Newman-Keuls utilizando el software estadístico IBM® SPSS® Statistics para Windows, Versión 24.0 (IBM Corp., Armonk, New York, EE.UU.). En el caso del análisis sensorial y del análisis de color se hizo la comparación de medias mediante un análisis de varianza seguida del test de Duncan con el mismo software estadístico, entre distintos días y tratamientos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que se han simulado las condiciones normales de aplicación de un matadero, como el uso de agua del grifo, los resultados obtenidos en laboratorio podrían diferir de los obtenidos en el matadero. Respecto del modo de aplicación del tratamiento, en otros estudios también se ha pulverizado sobre la superficie de la carne ([DeGeer et al., 2016](#)). Otros autores han probado técnicas diferentes tales como sumergir la pieza de carne directamente en la solución tratante ([Kassem et al., 2017](#)) o mezclar la carne con el tratamiento ([Jiménez-Villarreal et al., 2003a](#)). En otros estudios, se inoculó la carne de vacuno con algún microorganismo alterante o patógeno previamente al tratamiento con ácido láctico, ácido cítrico o fosfato trisódico ([DeGeer et al., 2016](#); [Min et al., 2007](#); [Pohlman et al., 2002a, 2002b](#)).

Se ha estudiado el efecto del tratamiento de carne de vacuno con ácido cítrico ([Ke et al., 2009](#)) y del ácido cítrico sobre el efecto sobre el color de las vértebras ([Mancini et al., 2007](#)), pero existen pocos estudios sobre su efecto en la calidad microbiológica ([Dias-Morse et al., 2015](#)). La acción de este compuesto sobre la carga microbiana en carne de vacuno ha sido analizada someramente, ya que la mayoría de estudios versan sobre el efecto de este compuesto en carne de pollo ([Alonso-Hernando et al., 2013c, 2015](#)).

La concentración de ácido láctico utilizada fue 4%, ya que es la que tiene mejor efecto sobre carne de vacuno ([DeGeer et al., 2016](#); [Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)). Puesto que esta concentración es la que más reduce la carga microbiana con la menor alteración en la apariencia de la carne.

### Bacterias patógenas aisladas

La calidad higiénica inicial de la carne se determinó con el análisis de la presencia de bacterias patógenas en su superficie. En un 7,7% de las muestras se detectó la presencia de *Listeria monocytogenes*, y en un 23,1%, *Salmonella* spp. En relación a *Staphylococcus aureus*, el promedio de los recuentos fue  $2,70 \pm 1,06 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$  (media  $\pm$  desviación estándar). El recuento mínimo fue  $1,48 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$  y el máximo  $4,79 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ .

La presencia de *Listeria monocytogenes* en la superficie de la carne no conlleva un riesgo sanitario, puesto que se destruye una vez que la carne es cocinada. En cambio, la presencia en un 23,1% de las muestras de especies de *Salmonella* supone un riesgo sobre la salud, ya que, según el Reglamento (CE) nº 2073/2005, en canales bovinas el límite de este patógeno es ausencia en la zona examinada de la canal (tabla 13). Otro estudio analizó diversos puntos críticos en una compañía cárnica europea, estudiando tanto canales de vacuno como piezas de carne fresca ([Luning et al., 2011](#)). Los resultados mostraron ausencia en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., a diferencia de nuestro estudio.

### **Recuentos microbiológicos**

En la tabla 19 se observa que, excepto para coliformes, enterococos, bacterias ácido lácticas y micrococos, los tratamientos aplicados fueron efectivos tras la aplicación, reduciendo la carga microbiana de forma significativa ( $P < 0,05$ ) respecto de las muestras no tratadas. Al igual que la reducción de enterobacterias en carne de vacuno tratada con ácido láctico presentada en el estudio de Rodríguez-Melcón *et al.* ([2017](#)).

En el caso del recuento de *Pseudomonas* fluorescentes se observó una amplia dispersión de los datos que podría deberse a la dificultad del recuento con luz ultravioleta.

La eficacia de los tratamientos de descontaminación sobre carne de vacuno se muestra en otros estudios tales como el de Kassem *et al.* ([2017](#)). En él se determinó que tanto el ácido cítrico, como el ácido láctico y el fosfato trisódico son eficaces para reducir la cantidad de la microbiota o flora aerobia total. Los recuentos de la flora aerobia viable alcanzan valores similares a los aquí obtenidos ( $3,3 \pm 0,3 - 4,9 \pm 0,4 \log_{10}$  ufc/g). También el estudio de Dias-Morse *et al.* ([2015](#)) mostró una reducción significativa de la carga de *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* en carne de vacuno tras el tratamiento con ácido cítrico y ácido láctico al 2,5%, tanto combinados como de forma individual.

En enterobacterias y bacterias ácido lácticas, exceptuando las muestras tratadas con ácido cítrico al 4%; mesófilos, psicrotrofos, *Pseudomonas* y *Pseudomonas* fluorescentes de las muestras tratadas con fosfato trisódico al 10%, la carga microbiana fue aumentando a medida que aumentaron los días de almacenamiento. El último día no

se observaron diferencias significativas en ningún caso entre las muestras tratadas y no tratadas ( $P > 0,05$ ). A pesar de esto, las muestras control presentaron unos recuentos mayores que el resto de muestras tratadas.

El tratamiento con ácido láctico no mantuvo bajos los niveles de la flora psicrotrofa y de *Pseudomonas*, de manera que fueron aumentando a lo largo del tiempo. Además, los resultados de la microbiota o flora aerobia mesófila, los psicrotrofos y las enterobacterias fueron mayores a los obtenidos en otro estudio de carne de vacuno tratada con ácido láctico al 4% ([Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)).

Se observó una mayor reducción de la carga microbiana en la carne tratada con ácido cítrico al 2% que al 4% aunque sin diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), excepto sobre la carga de micrococos (recuentos en MSA). Esto no es lo que cabría esperar utilizando una concentración menor. Teniendo en cuenta que solo se realizaron dos repeticiones con cada concentración de ácido cítrico, esta diferencia podría no ser tal si el experimento contara con un mayor número de muestras tratadas. Kassem et al. ([2017](#)) no observaron diferencias entre el efecto del ácido cítrico al 3% y al 5% sobre carne de vacuno.

Estudiando el efecto del día del tratamiento, el ácido cítrico al 2% fue el que más redujo los niveles bacterianos en todos los casos, excepto sobre los niveles de bacterias ácido lácticas. El ácido cítrico al 2% fue el que mostró más efectividad para mantener la carga microbiana estable durante los días de almacenamiento, excepto sobre los niveles de *Pseudomonas*, más susceptibles al fosfato trisódico, y de micrococos (recuentos en MSA), que mostraron niveles menores al ser tratados con ácido cítrico al 4%.

El fosfato trisódico no fue el que mostró la mayor eficacia tras el tratamiento y, de hecho, las muestras tratadas con este compuesto mostraron altos niveles de *Pseudomonas* fluorescentes, micrococos (recuentos en MSA), coliformes fecales, enterococos y bacterias ácido lácticas frente al resto de tratamientos el día 6. La eficacia de este compuesto sobre carne de vacuno también ha sido estudiada por Pohlman et al. ([2002a](#), [2002b](#)), aunque sus resultados sobre la carga de microbiota o flora aerobia viable y de coliformes son superiores a los obtenidos en este estudio, ya que, en su caso, la carne fue preinoculada y picada.

**Tabla 18.** Recuento de diversos grupos microbianos ( $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de muestras de carne de vacuno no tratadas (control) y de muestras tratadas con diversos tratamientos descontaminantes (media  $\pm$  desviación estándar)

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
	0	1	3	6
<b>Mesófilos</b>				
Control	4,57 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,98 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,69 $\pm$ 2,20 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9,68 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido láctico 4%	3,25 $\pm$ 0,56 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	5,79 $\pm$ 3,38 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	7,55 $\pm$ 2,13 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	9,05 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido cítrico 4%	3,57 $\pm$ 0,59 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	4,37 $\pm$ 0,56 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,22 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9,58 $\pm$ 0,59 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Ácido cítrico 2%	2,03 $\pm$ 0,65 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	3,08 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,84 $\pm$ 0,99 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	7,59 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Fosfato trisódico 10%	3,18 $\pm$ 0,93 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	3,43 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,08 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,66 $\pm$ 1,47 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
<b>Psicrotrofos</b>				
Control	2,94 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,99 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,15 $\pm$ 1,76 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,83 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Ácido láctico 4%	1,21 $\pm$ 1,05 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	3,01 $\pm$ 0,55 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	5,71 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	8,93 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
Ácido cítrico 4%	2,94 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,52 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,30 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,30 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Ácido cítrico 2%	0,35 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	1,52 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	4,26 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	7,44 $\pm$ 1,30 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Fosfato trisódico 10%	2,09 $\pm$ 0,87 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	2,49 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	4,77 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	7,74 $\pm$ 0,91 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
<b>Pseudomonas</b>				
Control	2,89 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,75 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,59 $\pm$ 3,18 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9,13 $\pm$ 1,50 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido láctico 4%	1,42 $\pm$ 1,26 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	3,11 $\pm$ 1,87 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,06 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	10,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido cítrico 4%	1,80 $\pm$ 0,88 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	2,58 $\pm$ 1,61 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,03 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,82 $\pm$ 1,67 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido cítrico 2%	0,35 $\pm$ 0,49 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	1,34 $\pm$ 1,89 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	4,48 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	8,32 $\pm$ 2,37 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Fosfato trisódico 10%	1,38 $\pm$ 0,59 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	1,73 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	4,30 $\pm$ 1,06 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,06 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
<b>Pseudomonas fluorescentes</b>				
Control	1,71 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,29 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,02 $\pm$ 0,76 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido láctico 4%	0,13 $\pm$ 0,23 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	0,60 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,70 $\pm$ 1,49 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,33 $\pm$ 5,77 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 4%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	1,77 $\pm$ 2,51 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,00 $\pm$ 7,07 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 2%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,89 $\pm$ 2,68 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Fosfato trisódico 10%	0,23 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,15 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,97 $\pm$ 3,82 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
<b>Micrococos</b>				
Control	2,56 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,55 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,13 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,56 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido láctico 4%	1,03 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,91 $\pm$ 0,66 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	1,64 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,96 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 4%	1,33 $\pm$ 1,88 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,35 $\pm$ 0,49 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	0,50 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,17 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 2%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	0,85 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,42 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Fosfato trisódico 10%	1,06 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,05 $\pm$ 0,60 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	1,52 $\pm$ 1,48 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,00 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
<b>Coliformes fecales</b>				
Control	0,53 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,21 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,76 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,81 $\pm$ 0,54 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido láctico 4%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,41 $\pm$ 0,44 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,19 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,37 $\pm$ 0,40 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 4%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,76 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,33 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 2%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>			
Fosfato trisódico 10%	0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,20 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,64 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,81 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup> <sub>w</sub>

Enterobacterias				
Control	1,23 ± 0,19 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,19 ± 0,25 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,37 ± 0,39 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,49 ± 2,62 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido láctico 4%	0,16 ± 0,28 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	0,55 ± 0,53 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,23 ± 0,21 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,63 ± 3,04 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido cítrico 4%	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	1,06 ± 0,45 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,20 ± 0,47 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,72 ± 3,22 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Ácido cítrico 2%	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,32 ± 0,50 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	3,91 ± 2,34 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Fosfato trisódico 10%	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	0,46 ± 0,79 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,21 ± 0,38 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	5,26 ± 0,47 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Enterococos				
Control	0,72 ± 0,99 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,02 ± 0,47 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,17 ± 1,04 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,39 ± 5,72 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido láctico 4%	0,67 ± 1,16 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,20 ± 0,35 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,13 ± 0,23 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,71 ± 0,56 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 4%	0,79 ± 1,11 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,44 ± 2,03 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,82 ± 1,16 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,93 ± 0,75 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 2%	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,15 ± 0,21 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Fosfato trisódico 10%	0,56 ± 0,55 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,38 ± 0,51 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,37 ± 1,22 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	0,95 ± 1,10 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Bacterias ácido lácticas				
Control	1,94 ± 0,36 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,41 ± 0,25 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,51 ± 0,42 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	5,03 ± 0,24 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Ácido láctico 4%	1,15 ± 0,36 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,71 ± 0,55 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	3,62 ± 0,27 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,56 ± 0,22 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
Ácido cítrico 4%	1,77 ± 0,39 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,07 ± 0,64 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,07 ± 0,30 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,48 ± 3,56 <sup>a</sup> <sub>w</sub>
Ácido cítrico 2%	1,65 ± 0,53 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,65 ± 0,21 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,97 ± 0,51 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	3,85 ± 0,65 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
Fosfato trisódico 10%	1,58 ± 0,36 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	1,66 ± 0,77 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	2,32 ± 0,84 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,17 ± 0,13 <sup>a</sup> <sub>x</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

## Resultados de pH

El pH de los ácidos (ácido láctico y ácido cítrico) fue más bajo que el pH de las muestras no tratadas o tratadas con fosfato trisódico (tabla 19), ya que ese descenso en relación con el pH es una característica de los ácidos orgánicos que determina su poder de acción frente a la proliferación de microorganismos ([Moreno García, 2006](#)). Las muestras control y las tratadas con fosfato trisódico presentaron un pH similar.

El pH se mantuvo estable a lo largo del tiempo, aunque en el caso de las muestras tratadas con ácido láctico este aumentó, y en el caso de las muestras tratadas con fosfato trisódico disminuyó. Puesto que, a medida que pasaban los días, el pH de las muestras tendió a estabilizarse sin mostrar diferencias significativas el último día del estudio ( $P > 0,05$ ). Las muestras tratadas con ácido cítrico mantuvieron valores de pH similares al inicio. Esta capacidad del ácido cítrico para mantener el pH puede explicar su mayor efectividad para mantener los niveles microbianos más bajos que el resto de tratamientos.

Dentro de la literatura analizada, se han encontrado diversos estudios que reflejan el pH de los tratamientos utilizados en la descontaminación de carne de vacuno. En

algunos, los resultados de pH del fosfato trisódico y del ácido láctico son similares a los aquí expuestos: 6,76 para el fosfato trisódico y 5,52 para el ácido láctico ([Jiménez-Villarreal et al., 2003b](#)), y 5,63 para el ácido láctico ([2003a](#)). En el estudio de Rodríguez-Melcón *et al.* ([2017](#)), el pH en las muestras tratadas con ácido láctico ( $6,28 \pm 0,27$ ) es inferior a las no tratadas ( $6,59 \pm 0,31$ ) ( $P < 0,05$ ), al igual que en el nuestro.

Además, carne de pollo tratada con ácido cítrico al 2% presentó unos valores de pH similares a los resultados obtenidos en este estudio considerando el día 0 del tratamiento ( $5,44 \pm 0,41$ ), aunque superiores el día 7 ( $6,33 \pm 0,29$ ) en comparación con los alcanzados el día 6 en este estudio ([Alonso-Hernando et al., 2012a](#)). En el estudio de Alonso-Hernando *et al.* ([2012a](#)), los valores de pH de carne de pollo tratada con fosfato trisódico al 12% oscilaron entre  $7,00 \pm 0,14$  (día 7) y  $7,57 \pm 0,37$  (día 0), valores más elevados que los obtenidos en las muestras de vacuno tratadas con fosfato trisódico al 10%.

**Tabla 19.** Valores de pH de muestras de carne de vacuno no tratadas (control) y de muestras tratadas con diversos tratamientos descontaminantes (media  $\pm$  desviación estándar)

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
	0	1	3	6
Control	$6,33 \pm 0,34^a_x$	$6,33 \pm 0,38^a_x$	$6,16 \pm 0,56^a_x$	$6,56 \pm 0,61^a_x$
Ácido láctico 4%	$5,09 \pm 0,09^b_x$	$5,46 \pm 0,26^b_{xy}$	$5,56 \pm 0,14^a_{xy}$	$5,85 \pm 0,31^a_y$
Ácido cítrico 4%	$5,18 \pm 0,64^b_x$	$5,39 \pm 0,08^b_x$	$5,46 \pm 0,03^a_x$	$5,59 \pm 0,13^a_x$
Ácido cítrico 2%	$5,41 \pm 0,24^b_x$	$5,50 \pm 0,13^b_x$	$5,62 \pm 0,09^a_x$	$5,67 \pm 0,06^a_x$
Fosfato trisódico 10%	$6,88 \pm 0,27^a_x$	$6,12 \pm 0,29^{ab}_y$	$5,72 \pm 0,23^a_y$	$5,87 \pm 0,24^a_y$

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Análisis sensorial

Las muestras control son las que obtuvieron las mejores puntuaciones el primer día, como se observa en la tabla 20. A lo largo del tiempo, las puntuaciones de todas las fueron disminuyendo progresivamente. Aun así, el día 6, las muestras sin tratar son las mejor puntuadas en relación al color y las segundas en el resto de parámetros, por detrás del ácido cítrico al 2%. Por ello, el ácido cítrico al 2% sería el único tratamiento que mejoraría la calidad organoléptica en relación al control después de unos días tras el

sacrificio. El mismo día del sacrificio, la carne tratada con fosfato trisódico obtuvo notas similares al control, aunque cada vez fueron más bajas a medida que transcurrían los días. En ciertos casos, la carne tratada con este último compuesto se mostró exudativa.

En algunas muestras, como las tratadas con ácido láctico al 4% o ácido cítrico al 4%, la superficie de la carne aparecía como con zonas decoloradas, similar a la carne cocida, y zonas ennegrecidas donde anteriormente había estado en contacto con sangre. Esto puede haber afectado a las puntuaciones del color y de la aceptabilidad general, y no así al olor. A medida que pasó el tiempo, la carne tratada con ácido láctico al 4% se volvió más pálida. El ácido cítrico al 2% también blanqueó ligeramente la carne, pero en menor medida que el ácido cítrico al 4%, aunque no se reflejó en los valores de color.

En el análisis sensorial de carne de vacuno tratada con fosfato trisódico (10%) y ácido láctico (2%) ([Jiménez-Villarreal et al., 2003b](#)), en relación con el color las muestras sin tratar (6,3; día 0 - 3,5; día 7) tuvieron puntuaciones similares a las muestras tratadas con fosfato trisódico al 12% (6,2; día 0 - 3,6; día 7), y puntuaciones mayores respecto a las tratadas con ácido láctico al 2% (6,0; día 0 - 2,9; día 7). Respecto del olor, las muestras tratadas con fosfato trisódico (7,4; día 0 - 3,1; día 7) fueron valoradas de forma similar a las muestras sin tratar (7,3; día 0 - 3,1; día 7) y a las tratadas con ácido láctico (7,2; día 0 - 3,1; día 2,7). En nuestro estudio, las muestras sin tratar, tratadas con ácido láctico y fosfato trisódico tienen unas puntuaciones un poco superiores en cuanto al olor y el color, pero la reducción en las puntuaciones se produce de forma análoga a medida que se suceden los días.

Los resultados obtenidos sugieren que el ácido láctico al 4% no mejoró la calidad sensorial de la carne de vacuno, a pesar de que otros autores ([Rodríguez-Melcón et al., 2017](#)) hayan determinado lo contrario.

**Tabla 20.** Valores de los parámetros de color, olor y aceptabilidad general del análisis sensorial de muestras de carne de vacuno no tratadas (control) y de muestras tratadas con diversos tratamientos descontaminantes (media  $\pm$  desviación estándar)

Parámetros	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	1	3	6
Color	Control	8,43 $\pm$ 0,36 <sup>a<sub>w</sub></sup>	7,83 $\pm$ 0,44 <sup>a<sub>wx</sub></sup>	7,21 $\pm$ 0,26 <sup>a<sub>x</sub></sup>	6,12 $\pm$ 0,47 <sup>a<sub>y</sub></sup>
	AL (4%)	7,22 $\pm$ 1,07 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	5,96 $\pm$ 1,13 <sup>b<sub>wx</sub></sup>	4,47 $\pm$ 0,74 <sup>c<sub>xy</sub></sup>	3,19 $\pm$ 2,07 <sup>b<sub>y</sub></sup>
	AC (4%)	4,67 $\pm$ 0,67 <sup>c<sub>w</sub></sup>	4,08 $\pm$ 0,12 <sup>c<sub>wx</sub></sup>	3,25 $\pm$ 0,59 <sup>d<sub>x</sub></sup>	3,57 $\pm$ 0,40 <sup>ab<sub>wx</sub></sup>
	AC (2%)	5,72 $\pm$ 1,25 <sup>bc<sub>w</sub></sup>	6,87 $\pm$ 0,66 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	5,64 $\pm$ 0,10 <sup>b<sub>w</sub></sup>	5,39 $\pm$ 0,15 <sup>ab<sub>w</sub></sup>
	FT (10%)	7,83 $\pm$ 0,69 <sup>a<sub>w</sub></sup>	7,41 $\pm$ 0,22 <sup>a<sub>w</sub></sup>	6,44 $\pm$ 0,38 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	4,67 $\pm$ 1,32 <sup>ab<sub>x</sub></sup>
Olor	Control	8,25 $\pm$ 0,52 <sup>a<sub>w</sub></sup>	7,67 $\pm$ 0,29 <sup>a<sub>wx</sub></sup>	6,44 $\pm$ 0,96 <sup>a<sub>x</sub></sup>	4,67 $\pm$ 0,67 <sup>ab<sub>y</sub></sup>
	AL (4%)	7,07 $\pm$ 0,51 <sup>b<sub>w</sub></sup>	6,77 $\pm$ 1,12 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	5,44 $\pm$ 0,37 <sup>ab<sub>wx</sub></sup>	4,52 $\pm$ 1,10 <sup>ab<sub>x</sub></sup>
	AC (4%)	6,74 $\pm$ 0,77 <sup>b<sub>w</sub></sup>	5,50 $\pm$ 0,00 <sup>b<sub>x</sub></sup>	4,50 $\pm$ 0,24 <sup>b<sub>xy</sub></sup>	4,07 $\pm$ 0,10 <sup>b<sub>y</sub></sup>
	AC (2%)	7,37 $\pm$ 0,05 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	6,73 $\pm$ 0,09 <sup>ab<sub>x</sub></sup>	6,21 $\pm$ 0,10 <sup>a<sub>y</sub></sup>	5,76 $\pm$ 0,13 <sup>a<sub>z</sub></sup>
	FT (10%)	7,73 $\pm$ 0,48 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	7,45 $\pm$ 0,68 <sup>a<sub>w</sub></sup>	6,17 $\pm$ 0,87 <sup>a<sub>x</sub></sup>	4,10 $\pm$ 0,16 <sup>b<sub>y</sub></sup>
Aceptabilidad general	Control	8,48 $\pm$ 0,30 <sup>a<sub>w</sub></sup>	7,77 $\pm$ 0,41 <sup>a<sub>w</sub></sup>	6,71 $\pm$ 0,62 <sup>a<sub>x</sub></sup>	5,07 $\pm$ 0,32 <sup>a<sub>y</sub></sup>
	AL (4%)	7,09 $\pm$ 0,80 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	5,83 $\pm$ 1,19 <sup>b<sub>wx</sub></sup>	4,37 $\pm$ 0,68 <sup>b<sub>xy</sub></sup>	3,40 $\pm$ 1,85 <sup>a<sub>y</sub></sup>
	AC (4%)	5,09 $\pm$ 0,69 <sup>c<sub>w</sub></sup>	4,08 $\pm$ 0,12 <sup>c<sub>wx</sub></sup>	3,17 $\pm$ 0,71 <sup>c<sub>x</sub></sup>	3,43 $\pm$ 0,20 <sup>a<sub>x</sub></sup>
	AC (2%)	5,80 $\pm$ 1,13 <sup>bc<sub>w</sub></sup>	6,78 $\pm$ 0,54 <sup>ab<sub>w</sub></sup>	5,86 $\pm$ 0,20 <sup>a<sub>w</sub></sup>	5,38 $\pm$ 0,07 <sup>a<sub>w</sub></sup>
	FT (10%)	7,67 $\pm$ 0,59 <sup>a<sub>w</sub></sup>	7,41 $\pm$ 0,36 <sup>a<sub>w</sub></sup>	5,89 $\pm$ 0,25 <sup>a<sub>x</sub></sup>	4,00 $\pm$ 0,76 <sup>a<sub>y</sub></sup>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). AL; ácido láctico, AC; ácido cítrico, FT; fosfato trisódico.

### Análisis de color

El color de la carne de vacuno varía con el tiempo y con la temperatura de conservación. En este estudio, los parámetros de color se mantuvieron estables ( $P > 0,05$ ) en términos generales, como se observa en la tabla 21. Habitualmente, al inicio del almacenamiento, la intensidad del color aumenta debido a la formación de oximioglobina. Después se va reduciendo, lo que se refleja en una disminución del valor  $a^*$  de la carne ([Mancini y Ramanathan, 2014](#)). En nuestro estudio esto no se produjo, puesto que el parámetro  $a^*$  se mantuvo estable ( $P > 0,05$ ), excepto en las muestras tratadas con ácido cítrico al 2%.

Según el estudio de Holman *et al.* (2017), los parámetros normales del color de la carne de vacuno se encuentran entre los siguientes valores: la luminosidad ( $L^*$ ), entre 35,3 y 46,3; el parámetro  $a^*$ , entre 6,7 y 27,3; el  $b^*$ , entre 11,2 y 23,7; la saturación ( $c^*$ ), entre 14,2 y 35,9, y el matiz ( $h^*$ ), entre 0,6 (34,38°) y 1,1 (63,03°). En nuestro estudio,  $L^*$  se mantiene entre esos valores ( $35,11 \pm 3,03$  -  $45,59 \pm 4,19$ ) el día 0, al igual que los valores de  $a^*$  ( $7,00 \pm 2,22$  -  $13,67 \pm 1,57$ ).

En el estudio de Jiménez-Villarreal *et al.* (2003a), aplicaron fosfato trisódico y ácido láctico en conjunción con cloruro de acetilpiridinio. Los resultados que obtuvieron para el color (control:  $L$ : 40,70;  $a^*$ : 21,60;  $b^*$ : 18,53; fosfato trisódico:  $L$ : 40,16;  $a^*$ : 22,75;  $b^*$ : 17,72; ácido láctico:  $L$ : 48,13;  $a^*$ : 21,25;  $b^*$ : 20,17) fueron superiores a los aquí presentados.

La luminosidad o valor CIE  $L^*$  se presentó estable a lo largo del tiempo, aunque en el caso de las muestras tratadas con ácido láctico, aumentó. En algunos casos, la carne tratada con ácido láctico o con ácido cítrico presentó zonas más claras, lo que se tradujo en un aumento de la luminosidad. El día 6 se apreciaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre las muestras control ( $37,52 \pm 4,74$ ) y las tratadas con fosfato trisódico ( $38,28 \pm 3,98$ ), respecto a las tratadas con ácido láctico ( $48,08 \pm 4,81$ ). Los resultados de Pohlman *et al.* (2002a) reflejaron que la carne de vacuno tratada con fosfato trisódico al 10% y dióxido de cloro mostraba una decoloración menor que las muestras sin tratar, siendo más evidente esta diferencia el día 7.

Kassem *et al.* (2017) realizaron un estudio sobre carne de vacuno con los mismos compuestos aquí utilizados a distintas concentraciones. Los valores de luminosidad que obtuvieron fueron similares a los resultados presentados en el presente estudio (control: 39,45, ácido láctico: 40,41 - 40,73, ácido cítrico: 41,76 - 41,98, fosfato trisódico: 37,28 - 38,96). En las investigaciones de Rodríguez-Melcón *et al.* (2017), las muestras de carne de vacuno tratadas con ácido láctico al 4% se oscurecieron en el último día de almacenamiento tras dicho tratamiento (de  $36,64 \pm 4,01$  a  $31,78 \pm 4,22$ ), mientras que en el nuestro se volvieron más claras.

En otro estudio ([Jiménez-Villarreal et al., 2003b](#)) se utilizó fosfato trisódico al 10% y ácido láctico al 2% sobre carne de vacuno y los valores de los parámetros de color fueron más altos que los aquí obtenidos ( $L^*$ : 41,17, 45,60;  $a^*$ : 25,10, 20,40;  $b^*$ : 21,02, 19,21).

El valor CIE  $a^*$  (rojo/verde) se mantuvo estable ( $p < 0,05$ ), excepto en la carne tratada con ácido cítrico al 2%. Todos los valores fueron positivos, lo que representa un color rojizo en la superficie de la carne. Esto, en carne de vacuno, es una cualidad deseable. En las muestras tratadas con ácido cítrico al 2% se observó un aumento del parámetro  $a^*$  a medida que pasaron los días, lo que puede explicar las altas puntuaciones obtenidas en el análisis sensorial en relación al color en estas muestras. Aunque también podría deberse a un mayor componente azul ( $b^*$ ), que se refleja en un ligero matiz morado, deseable en carne de vacuno.

El valor mínimo de  $a^*$  para que una carne sea aceptable es 14,5 ([Holman et al., 2017](#)). Si comparamos este valor con los resultados obtenidos, solo las muestras control y las tratadas con fosfato trisódico a partir del día 1 tendrían un color rojizo aceptable, y el ácido cítrico al 2% a partir del día 3. La mejora del color rojo de la carne tratada con fosfato trisódico se debe a que favorece la estabilidad de la oximioglobina ([Pohlman et al., 2002a](#)).

En el estudio de Rodríguez-Melcón *et al.* ([2017](#)), en el que se trató carne de vacuno con distintas concentraciones de ácido láctico, el valor  $a^*$  de la carne tratada ( $5,83 \pm 0,85$  a  $10,31 \pm 3,64$ ) fue menor que la de la carne no tratada ( $12,12 \pm 2,84$ ), igual que indican nuestros resultados. Este valor aumentó en las muestras tratadas con ácido láctico, a diferencia de los resultados aquí presentados en los que el valor  $a^*$  de las muestras no tratadas se mantuvo constante ( $P > 0,05$ ).

En todo momento, las muestras tratadas con fosfato trisódico reflejaron valores de  $a^*$  menores que las muestras no tratadas, al contrario que en el estudio de Pohlman *et al.* ([2002a](#)) en el cual las muestras tratadas con fosfato trisódico se volvieron más rojas. Esta diferencia podría deberse a que sus muestras fueron preinoculadas con microorganismos alterantes y patógenos.

En otros estudios, los valores de  $a^*$  fueron superiores a los aquí obtenidos como en el de Kassem *et al.* (2017) que utilizó ácido láctico (20,17 - 21,36), ácido cítrico (18,59 - 21,01) y fosfato trisódico al 10% (21,83 - 23,99) o el de Jiménez-Villarreal *et al.* (2003b) que trató la carne de vacuno con fosfato trisódico al 10% (25,10) y ácido láctico al 2% (20,40). En este último estudio, las muestras tratadas con fosfato trisódico obtuvieron el mayor valor de  $a^*$ , mientras que en nuestro caso fueron las no tratadas. Las que reflejaron el menor valor fueron las tratadas con ácido láctico al igual que en nuestro estudio.

El parámetro  $b^*$  no es tan obvio en relación al color de la carne como lo es el parámetro  $a^*$ . Cuando este valor es bajo, la carne tiene un mayor componente azul que da lugar a tonos púrpuras cuando se mezcla con el tono rojizo. Cuando es más alto, entonces el color de la carne tiene un mayor componente amarillo y toma colores pardos. Este último caso se observó en las muestras no tratadas, que se volvieron más pardas.

A excepción de la carne tratada con ácido cítrico, en la que se observó una reducción del valor del parámetro  $b^*$  el día del tratamiento, en el resto de tratamientos este parámetro toma valores similares a los observados en el estudio de Kassem *et al.* (2017), nombrado anteriormente (control: 6,61; ácido láctico: 6,10 - 6,39; ácido cítrico: 5,79 - 6,82; fosfato trisódico: 5,93 - 6,02). La carne tratada con ácido láctico obtuvo valores superiores de  $b^*$  que las muestras sin tratar el día del tratamiento. Al finalizar el estudio, las muestras tratadas con ácido láctico mostraron valores superiores a las muestras sin tratar como también refleja el estudio de Rodríguez-Melcón *et al.* (2017) (control: de  $12,87 \pm 2,88$  a  $15,40 \pm 5,56$ ; ácido láctico (4%): de  $6,44 \pm 3,94$  a  $15,61 \pm 4,11$ ).

En otros estudios, el parámetro  $b^*$  tomó valores más altos a los obtenidos en el presente estudio y fueron disminuyendo con el tiempo, como muestran los resultados de Pohlman *et al.* (2002a) en carne tratada con fosfato trisódico y los de Jiménez-Villarreal *et al.* (2003b) que también usó fosfato trisódico y ácido láctico sobre carne de vacuno. En este último caso, las muestras tratadas con fosfato trisódico obtuvieron el mayor valor de  $b^*$ , por delante de las tratadas con ácido láctico y de las muestras control; mientras que, en los resultados aquí descritos, el tratamiento con fosfato trisódico obtuvo menor valor que el ácido láctico y que las muestras no tratadas. En nuestro estudio este parámetro toma cada vez valores más altos con independencia del tratamiento realizado, al igual que

los resultados descritos por Rodríguez-Melcón *et al.* (2017) en carne tratada con ácido láctico.

El parámetro CIE  $c^*$  o saturación se mantuvo estable a lo largo del tiempo en las muestras no tratadas, las tratadas con ácido láctico y con ácido cítrico al 4%, al igual que el valor  $b^*$ . En cuanto al matiz o CIE  $h^*$ , solo se mantuvo estable en la carne no tratada y en la tratada con ácido láctico, ya que en el resto este valor fue aumentando.

La saturación ( $c^*$ ) y el matiz ( $h^*$ ) están relacionados con los valores  $a^*$  y  $b^*$  por lo que toman valores proporcionales a estos. La saturación y el matiz no se indican en todos los experimentos en los que se han medido el resto de parámetros del espacio CIE  $L^*a^*b^*$ . Rodríguez-Melcón *et al.* (2017) calcularon estos valores en carne de vacuno tratada con ácido láctico obteniendo resultados similares a los aquí expuestos.

Las diferencias halladas entre los valores aquí obtenidos y estudios de otros autores pueden deberse a variaciones intrínsecas de la carne, como la edad, sexo, alimentación, tipo de estabulado o forma de sacrificio de los animales; así como de la concentración y tipo de tratamiento utilizado, las condiciones de aplicación o el tipo de espectrocolorímetro y la calibración de este.

**Tabla 21.** Valores de color (espacio CIE  $L^*a^*b^*$ ) de muestras de carne de vacuno no tratadas (control) y de muestras tratadas con diversos tratamientos descontaminantes (media  $\pm$  desviación estándar)

Parámetros	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	1	3	6
CIE $L^*$	Control	35,11 $\pm$ 3,03 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	39,41 $\pm$ 0,84 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	38,81 $\pm$ 6,01 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	37,52 $\pm$ 4,74 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AL (4%)	36,73 $\pm$ 5,56 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	46,37 $\pm$ 6,71 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	45,88 $\pm$ 5,29 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	48,08 $\pm$ 4,81 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	AC (4%)	44,34 $\pm$ 3,21 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	48,77 $\pm$ 1,70 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	47,39 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	44,11 $\pm$ 3,24 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>
	AC (2%)	45,59 $\pm$ 4,19 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	44,95 $\pm$ 9,98 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	42,72 $\pm$ 2,58 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	43,72 $\pm$ 3,23 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>
	FT (10%)	36,09 $\pm$ 3,03 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	38,93 $\pm$ 4,36 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	40,52 $\pm$ 2,78 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	38,28 $\pm$ 3,98 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
CIE $a^*$	Control	13,67 $\pm$ 1,57 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	17,03 $\pm$ 4,84 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	18,32 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	17,84 $\pm$ 2,72 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AL (4%)	9,54 $\pm$ 2,93 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	12,39 $\pm$ 4,33 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	11,83 $\pm$ 0,60 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	9,60 $\pm$ 1,99 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	AC (4%)	7,00 $\pm$ 2,22 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	9,21 $\pm$ 0,25 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	8,90 $\pm$ 3,15 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	10,75 $\pm$ 5,08 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	AC (2%)	7,45 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	12,21 $\pm$ 3,35 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	16,33 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	15,13 $\pm$ 1,61 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>
	FT (10%)	12,82 $\pm$ 2,37 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	14,76 $\pm$ 2,72 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	15,98 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	14,11 $\pm$ 2,89 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>

<b>CIE b*</b>	Control	6,74 ± 2,72 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	10,47 ± 4,43 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	12,74 ± 3,99 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	12,40 ± 3,87 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AL (4%)	6,98 ± 1,64 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	7,36 ± 4,95 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9,17 ± 2,16 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9,52 ± 2,88 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AC (4%)	1,50 ± 1,60 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	5,51 ± 2,03 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	7,30 ± 4,65 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,43 ± 4,05 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AC (2%)	-0,78 ± 1,34 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	6,99 ± 4,41 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	13,17 ± 0,32 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	10,34 ± 1,60 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	FT (10%)	5,79 ± 1,97 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	9,14 ± 1,78 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	10,99 ± 0,19 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	10,92 ± 0,86 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
<b>CIE c*</b>	Control	15,30 ± 2,65 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	20,04 ± 6,33 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	22,36 ± 4,52 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	21,77 ± 4,41 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AL (4%)	12,09 ± 1,32 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	14,59 ± 5,21 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	15,06 ± 0,78 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	13,75 ± 1,60 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AC (4%)	7,21 ± 2,50 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	10,79 ± 1,24 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	11,57 ± 5,35 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	13,66 ± 6,51 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AC (2%)	7,55 ± 0,21 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	14,16 ± 5,07 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	20,98 ± 0,38 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	18,33 ± 2,23 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	FT (10%)	14,08 ± 2,94 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	17,40 ± 2,97 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	19,40 ± 0,60 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	17,87 ± 2,81 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>
<b>CIE h*</b>	Control	25,56 ± 6,13 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	30,61 ± 5,37 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	34,25 ± 4,58 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	34,16 ± 4,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AL (4%)	37,26 ± 15,26 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	28,72 ± 10,37 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	37,50 ± 8,10 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	44,26 ± 13,50 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	AC (4%)	10,47 ± 9,29 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	30,37 ± 8,63 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	37,32 ± 8,87 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	38,03 ± 0,25 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	AC (2%)	-6,11 ± 10,46 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	28,12 ± 9,39 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	38,90 ± 1,97 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	34,27 ± 1,29 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	FT (10%)	23,83 ± 3,79 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	31,89 ± 4,32 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	34,52 ± 0,59 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	38,08 ± 3,44 <sup>a</sup> <sub>y</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas (P<0,05). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas (P<0,05). AL; ácido láctico, AC; ácido cítrico, FT; fosfato trisódico.

La carne fresca de vacuno presentó una baja calidad microbiológica con niveles altos de la flora patógena y alterante. Esto supone un riesgo para la salud de los consumidores, por lo que se aconseja mejorar las prácticas higiénicas durante la manipulación de la carne. Recién aplicados, los tratamientos químicos de descontaminación utilizados sobre la superficie de carne de vacuno redujeron los niveles de la microbiota o flora aerobia mesófila, psicrotrofa, de *Pseudomonas*, *Pseudomonas* fluorescentes y enterobacterias. Aún así, no se observaron diferencias significativas el resto de días entre las muestras tratadas y sin tratar. Los ácidos orgánicos afectaron negativamente a la superficie de la carne recién aplicados, pero retrasaron la degradación de esta durante el almacenamiento en refrigeración, de tal manera que su calidad sensorial respecto de las no tratadas fue mayor. El fosfato trisódico también mantuvo la calidad organoléptica de la carne durante el almacenamiento y, además, no afectó negativamente a la carne una vez aplicado. Las muestras tratadas con ácido láctico al 4% se blanquearon durante el almacenamiento en refrigeración, lo que repercutió negativamente en las puntuaciones referidas al color en el análisis sensorial. El uso de tratamientos de descontaminación debe estar siempre acompañado de buenas prácticas higiénicas y de manipulación durante el procesado de la carne.



## **CAPÍTULO II**

---

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL FOSFATO TRISÓDICO  
AL 8%, ÁCIDO ASCÓRBICO AL 2% Y ÁCIDO LÁCTICO AL  
2% SOBRE CARNE DE CONEJO



## **CAPÍTULO II. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL FOSFATO TRISÓDICO AL 8%, ÁCIDO ASCÓRBICO AL 2% Y ÁCIDO LÁCTICO AL 2% SOBRE CARNE DE CONEJO**

El efecto de los descontaminantes químicos sobre la carne de conejo apenas se ha analizado. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de fosfato trisódico al 8%, de ácido ascórbico al 2% y de ácido láctico al 2% sobre la carga de la flora aerobia viable, el pH, las características sensoriales y el color en la superficie de paletillas de conejo. Previamente, las paletillas se inocularon con cuatro bacterias patógenas de origen alimentario: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Hadar, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina. Los análisis se realizaron inmediatamente después de la inmersión (día 0) y cada 24 h durante 7 días de almacenamiento a  $3 \pm 1$  °C. Los recuentos de la flora aerobia viable fueron similares en todos los tratamientos (entre  $1,73 \pm 1,29$  y  $2,78 \pm 0,12$  log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup>), pero el último día del análisis, la carne sin tratar mostró el valor más alto ( $8,58 \pm 0,23$  log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup>) seguido de la carne tratada con ácido láctico ( $6,62 \pm 0,68$  log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup>), con ácido ascórbico ( $5,40 \pm 1,49$  log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup>) y con fosfato trisódico ( $4,89 \pm 0,54$  log<sub>10</sub> ufc/cm<sup>2</sup>). Todos los parámetros del análisis de color, excepto los valores de a\*, presentaron diferencias significativas (P<0,05) a lo largo del tiempo y también entre los distintos tratamientos aplicados. El tratamiento que obtuvo la puntuación más baja el día 0 fue el de ácido láctico ( $6,67 \pm 0,31$ ) seguido del de ácido ascórbico ( $7,27 \pm 0,61$ ), fosfato trisódico ( $8,40 \pm 0,35$ ) y control ( $8,87 \pm 0,12$ ). Las paletillas sin tratar obtuvieron la puntuación más baja el día 7 ( $2,33 \pm 1,10$ ), aunque sin presentar diferencias significativas (P>0,05) con el resto de tratamientos. Los tratamientos redujeron significativamente la flora patógena y la mantuvieron en niveles bajos durante el almacenamiento en refrigeración. El uso de estos tratamientos afectó a la superficie de la carne, aunque no en todos los casos de forma negativa, ya que las puntuaciones del análisis sensorial de las muestras tratadas son superiores a las no tratadas tras el almacenamiento.

## INTRODUCCIÓN

Durante 2021 se produjeron 862 mil toneladas de carne de conejo a nivel mundial ([FAOSTAT](#)). Las zonas con mayor producción son China y el sur de Europa. Siendo este segundo y el área mediterránea los principales consumidores ([Jerney et al., 2017](#)). En Europa, la producción de carne de conejo supuso el 0,27% de la producción total de carne en 2021 y el 0,68% en España, con 51 mil toneladas en 2020 ([FAOSTAT](#)). En 2021, España alcanzó el segundo lugar en Europa, detrás de Francia, con más de 47 toneladas ([MAPA, 2022a](#)). El consumo en España ese año fue de 0,80 kg per cápita, un 2,5% del total de carne fresca consumida ([MAPA, 2022e](#)).

La descontaminación de la carne es el tratamiento mediante el cual se reduce tanto el número de microorganismos patógenos como la carga microbiana total de la superficie de la canal, despojos o recortes de carne ([Moreno García, 2006](#)). Este proceso es un punto crítico de control dentro de los sistemas APPCC (Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control) de las empresas cárnicas, que nunca debe reemplazar a las buenas prácticas higiénicas ([Bolder, 1997](#); [SCVPH, 1998](#)).

El Reglamento (CE) nº 853/2004 permite el uso de nuevas sustancias descontaminantes en la superficie de productos de origen animal siempre que estén autorizados. Para la autorización de un nuevo antimicrobiano este debe tener eficacia probada, ser aceptado por los consumidores, no ser nocivo para la salud y no modificar las características sensoriales de la carne ([Moreno García, 2006](#)). En 2013, el uso de ácido láctico en canales enteras, medias canales o cuartos en el matadero fue autorizado en el Reglamento (UE) nº 101/2013, relativo al uso de ácido láctico para reducir la contaminación superficial de canales de bovinos. Actualmente, en otros países como Estados Unidos, Canadá o Australia, se permite el uso de diversas sustancias como tratamientos descontaminantes en la superficie de la carne. De hecho, en Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) considera GRAS (Generalmente Reconocido como Seguro) al fosfato trisódico, al ácido ascórbico y al ácido láctico ([GPO, 2021a](#), [2021b](#)). La Unión Europea está esperando más estudios para la aprobación o no de otras sustancias.

El mecanismo de acción del fosfato trisódico se basa en su capacidad de disociación que provoca un pH de 12 en soluciones al 1%. Esta alcalinidad descompone los

ácidos grasos de la membrana plasmática y conduce a la rotura celular. Además, tiene una alta capacidad tensioactiva que permite la eliminación de películas grasas evitando la adhesión de células sobre superficies cuando no están fuertemente adheridas ([EFSA, 2006](#)). Es más eficaz contra bacterias Gram negativas que contra bacterias Gram positivas ([Del Río \*et al.\*, 2008](#); [Moreno García, 2006](#)).

Por su parte, los ácidos orgánicos que se utilizan para reducir el número de bacterias en la superficie de la carne tienen, en general, mayor eficacia frente a bacterias Gram negativas ([Rajkovic \*et al.\*, 2010](#)). Por su estructura química, son ácidos débiles con alta capacidad de disociación que provocan la acidificación del citoplasma impidiendo el normal desarrollo de las funciones celulares ([Rajkovic \*et al.\*, 2010](#)). El ácido ascórbico, además de inhibir el crecimiento bacteriano por la reducción del pH como otros ácidos orgánicos, también dificulta el crecimiento de microorganismos aeróbicos y libera peróxido de hidrógeno cuando se oxida, lo que provoca cambios conformacionales de enzimas y proteínas bacterianas, provocando la muerte celular ([Eddy e Ingram, 1953](#)).

La carne tiene un sistema tampón capaz de amortiguar los cambios de pH provocados por los tratamientos. Aun así, cuando la carne es tratada con compuestos que modifican sustancialmente su pH, permanece así durante varios días hasta que se regula inhibiendo el crecimiento de microorganismos en la carne tras ser tratada ([Del Río \*et al.\*, 2007a](#)).

Uno de los inconvenientes del uso de tratamientos antimicrobianos, aunque no constituya un riesgo para la salud, son los cambios en la calidad sensorial de la carne. La carne tratada puede adquirir tonos, olores y/o sabores no deseados que pueden hacer que los consumidores rechacen su consumo ([Kassem \*et al.\*, 2017](#)). Ajustando las concentraciones de los compuestos utilizados se puede evitar este problema ([Del Río \*et al.\*, 2007b](#)).

Existen pocos estudios relacionados con la carne de conejo y los tratamientos antimicrobianos. En general, la mayoría de los estudios analizan los efectos sobre la carne de los cambios en la composición de la dieta ([Abdel-Wareth \*et al.\*, 2019](#); [Dabbou \*et al.\*, 2017](#); [Dalle Zotte \*et al.\*, 2016a](#); [Echegaray \*et al.\*, 2018](#); [Koné \*et al.\*, 2015](#); [Mancini \*et al.\*, 2015](#)) y la influencia sobre la carne del sexo y la raza ([Dalle Zotte \*et al.\*, 2016b](#); [Fadare y](#)

[Arogbo, 2015](#); [Kozioł \*et al.\*, 2017](#); [Maj \*et al.\*, 2012](#); [Tůmová \*et al.\*, 2014](#)). Este estudio se basa en otros sobre la efectividad de varios compuestos en la superficie de la carne de pollo ([Alonso-Hernando \*et al.\*, 2013b](#); [Del Río \*et al.\*, 2007b](#)).

El objetivo de este estudio fue probar la efectividad sobre la calidad microbiológica y la calidad sensorial del fosfato trisódico, ácido ascórbico y ácido láctico sobre la superficie de varias paletillas de conejo inoculadas previamente con cepas patógenas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se realizó el análisis microbiológico y sensorial de la superficie de paletillas de conejo, inoculadas previamente con cepas patógenas, tras ser sometidas a un tratamiento descontaminante con fosfato trisódico, ácido ascórbico o ácido láctico para medir la eficacia de estos tratamientos. Se realizaron tres réplicas de cada análisis y se realizaron durante los días 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Las paletillas se almacenaron a 3 °C en contenedores de plástico esterilizados previamente con alcohol de quemar durante el estudio.

Este estudio siguió los protocolos de del Río *et al.* ([2007b](#)) y de Alonso-Hernando *et al.* ([2013b](#)).

### **Recogida de carne**

Se compraron 144 patas delanteras o paletillas de conejo envasadas en bandejas plásticas en un supermercado de León. El peso aproximado de cada paletilla fue de 125 g. De estas, 120 se destinaron al análisis microbiológico y de pH, mientras que las 24 restantes se destinaron al análisis sensorial.

Las 120 paletillas destinadas al análisis microbiológico se dividieron en dos grupos de forma aleatoria, uno destinado a los análisis de los días 0, 1, 2 y 3 y otro a los análisis de los días 4, 5, 6 y 7. Se utilizaron 60 muestras para realizar por triplicado todas las combinaciones de las inoculaciones y los tratamientos. Las 20 paletillas de cada repetición se dividieron en 5 grupos de 4 paletillas de forma aleatoria. 4 de estos grupos fueron inoculados con 4 cepas patógenas y otro se dejó sin inocular. Después, cada una de las paletillas se trataron con uno de los 3 tratamientos a estudiar y con agua del grifo estéril como control.

Las paletillas que se utilizaron en el análisis sensorial y de color también se dividieron en dos grupos para analizarlas en distintos días, unas en los días 0, 1, 2, 3, 6 y 7 y las otras en los días 4 y 5. Estas paletillas no fueron inoculadas, solo tratadas con uno de los 3 descontaminantes o con agua del grifo estéril por triplicado.

### **Inoculación**

Antes de realizar el tratamiento sobre las paletillas destinadas al análisis microbiológico y de pH, estas se inocularon con cuatro cepas, cada una de un microorganismo distinto (seleccionado en base a su interés como patógeno o posible patógeno de origen alimentario): *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serotipo Hadar, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM) y *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (EFRV). Otras paletillas no se inocularon para ser usadas como control.

El día anterior del tratamiento se inocularon 100  $\mu$ L de la cepa bacteriana correspondiente en 10 mL de caldo TSB (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Se dejaron incubando a 35 °C durante 18 horas para alcanzar una carga de  $10^9$  ufc/mL. Una vez incubadas, se realizó una dilución decimal de cada cepa en agua de peptona al 0,1% (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). De esta dilución se añadieron 0,25 mL a 249,75 mL de agua de peptona al 0,1% estéril contenida en tarros de vidrio de 570 mL, uno por cada paletilla, para alcanzar una cantidad de  $10^5$  ufc/mL. Los tarros con el agua de peptona fueron esterilizados con anterioridad cubiertos con papel de aluminio y se dejaron enfriar antes de ser utilizados.

En condiciones asépticas se introdujeron las paletillas en los tarros con la cepa durante 30 minutos. La proporción entre la carne y la solución fue de 1:2 (p/vol). Después, se dejaron escurriendo durante otros 30 minutos sobre papel de filtro y se les aplicó el tratamiento que se describe a continuación.

Una vez que se terminó con las soluciones de los inóculos se midió su pH con un pH-metro (Crison pH25; Crison Instruments SA, España) obteniendo resultados entre 5,16 y 6,86. También se midió su temperatura con un termómetro (30.1018; TFA Dostmann, Wertheim, Alemania) cuya media alcanzó los  $22 \pm 1,3$  °C.

## Tratamiento

Para el tratamiento también se utilizaron tarros de vidrio de 570 mL con agua del grifo. Se esterilizaron cubiertos con papel de aluminio y se dejaron enfriar antes de disolver el compuesto descontaminante correspondiente. En este estudio se utilizaron fosfato trisódico (FT; 8%; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania), ácido ascórbico (AA; 2%; Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania) y ácido láctico (AL; 2%; Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). También se prepararon tarros solo con 250 mL de agua del grifo estéril para los controles.

En condiciones asépticas, las paletillas se introdujeron en los tarros con la solución durante 15 minutos. Al igual que en la inoculación, la proporción entre la carne y la solución fue de 1:2. Después, se dejaron escurrir sobre resmas de papel de filtro otros 15 minutos. Por último, se introdujeron en los contenedores de plástico.

Una vez que las paletillas se retiraron de los tarros, se midió el pH y la temperatura de la temperatura ambiente que fue de  $24,1 \pm 2$  °C, así como de las soluciones contenidas en el tarro obteniendo los resultados de la tabla 22. Las soluciones, tanto de las inoculaciones como las del tratamiento, no fueron reutilizadas.

**Tabla 22.** Temperatura media y pH medio de los tratamientos aplicados a las paletillas de conejo (media  $\pm$  desviación estándar)

	<b>FT 8%</b>	<b>AA 2%</b>	<b>AL 2%</b>	<b>Control</b>
<b>Tª</b>	21,7 $\pm$ 1,9	22,5 $\pm$ 2,2	22,7 $\pm$ 2,1	22,6 $\pm$ 2,0
<b>pH</b>	13,8 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,3

Las paletillas tratadas se destinaron tanto para realizar el control microbiológico y de pH, como para el análisis sensorial y de color.

## Control microbiológico y pH

Se cortaron piezas de carne de 7 cm<sup>2</sup> y 2 mm de grosor con la ayuda de un bisturí, una pinza y un tapón metálico estériles. Estas piezas se homogeneizaron (Masticator Silver Panoramic; 9000520; IUL, Barcelona, España) en 7 mL de agua de peptona al 0,1% en

proporción 1:1. De la solución homogeneizada se preparó cierto número de diluciones, según la carga microbiana y el día del tratamiento, y se sembró en superficie (0,1 mL) por duplicado en placas con medio PCA (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Después, las placas se mantuvieron a 30 °C durante 72 horas y se realizó el recuento de la flora o microbiota aerobia mesófila crecida.

Terminada la siembra, para evitar contaminaciones, se midió el pH de la solución contenida en la bolsa de Stomacher donde fue homogeneizada la muestra.

### **Análisis sensorial y color**

Mediante una cata hedónica se realizó el análisis sensorial con un grupo de 6 catadores pertenecientes a nuestro equipo de investigación y alumnos. Durante la cata se midió el color, el olor y la aceptabilidad general de la carne mediante una escala del 1 al 9, siendo el 1 la puntuación de mayor desagrado y el 9 la de mayor agrado.

Además, se midió el color cada día en 5 puntos distintos de cada paletilla con un espectrocolorímetro (CM-700d; Minolta, Osaka, Japón) ajustado con las siguientes variables: D65 para la iluminación, modo SCI, tamaño de la apertura de 11 mm para la iluminación y 8 mm para la medida, con un ángulo de observación de 10°. Así, se obtuvo la luminosidad ( $L^*$ ), la coordenada rojo/verde ( $a^*$ ) y la coordenada amarillo/azul ( $b^*$ ). A partir de estos parámetros se calcularon la saturación ( $c^*$ ) y el matiz ( $h^*$ ) mediante estas fórmulas:  $c^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$  y  $h^* = \arctan (b^* / a^*)$ .

### **Análisis estadístico**

A partir de los recuentos de las unidades formadoras de colonias se obtuvieron los valores de  $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>. Las medias obtenidas entre los diversos tratamientos en los mismos días se compararon mediante el test de Student-Newman-Keuls utilizando el software estadístico IBM® SPSS® Statistics para Windows, Versión 24.0 (IBM Corp., Armonk, New York, EE.UU.). En el caso del análisis sensorial y de color, la comparación de medias se calculó mediante un análisis de varianza seguida del test de Duncan con el mismo software estadístico, entre distintos días y tratamientos.

## RESULTADOS

### Recuentos microbiológicos

El día que se realizó el tratamiento las muestras sin tratar o control son las que muestran la mayor carga microbiana, excepto en las paletillas sin inocular previamente. Esta diferencia respecto de las muestras control es más acusada en la carne tratada con ácido láctico.

En todos los casos se observa un aumento de la carga microbiana a medida que transcurren los días de almacenamiento ( $P < 0,05$ ), aunque en el caso de las muestras tratadas con ácido láctico la carga microbiana el día del tratamiento y al día siguiente es similar en todos los casos. En el caso de las muestras sin inoculación previa, los recuentos son más bajos respecto del resto de muestras inoculadas ( $P < 0,05$ ).

#### Sin inoculación

Los recuentos de la flora o microbiota aerobia viable en las paletillas tratadas sin inoculación previa, como refleja la tabla 23, muestran valores que aumentan a lo largo del tiempo. Aunque el día 0 el recuento es similar en todos los tratamientos (entre  $1,73 \pm 1,29$  y  $2,78 \pm 0,12 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ ), el aumento es mayor en el caso de las muestras sin tratar que en las muestras tratadas. Después del periodo de almacenamiento, en el último día del análisis la carne no tratada muestra el mayor valor ( $8,58 \pm 0,23 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ ) seguida de la carne tratada con ácido láctico ( $6,62 \pm 0,68 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ ), con ácido ascórbico ( $5,40 \pm 1,49 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ ) y con fosfato trisódico ( $4,89 \pm 0,54 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ ).

**Tabla 23.** Recuento de la flora o microbiota aerobia viable ( $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes sin inocular (media  $\pm$  desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
	Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
0	2,78 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	2,18 $\pm$ 0,95 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	1,73 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	2,05 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
1	3,74 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	2,07 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	1,72 $\pm$ 1,04 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	1,80 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
2	5,17 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	2,32 $\pm$ 0,70 <sup>a</sup> <sub>yz</sub>	3,37 $\pm$ 1,24 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	1,80 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
3	5,33 $\pm$ 0,74 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>	3,29 $\pm$ 1,41 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	2,93 $\pm$ 1,14 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	1,70 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
4	5,97 $\pm$ 0,27 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	3,92 $\pm$ 1,08 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	3,65 $\pm$ 1,64 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	2,70 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
5	7,47 $\pm$ 0,76 <sup>e</sup> <sub>x</sub>	4,97 $\pm$ 2,02 <sup>bc</sup> <sub>xy</sub>	4,82 $\pm$ 1,88 <sup>bc</sup> <sub>xy</sub>	2,96 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
6	8,49 $\pm$ 0,08 <sup>f</sup> <sub>x</sub>	6,30 $\pm$ 0,40 <sup>c</sup> <sub>y</sub>	6,57 $\pm$ 1,12 <sup>c</sup> <sub>y</sub>	5,18 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
7	8,58 $\pm$ 0,23 <sup>f</sup> <sub>x</sub>	4,89 $\pm$ 0,54 <sup>bc</sup> <sub>z</sub>	5,40 $\pm$ 1,49 <sup>bc</sup> <sub>yz</sub>	6,62 $\pm$ 0,68 <sup>c</sup> <sub>y</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

#### Inoculación previa con *Listeria monocytogenes*

En las paletillas inoculadas con *Listeria monocytogenes* se observa en la tabla 24 que el día del tratamiento el ácido láctico ( $1,12 \pm 0,39 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) fue el que redujo más la carga microbiana respecto del control ( $5,15 \pm 0,47 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) ( $P < 0,05$ ). Como se observa en el resto de casos, los recuentos aumentan con el tiempo, de forma más acusada en la carne tratada con ácido ascórbico y con ácido láctico. A pesar de que el fosfato trisódico presenta un valor similar al control el primer día ( $4,09 \pm 1,44 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>), cuando se alcanza el día 7 de almacenamiento, es el tratamiento que presenta el menor valor de recuento ( $7,58 \pm 0,70 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>).

Tabla 24. Recuento de la flora o microbiota aerobia viable ( $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes inoculadas con *Listeria monocytogenes* (media  $\pm$  desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
	Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
0	5,15 $\pm$ 0,47 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,09 $\pm$ 1,44 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,04 $\pm$ 1,71 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	1,12 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
1	5,44 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,06 $\pm$ 1,16 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	4,07 $\pm$ 1,36 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	2,76 $\pm$ 1,46 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>
2	7,14 $\pm$ 2,01 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	4,85 $\pm$ 1,75 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	5,52 $\pm$ 0,58 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	5,27 $\pm$ 2,24 <sup>bcd</sup> <sub>x</sub>
3	7,88 $\pm$ 1,54 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	6,67 $\pm$ 1,49 <sup>bcd</sup> <sub>xy</sub>	5,78 $\pm$ 0,56 <sup>bc</sup> <sub>xy</sub>	4,67 $\pm$ 1,69 <sup>bc</sup> <sub>y</sub>
4	8,25 $\pm$ 0,59 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	5,99 $\pm$ 2,03 <sup>abcd</sup> <sub>x</sub>	5,21 $\pm$ 1,82 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	5,60 $\pm$ 1,67 <sup>bcd</sup> <sub>x</sub>
5	7,99 $\pm$ 1,51 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	5,80 $\pm$ 0,17 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	7,42 $\pm$ 0,57 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>	6,54 $\pm$ 2,11 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>
6	8,38 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	8,34 $\pm$ 0,16 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	7,91 $\pm$ 0,98 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	6,75 $\pm$ 1,97 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>
7	9,25 $\pm$ 0,39 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	7,58 $\pm$ 0,70 <sup>cd</sup> <sub>y</sub>	8,46 $\pm$ 0,18 <sup>d</sup> <sub>xy</sub>	8,34 $\pm$ 0,92 <sup>d</sup> <sub>xy</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

#### Inoculación previa con *Salmonella* Hadar

Los recuentos de la carne inoculada con *Salmonella enterica* Hadar (tabla 25) muestran un incremento a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento, menos acusado en el caso de las muestras tratadas con ácido ascórbico. Este tratamiento obtuvo el valor más bajo ( $7,00 \pm 2,03 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de los recuentos el último día del estudio respecto del resto de tratamientos ( $P < 0,05$ ). Sin embargo, el tratamiento que dio lugar a valores más bajos el día que se trataron las paletillas fue el ácido láctico al 2% ( $2,21 \pm 2,62 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>).

**Tabla 25.** Recuento de la flora o microbiota aerobia viable ( $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes inoculadas con *Salmonella* Hadar (media  $\pm$  desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
	Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
0	5,31 $\pm$ 1,11 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,60 $\pm$ 1,09 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	4,20 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	2,21 $\pm$ 2,62 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
1	5,98 $\pm$ 0,81 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,57 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	4,11 $\pm$ 1,24 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	2,26 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
2	6,92 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	5,91 $\pm$ 2,53 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>	4,44 $\pm$ 1,03 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	3,40 $\pm$ 1,21 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>
3	7,85 $\pm$ 1,35 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	7,01 $\pm$ 1,44 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	6,37 $\pm$ 1,11 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	5,25 $\pm$ 1,88 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>
4	8,33 $\pm$ 0,52 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	5,44 $\pm$ 0,97 <sup>ab</sup> <sub>yz</sub>	7,56 $\pm$ 2,14 <sup>b</sup> <sub>xy</sub>	4,84 $\pm$ 1,25 <sup>abc</sup> <sub>z</sub>
5	8,41 $\pm$ 0,99 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	5,87 $\pm$ 1,13 <sup>abc</sup> <sub>y</sub>	7,42 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup> <sub>xy</sub>	6,08 $\pm$ 1,51 <sup>bc</sup> <sub>y</sub>
6	8,72 $\pm$ 0,36 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	8,07 $\pm$ 0,77 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	7,63 $\pm$ 1,16 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	6,99 $\pm$ 1,32 <sup>c</sup> <sub>x</sub>
7	9,50 $\pm$ 0,39 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	7,93 $\pm$ 0,54 <sup>c</sup> <sub>xy</sub>	7,00 $\pm$ 2,03 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	7,66 $\pm$ 1,28 <sup>c</sup> <sub>xy</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

#### Inoculación previa con SARM

Los recuentos de las paletillas inoculadas con SARM aumentan a medida que avanzan los días de almacenamiento, al igual que en las muestras inoculadas con otros microorganismos. La tabla 26 refleja este aumento, más acentuado en las muestras tratadas con ácido láctico, a pesar de que estas presentan el menor recuento ( $P < 0,05$ ) el día del tratamiento ( $1,93 \pm 0,34 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>). No hubo diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) el día 7 entre los diversos tratamientos; aun así, la carne tratada con fosfato trisódico muestra el valor más bajo ( $7,19 \pm 2,15 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) y la no tratada, el más alto ( $9,17 \pm 0,66 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>).

Tabla 26. Recuento de la flora o microbiota viable ( $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes inoculadas con SARM (media  $\pm$  desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
	Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
0	4,75 $\pm$ 1,94 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,04 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	2,38 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	1,93 $\pm$ 0,34 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>
1	5,97 $\pm$ 0,75 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	4,67 $\pm$ 1,09 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	3,37 $\pm$ 0,53 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	1,23 $\pm$ 0,67 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
2	7,21 $\pm$ 1,42 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	5,21 $\pm$ 1,02 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>	3,70 $\pm$ 1,73 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	3,65 $\pm$ 0,98 <sup>bc</sup> <sub>y</sub>
3	7,89 $\pm$ 1,36 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	5,80 $\pm$ 0,60 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	5,69 $\pm$ 1,89 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	6,84 $\pm$ 0,70 <sup>de</sup> <sub>x</sub>
4	7,81 $\pm$ 0,98 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	4,67 $\pm$ 1,67 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	5,85 $\pm$ 2,07 <sup>bc</sup> <sub>xy</sub>	4,86 $\pm$ 1,04 <sup>cd</sup> <sub>xy</sub>
5	8,01 $\pm$ 1,34 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	6,86 $\pm$ 1,03 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	6,47 $\pm$ 1,33 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	6,24 $\pm$ 1,15 <sup>de</sup> <sub>x</sub>
6	8,69 $\pm$ 0,23 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	7,29 $\pm$ 0,77 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	6,34 $\pm$ 2,50 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	6,68 $\pm$ 2,73 <sup>de</sup> <sub>x</sub>
7	9,17 $\pm$ 0,66 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	7,19 $\pm$ 2,15 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	7,37 $\pm$ 1,45 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	8,19 $\pm$ 1,21 <sup>e</sup> <sub>x</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

#### Inoculación previa con EFRV

El día 0, las muestras tratadas con ácido láctico mostraron los valores más bajos ( $1,81 \pm 0,97 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) ( $P < 0,05$ ) (tabla 27). Esto se mantiene a lo largo del tiempo y al finalizar el estudio se observa que las muestras tratadas con este ácido dieron lugar al recuento más bajo ( $6,89 \pm 1,50 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) junto a las tratadas con fosfato trisódico ( $6,97 \pm 1,24 \log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>). Los recuentos reflejan un incremento desde el primer día hasta la finalización del estudio.

**Tabla 27.** Recuento de la flora o microbiota aerobia viable ( $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup>) de la superficie de paletillas de conejo no tratadas y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes inoculadas con EFRV (media  $\pm$  desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
	Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
0	5,24 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,25 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	3,12 $\pm$ 0,64 <sup>a</sup> <sub>yz</sub>	1,81 $\pm$ 0,97 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
1	5,80 $\pm$ 0,51 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	3,85 $\pm$ 1,29 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	3,48 $\pm$ 2,00 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	1,37 $\pm$ 1,15 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
2	6,87 $\pm$ 1,47 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	4,20 $\pm$ 1,38 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	4,88 $\pm$ 1,57 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>	4,04 $\pm$ 0,79 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
3	8,82 $\pm$ 0,30 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	6,68 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup> <sub>xy</sub>	4,67 $\pm$ 1,68 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	4,58 $\pm$ 1,53 <sup>bc</sup> <sub>y</sub>
4	7,88 $\pm$ 1,09 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>	6,33 $\pm$ 0,67 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	6,71 $\pm$ 0,65 <sup>bcd</sup> <sub>xy</sub>	4,03 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup> <sub>z</sub>
5	8,18 $\pm$ 0,78 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>	6,32 $\pm$ 1,01 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	7,03 $\pm$ 1,18 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>	6,35 $\pm$ 0,79 <sup>cd</sup> <sub>x</sub>
6	8,69 $\pm$ 0,26 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	7,65 $\pm$ 0,51 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	7,24 $\pm$ 0,76 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	5,20 $\pm$ 1,81 <sup>bcd</sup> <sub>y</sub>
7	9,29 $\pm$ 0,09 <sup>d</sup> <sub>x</sub>	6,97 $\pm$ 1,24 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	8,15 $\pm$ 0,42 <sup>d</sup> <sub>xy</sub>	6,89 $\pm$ 1,50 <sup>d</sup> <sub>y</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Resultados de pH

Los valores medios de pH de la tabla 28 se calcularon a partir del promedio de las tres réplicas por cada tratamiento e inoculación, y después del promedio de cada tratamiento para cada día de almacenamiento, sin tener en cuenta la inoculación. Se realizó de esta manera porque no se observaron diferencias significativas entre los valores de pH de muestras inoculadas con distintos microorganismos.

En todos los casos para un mismo día, el mayor valor de pH se observa en las muestras tratadas con fosfato trisódico (entre 7,11  $\pm$  0,08 y 8,16  $\pm$  0,15), seguidas de las no tratadas (entre 6,53  $\pm$  0,13 y 6,98  $\pm$  0,11), de las tratadas con ácido ascórbico (entre 5,56  $\pm$  0,27 y 6,43  $\pm$  0,14) y ácido láctico (entre 5,06  $\pm$  0,24 y 6,14  $\pm$  0,14). A pesar de que este orden no varía a lo largo del tiempo, el pH no se mantiene constante. En el caso de la carne no tratada y la tratada con ácido láctico el pH aumenta, sobre todo entre el sexto y séptimo día. También aumenta en las muestras tratadas con ácido ascórbico entre el primer y segundo día y se mantiene constante hasta el último día. Sucede lo contrario

para el caso de las paletillas sumergidas en fosfato trisódico, en las cuales se observa una disminución en el pH, aunque aumenta ligeramente entre los días sexto y séptimo.

**Tabla 28.** Valores medios de pH de la superficie de paletillas de conejo no tratadas (control) y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes con o sin inoculación previa (media  $\pm$  desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
	Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
0	6,53 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,16 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,56 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	5,06 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
1	6,64 $\pm$ 0,07 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	7,75 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	6,07 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	5,29 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
2	6,63 $\pm$ 0,08 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	7,56 $\pm$ 0,14 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	6,10 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	5,35 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
3	6,71 $\pm$ 0,12 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	7,41 $\pm$ 0,25 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	6,09 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	5,31 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
4	6,62 $\pm$ 0,10 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	7,56 $\pm$ 0,15 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	6,14 $\pm$ 0,18 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	5,34 $\pm$ 0,14 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
5	6,79 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	7,52 $\pm$ 0,20 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	6,12 $\pm$ 0,12 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	5,35 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
6	6,78 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup> <sub>x</sub>	7,11 $\pm$ 0,08 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	6,13 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	5,77 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup> <sub>z</sub>
7	6,98 $\pm$ 0,11 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	7,50 $\pm$ 0,19 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	6,43 $\pm$ 0,14 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	6,14 $\pm$ 0,14 <sup>c</sup> <sub>z</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Análisis sensorial

Como refleja la tabla 29 las puntuaciones medias obtenidas para cada tratamiento y para los tres parámetros (color, olor y aceptabilidad general) disminuyen a medida que avanzan los días.

Respecto del parámetro del color, el tratamiento que obtuvo la menor puntuación el día 0 fue el de ácido láctico ( $6,27 \pm 0,31$ ) seguido del ácido ascórbico ( $6,93 \pm 0,31$ ), del fosfato trisódico ( $8,13 \pm 0,12$ ) y de las paletillas sin tratar ( $8,73 \pm 0,12$ ), cuya nota fue la más alta. Cuando avanza el tiempo, las paletillas control dejan de obtener la mayor puntuación y su nota pasa a ser la más baja el día 7 ( $3,07 \pm 1,03$ ), aunque sin presentar diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) respecto del resto de tratamientos. Las paletillas tratadas con ácido láctico fueron las que obtuvieron la menor puntuación al principio del estudio, y la segunda peor el último día de almacenamiento ( $3,13 \pm 0,46$ ). Esto puede deberse a que las paletillas tratadas con este ácido presentaron, en algunos casos, zonas blanquecinas con el aspecto de la carne cocida. La carne tratada con fosfato trisódico

obtuvo la segunda mejor puntuación el primer día y fue la carne mejor valorada el último día de almacenamiento a refrigeración ( $4,40 \pm 0,72$ ).

Los valores del análisis del olor y de la aceptabilidad general son similares a los obtenidos para el color. El día del tratamiento, la carne sin tratar presenta el mayor valor (olor:  $9,00 \pm 0,00$ ; aceptabilidad general:  $8,87 \pm 0,12$ ), y la carne tratada con ácido láctico, la menor (olor:  $7,20 \pm 0,20$ ; aceptabilidad general:  $6,67 \pm 0,31$ ). El último día, las paletillas sin tratar obtuvieron la menor puntuación (olor:  $2,93 \pm 1,60$ ; aceptabilidad general:  $2,33 \pm 1,10$ ) seguidas de las tratadas con ácido láctico (olor:  $4,20 \pm 0,20$ ; aceptabilidad general:  $3,07 \pm 0,23$ ). Aunque la carne tratada con fosfato trisódico obtuvo una puntuación mayor el día 0 (olor:  $8,40 \pm 0,53$ ; aceptabilidad general:  $8,40 \pm 0,35$ ) que la tratada con ácido ascórbico (olor:  $7,40 \pm 0,20$ ; aceptabilidad general:  $7,27 \pm 0,61$ ), una vez terminado el estudio, es la tratada con ácido ascórbico la que presenta las puntuaciones más altas (olor:  $5,13 \pm 1,50$ ; aceptabilidad general:  $4,27 \pm 1,72$ ) no solo respecto de la carne tratada con fosfato trisódico (olor:  $4,47 \pm 1,33$ ; aceptabilidad general:  $3,93 \pm 0,99$ ) sino también de la no tratada y la tratada con ácido láctico.

**Tabla 29.** Valores de los parámetros de color, olor y aceptabilidad general del análisis sensorial de paletillas de conejo no tratadas (control) y tratadas con diversos tratamientos descontaminantes (media  $\pm$  desviación estándar)

Parámetros	Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
		Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
Color	0	$8,73 \pm 0,12^a_w$	$8,13 \pm 0,12^a_x$	$6,93 \pm 0,31^a_y$	$6,27 \pm 0,31^a_z$
	1	$8,58 \pm 0,14^a_w$	$8,17 \pm 0,14^a_w$	$6,00 \pm 0,25^{ab}_x$	$4,75 \pm 0,50^b_y$
	2	$8,07 \pm 0,23^a_w$	$8,13 \pm 0,31^a_w$	$7,07 \pm 0,81^a_x$	$5,00 \pm 0,40^b_y$
	3	$8,58 \pm 0,18^a_w$	$7,80 \pm 0,53^a_x$	$6,27 \pm 0,31^a_y$	$4,67 \pm 0,12^b_z$
	4	$8,47 \pm 0,12^a_w$	$7,67 \pm 0,23^{ab}_{wx}$	$6,47 \pm 1,33^a_x$	$4,80 \pm 0,87^b_y$
	5	$7,67 \pm 0,12^a_w$	$6,73 \pm 0,46^{b}_{wx}$	$5,60 \pm 1,22^{ab}_{xy}$	$4,27 \pm 1,17^{bc}_y$
	6	$4,93 \pm 1,33^b_{wx}$	$5,27 \pm 1,10^c_{wx}$	$5,73 \pm 1,22^{ab}_w$	$3,27 \pm 0,23^{cd}_x$
	7	$3,07 \pm 1,03^c_w$	$4,40 \pm 0,72^c_w$	$4,20 \pm 1,59^b_w$	$3,13 \pm 0,46^d_w$
Olor	0	$9,00 \pm 0,00^a_w$	$8,40 \pm 0,53^a_x$	$7,40 \pm 0,20^a_y$	$7,20 \pm 0,20^a_y$
	1	$8,92 \pm 0,14^a_w$	$8,33 \pm 0,14^a_w$	$6,67 \pm 1,23^{ab}_x$	$5,83 \pm 0,14^b_x$

	2	8,33 ± 0,12 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,27 ± 0,31 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,60 ± 0,40 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	6,07 ± 0,42 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	3	8,55 ± 0,28 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,53 ± 0,23 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	6,13 ± 0,23 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	5,73 ± 0,31 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	4	8,53 ± 0,12 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,00 ± 0,35 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,07 ± 1,33 <sup>a</sup> <sub>wx</sub>	6,13 ± 0,92 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	5	7,80 ± 0,20 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,93 ± 0,23 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	5,80 ± 0,92 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	5,67 ± 0,23 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	6	4,53 ± 2,21 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	5,53 ± 1,50 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	5,13 ± 0,90 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	4,80 ± 0,35 <sup>c</sup> <sub>w</sub>
	7	2,93 ± 1,60 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	4,47 ± 1,33 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	5,13 ± 1,50 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	4,20 ± 0,20 <sup>c</sup> <sub>w</sub>
	0	8,87 ± 0,12 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,40 ± 0,35 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,27 ± 0,61 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	6,67 ± 0,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	1	8,83 ± 0,14 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,25 ± 0,25 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,00 ± 0,25 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	4,83 ± 0,52 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	2	8,20 ± 0,35 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	8,00 ± 0,20 <sup>ab</sup> <sub>w</sub>	6,87 ± 0,50 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	5,40 ± 0,20 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
<b>Aceptabilidad general</b>	3	8,57 ± 0,06 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,60 ± 0,20 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	5,93 ± 0,58 <sup>abc</sup> <sub>y</sub>	4,87 ± 0,23 <sup>b</sup> <sub>z</sub>
	4	8,53 ± 0,12 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	7,73 ± 0,23 <sup>ab</sup> <sub>wx</sub>	6,67 ± 1,22 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	5,33 ± 1,10 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	5	7,80 ± 0,00 <sup>a</sup> <sub>w</sub>	6,80 ± 0,53 <sup>b</sup> <sub>wx</sub>	5,47 ± 1,10 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>	4,60 ± 0,87 <sup>b</sup> <sub>y</sub>
	6	4,13 ± 1,62 <sup>b</sup> <sub>w</sub>	5,07 ± 1,45 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	5,20 ± 1,06 <sup>bc</sup> <sub>w</sub>	3,53 ± 0,31 <sup>c</sup> <sub>w</sub>
	7	2,33 ± 1,10 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	3,93 ± 0,99 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	4,27 ± 1,72 <sup>c</sup> <sub>w</sub>	3,07 ± 0,23 <sup>c</sup> <sub>w</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas ( $P < 0,05$ ). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas ( $P < 0,05$ ).

### Análisis de color

Todos los parámetros del análisis de color, excepto los valores de  $a^*$ , presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) a lo largo del tiempo y también entre los diversos tratamientos aplicados como puede observarse en la tabla 30.

Los parámetros de color de las paletillas no tratadas no varían a medida que pasa el tiempo, a excepción del parámetro  $b^*$  (amarillo/azul) que se reduce hasta el día 2 ( $7,35 \pm 1,18$ ) y, a partir de este, aumenta hasta el día 6 ( $11,84 \pm 2,05$ ) y disminuye levemente el día 7 ( $11,62 \pm 0,93$ ).

En el caso de las paletillas tratadas con fosfato trisódico, el valor  $L^*$  se mantiene similar a lo largo del tiempo. El día 4 se observa el mayor valor ( $60,71 \pm 2,08$ ) y el 6, el menor ( $55,99 \pm 2,12$ ). El valor  $a^*$  y la saturación no varían a medida que aumenta el tiempo. En relación al parámetro  $b^*$  y al matiz, existe un aumento en ambos.

El tratamiento con ácido ascórbico no presenta diferencias a medida que se sucede el tiempo en los parámetros  $L^*$  y  $a^*$ , aunque en el resto de parámetros existen oscilaciones entre los días de almacenamiento y se observa en términos generales un aumento en los valores alcanzados.

Al igual que en la carne tratada con ácido ascórbico, los valores de  $b^*$ , de la saturación y el matiz de la carne tratada con ácido láctico, experimentan un aumento significativo ( $P < 0,05$ ) entre el día 0 y 7. En relación a la luminosidad existe un aumento entre el día 0 y 1, manteniéndose este valor estable hasta el día 7. En cuanto al parámetro  $a^*$ , no existen diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los valores observados en días distintos.

El primer día, las paletillas tratadas con ácido ascórbico tienen el mayor valor ( $64,35 \pm 0,88$ ) de  $L^*$ , lo cual varía el día 7 de almacenamiento, ya que ese día es la carne tratada con ácido láctico el que presenta el mayor valor ( $64,95 \pm 2,61$ ). El valor de  $a^*$  de los diversos tratamientos no presenta diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), pero el día 0, la superficie de la carne no tratada tiene el valor más alto ( $6,12 \pm 1,62$ ), al igual que sucede el último día del estudio ( $5,72 \pm 3,40$ ). El valor  $b^*$  de estas últimas muestras también presenta valores elevados el día 0 ( $8,52 \pm 2,13$ ) y el día 7 ( $11,62 \pm 0,93$ ), que son similares a los valores de la carne tratada con ácido láctico el día 0 ( $8,69 \pm 2,10$ ) y el día 7 ( $10,81 \pm 0,64$ ). La saturación presenta los valores más altos, tanto para el primer como el último día de los análisis, en las muestras no tratadas (día 0:  $10,56 \pm 2,24$ ; día 7:  $13,18 \pm 1,83$ ). En relación al matiz, aunque sin diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), es el tratamiento con ácido láctico el que da como resultado los valores más altos (día 0:  $66,08 \pm 6,35$ ; día 7:  $73,32 \pm 5,03$ ).

**Tabla 30.** Valores de color (espacio CIE  $L^*a^*b^*$ ) de paletillas de conejo no tratadas (control) y de muestras tratadas con diversos tratamientos descontaminantes (media  $\pm$  desviación estándar)

Parámetros	Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento			
		Control	Fosfato trisódico (8%)	Ácido ascórbico (2%)	Ácido láctico (2%)
CIE $L^*$	0	$59,05 \pm 4,38^{a_{xy}}$	$59,30 \pm 2,76^{ab_{xy}}$	$64,35 \pm 0,88^a_x$	$58,05 \pm 1,80^a_y$
	1	$59,44 \pm 4,40^a_x$	$57,59 \pm 1,79^{ab}_x$	$65,19 \pm 1,89^a_y$	$62,88 \pm 2,03^{b_{xy}}$
	2	$58,88 \pm 4,06^{a_{xy}}$	$56,95 \pm 3,27^{ab}_x$	$65,09 \pm 2,17^a_z$	$63,69 \pm 0,86^{b_{yz}}$
	3	$59,09 \pm 3,66^a_x$	$59,52 \pm 1,71^{ab}_x$	$63,96 \pm 3,49^a_x$	$63,04 \pm 0,94^b_x$
	4	$56,49 \pm 1,19^a_x$	$60,71 \pm 2,08^{a_{xy}}$	$63,85 \pm 2,99^{a_{yz}}$	$66,25 \pm 3,33^b_z$
	5	$57,09 \pm 0,85^a_x$	$59,99 \pm 2,01^{ab_{xy}}$	$62,48 \pm 3,52^{a_{xy}}$	$63,89 \pm 5,33^b_y$
	6	$57,10 \pm 1,89^a_x$	$55,99 \pm 2,12^b_x$	$63,37 \pm 2,90^a_y$	$63,71 \pm 1,74^b_y$
	7	$57,14 \pm 3,54^a_x$	$58,99 \pm 2,07^{ab}_x$	$62,66 \pm 3,11^{a_{xy}}$	$64,95 \pm 2,61^b_y$

CIE a*	0	6,12 ± 1,62 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,73 ± 2,78 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,35 ± 0,60 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,77 ± 0,76 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	1	5,51 ± 2,41 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,35 ± 2,08 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,80 ± 0,65 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	2,66 ± 0,17 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	2	6,33 ± 1,74 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,93 ± 2,87 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,05 ± 0,93 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,59 ± 0,75 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	3	5,79 ± 0,87 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,51 ± 1,70 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	4,32 ± 0,65 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	3,75 ± 0,86 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>
	4	7,07 ± 1,30 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	2,99 ± 1,04 <sup>a</sup> <sub>yz</sub>	4,13 ± 0,71 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	2,01 ± 1,05 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
	5	6,50 ± 1,94 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,41 ± 0,78 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	5,47 ± 2,07 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,94 ± 3,32 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	6	5,26 ± 1,98 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,80 ± 1,49 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,83 ± 0,14 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,30 ± 0,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
	7	5,72 ± 3,40 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,92 ± 0,49 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,84 ± 1,55 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	3,25 ± 1,04 <sup>a</sup> <sub>x</sub>
CIE b*	0	8,52 ± 2,13 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	2,70 ± 2,81 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	5,35 ± 0,45 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	8,69 ± 2,10 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>
	1	7,98 ± 2,62 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	2,43 ± 1,55 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	5,01 ± 2,26 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	6,94 ± 1,34 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>
	2	7,35 ± 1,18 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	5,13 ± 1,82 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	6,02 ± 0,20 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	9,90 ± 1,29 <sup>bc</sup> <sub>y</sub>
	3	7,47 ± 3,48 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	2,83 ± 0,89 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	6,81 ± 0,87 <sup>bcd</sup> <sub>xy</sub>	9,38 ± 2,22 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>
	4	7,88 ± 2,17 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	3,33 ± 1,58 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	3,44 ± 0,06 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	5,84 ± 0,39 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>
	5	8,27 ± 1,86 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	4,26 ± 0,52 <sup>ab</sup> <sub>y</sub>	5,42 ± 1,51 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	7,20 ± 2,22 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>
	6	11,84 ± 2,05 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	6,75 ± 2,87 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	7,77 ± 0,59 <sup>cd</sup> <sub>xy</sub>	10,87 ± 2,45 <sup>c</sup> <sub>xy</sub>
	7	11,62 ± 0,93 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	7,26 ± 0,93 <sup>b</sup> <sub>y</sub>	8,42 ± 1,58 <sup>d</sup> <sub>y</sub>	10,81 ± 0,64 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
CIE c*	0	10,56 ± 2,24 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,66 ± 3,85 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	6,91 ± 0,54 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	9,51 ± 1,96 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>
	1	9,90 ± 2,60 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,23 ± 2,37 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	6,33 ± 2,19 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	7,45 ± 1,23 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>
	2	9,81 ± 1,11 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	7,22 ± 3,05 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	7,27 ± 0,64 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	10,53 ± 1,45 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>
	3	9,63 ± 2,77 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,52 ± 1,83 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	8,07 ± 1,01 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>	10,11 ± 2,33 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>
	4	10,59 ± 2,48 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	4,48 ± 1,87 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	5,38 ± 0,56 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	6,22 ± 0,69 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	5	10,56 ± 2,40 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	5,46 ± 0,88 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	7,74 ± 2,37 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>	8,40 ± 3,32 <sup>abc</sup> <sub>xy</sub>
	6	13,05 ± 2,11 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,39 ± 2,76 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	9,16 ± 0,45 <sup>bc</sup> <sub>xy</sub>	11,39 ± 2,40 <sup>c</sup> <sub>xy</sub>
	7	13,18 ± 1,83 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	8,27 ± 0,69 <sup>a</sup> <sub>z</sub>	9,76 ± 1,83 <sup>c</sup> <sub>yz</sub>	11,32 ± 0,71 <sup>c</sup> <sub>xy</sub>
CIE h*	0	54,27 ± 7,95 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	31,86 ± 13,31 <sup>a</sup> <sub>y</sub>	50,97 ± 4,33 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	66,08 ± 6,35 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>
	1	55,22 ± 13,21 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	38,80 ± 17,33 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>	51,15 ± 7,64 <sup>ab</sup> <sub>xy</sub>	68,57 ± 4,40 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	2	49,46 ± 10,31 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	49,52 ± 14,29 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	56,35 ± 5,43 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	70,16 ± 2,08 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	3	50,02 ± 12,86 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	40,39 ± 8,32 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	57,60 ± 2,90 <sup>a</sup> <sub>yz</sub>	68,18 ± 2,84 <sup>a</sup> <sub>z</sub>
	4	47,69 ± 2,52 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	46,81 ± 4,76 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	40,14 ± 4,89 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	52,16 ± 32,24 <sup>ab</sup> <sub>x</sub>
	5	52,00 ± 6,82 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	51,62 ± 3,59 <sup>abc</sup> <sub>x</sub>	45,18 ± 7,62 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	38,82 ± 28,11 <sup>b</sup> <sub>x</sub>
	6	66,22 ± 8,71 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	53,44 ± 12,66 <sup>bc</sup> <sub>x</sub>	58,06 ± 2,60 <sup>a</sup> <sub>xy</sub>	72,72 ± 4,58 <sup>a</sup> <sub>y</sub>
	7	64,90 ± 13,79 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	61,38 ± 5,66 <sup>c</sup> <sub>x</sub>	60,26 ± 7,00 <sup>a</sup> <sub>x</sub>	73,32 ± 5,03 <sup>a</sup> <sub>x</sub>

Los valores de una columna con superíndices diferentes presentan diferencias significativas (P<0,05). Los valores dentro de la misma fila con subíndices distintos muestran diferencias significativas (P<0,05).

## DISCUSIÓN

Existen pocos estudios relacionados con la carne de conejo y sobre tratamientos de la superficie de este tipo de carne con antimicrobianos. En general, la mayoría de estudios analizan los efectos de las modificaciones en la composición de la dieta ([Abdel-Wareth](#)

[et al., 2019](#); [Dabbou et al., 2017](#); [Dalle Zotte et al., 2016a](#); [Echegaray et al., 2018](#); [Koné et al., 2015](#); [Mancini et al., 2015](#)) y de la influencia del sexo y de la raza sobre la carne ([Dalle Zotte et al., 2016b](#); [Fadare y Arogbo, 2015](#); [Kozioł et al., 2017](#); [Maj et al., 2012](#); [Tůmová et al., 2014](#)).

Otros autores han realizado experimentos similares al nuestro, pero en carne de pollo, como los estudios de del Río *et al.* ([2006](#), [2007a](#)) o Alonso-Hernando *et al.* ([2012a](#)), en el que se basa este método. En este caso, las muestras se inocularon con *Salmonella* Enteritidis y *Listeria monocytogenes*, entre otros, y se sumergieron en una solución de fosfato trisódico al 12% para comparar su efecto respecto de muestras no tratadas. El estudio de Alonso-Hernando *et al.* ([2015](#)) es similar. Inocularon *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, entre otros, en carne de pollo antes de tratarla con ácido cítrico al 2% y fosfato trisódico al 12%, entre otros tratamientos, y midieron la carga microbiana y el pH a lo largo del tiempo bajo distintas condiciones de rotura de la cadena de frío. En otro experimento ([Elmali et al., 2012](#)), se inoculó *Listeria monocytogenes* sobre carne de vacuno y se trató con distintos tratamientos descontaminantes, entre ellos, ácido láctico al 1% y ácido láctico al 2%.

En nuestro estudio, las paletillas de conejo habían sido cortadas e introducidas en bandejas con atmósfera de aire sin especificar la fecha del sacrificio del conejo. Esta circunstancia complica la comparación de los resultados con los obtenidos por otros autores. La temperatura a la cual se almacena la carne de conejo influye en la calidad de esta, provocando un aumento de la carga microbiana a temperaturas más altas ([Lan et al., 2016](#)). En otros estudios, la carne se mantuvo a 0 °C ([Rodríguez-Calleja et al., 2005](#)) o a 4 °C ([Kozioł et al., 2015](#); [Lan et al., 2016](#); [Nakyinsige et al., 2015](#)).

## **Recuentos microbiológicos**

### Sin inoculación

El día del tratamiento no se observaron diferencias entre las paletillas tratadas y las no tratadas, tampoco entre los distintos tratamientos. A pesar de esto, los tratamientos fueron efectivos durante los días de almacenamiento, ya que la carne tratada mantuvo una carga microbiana más baja que la no tratada. Esta diferencia fue más

acusada en las tratadas con fosfato trisódico y menos en las tratadas con ácido láctico. La reducción de los recuentos de microorganismos mesófilos después de tratar la carne con fosfato trisódico también se ha observado sobre carne de pollo ([Del Río et al., 2007b](#)).

Según Rodríguez-Calleja *et al.* ([2005](#)), se considera que la carne de conejo está deteriorada cuando el recuento de la flora aerobia viable alcanza los 8,0 log<sub>10</sub> ufc/g. Aunque otros autores, como Lan *et al.* ([2016](#)), consideran que la carne de conejo está alterada cuando se alcanzan las 6,0 log<sub>10</sub> ufc/g. Teniendo en cuenta este último dato, los tratamientos con fosfato trisódico o con ácido ascórbico aumentaron un par de días la duración de la carne respecto al control; mientras que el tratamiento con ácido láctico alargó su vida útil tres días. Como cabría esperar, las muestras inoculadas antes del tratamiento mostraron una menor vida útil.

En comparación con el estudio de Nakyinsige *et al.* ([2015](#)), en el que se realizó el recuento de la flora aerobia viable de carne de conejo almacenada a 4 °C, los resultados aquí presentados son inferiores el día 0 pero superiores el día 7. En general, los resultados de otros autores reflejan recuentos de la flora aerobia viable superiores a los que obtuvieron las paletillas sin inocular de este estudio ([Badr, 2004](#); [Cwiková y Pytel, 2017](#); [Kohler et al., 2008](#); [Pereira y Malfeito-Ferreira, 2015](#); [Rodríguez-Calleja et al., 2004, 2005](#)). En algunos casos, la carne fue troceada y picada ([Badr, 2004](#)), lo que pudo propiciar una mayor proliferación de microorganismos, característica de la carne procesada ([Cwiková y Pytel, 2017](#)).

Otros autores han utilizado distintos tratamientos antimicrobianos sobre carne de pollo, tal como Singh *et al.* ([2017](#)) con fosfato trisódico al 8% junto con un baño de agua caliente, dando como resultado cifras superiores a las aquí presentadas, al igual que en el estudio de Capita *et al.* ([2013](#)) con fosfato trisódico al 12% y ácido ascórbico al 2%. En el estudio de Rahman *et al.* ([2016](#)), los recuentos de la flora aerobia viable en carne de pollo tratada con fosfato trisódico al 10% y ácido ascórbico al 2% fueron similares a los nuestros.

### Muestras inoculadas

Las muestras inoculadas presentaron valores mayores que las no inoculadas, lo cual era de esperar. Los recuentos obtenidos son comparados con estudios de carne de pollo, ya que no se han encontrado estudios similares al nuestro en carne de conejo. En carne de pollo sin tratar inoculada con distintos microorganismos patógenos los recuentos fueron superiores a los aquí descritos, oscilando entre  $1,33 \pm 0,33$  y  $4,41 \pm 0,90$   $\log_{10}$  ufc/cm<sup>2</sup> ([Alonso-Hernando et al., 2015](#)).

En las paletillas inoculadas con *Listeria monocytogenes* el ácido láctico fue el más eficaz a la hora de reducir la carga de flora aerobia viable el día del tratamiento. Pero fue el fosfato trisódico, a medida que pasaron los días, el que mantuvo los recuentos más bajos.

Según otros autores, la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en carne de conejo es del 5,9% ([Rodríguez-Calleja et al., 2006](#)) y de 3,81  $\log_{10}$  ufc/g en carne cruda de conejo recién sacrificado ([Badr, 2004](#)). Aunque no todos los autores han aislado *L. monocytogenes* de esta carne ([Kohler et al., 2008](#)).

En estudios referidos a carne de pollo inoculada con este microorganismo ([Alonso-Hernando et al., 2013b, 2015](#); [Del Río et al., 2007a](#)), los tratamientos con fosfato trisódico al 12% también mostraron eficacia frente a las muestras sin tratar, obteniendo valores inferiores a los aquí presentados.

El tratamiento con ácido láctico fue el más efectivo el día del tratamiento en las muestras inoculadas con *Salmonella*, siendo el ácido ascórbico el que mantuvo el valor más bajo el último día del estudio.

En carne de conejo, la prevalencia de especies de *Salmonella* es menor del 2% ([Rodríguez-Calleja et al., 2006](#)), como en el estudio de Kohler et al. (2008) en el que no encontraron *Salmonella* sobre canales de conejo.

La carne de pollo preinoculada de *Salmonella* Enteritidis y después tratada con fosfato trisódico al 12% ([Del Río et al., 2007a](#)) presentó reducciones en la carga microbiana mayores que las obtenidas en este estudio. Otros autores, como

Alonso-Hernando *et al.* ([2013b](#)), también observaron estas reducciones aunque, en este, los recuentos fueron inferiores a los aquí presentados.

El ácido ascórbico y el ácido láctico fueron los tratamientos más efectivos frente a la carga microbiana en las paletillas preinoculadas con SARM. Pero a lo largo del tiempo no se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los recuentos de la carne tratada con tratamientos distintos.

En carne de conejo, se ha determinado que la prevalencia de *Staphylococcus aureus* es de 52,9% con recuentos de  $1,37 \pm 0,79 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$  ([Rodríguez-Calleja et al., 2006](#)). Esta cifra es superior en el estudio de Badr ([2004](#)) con un recuento de  $3,98 \log_{10} \text{ ufc/g}$  en carne cruda de conejo recién sacrificado. Kohler *et al.* ([2008](#)) encontraron estafilococos coagulasa positivos en la superficie de un 30,6% de canales de conejo. De este porcentaje, un 98,7% fue identificado como *Staphylococcus aureus*.

En estudios ya mencionados ([Alonso-Hernando et al., 2013b, 2015](#)) de carne de pollo tratada con fosfato trisódico al 12% inoculada previamente con *Staphylococcus aureus*, se han observado niveles inferiores tanto de la carga microbiana como de la diferencia respecto de las muestras no tratadas en comparación con nuestro estudio ([Del Río et al., 2007a](#)).

En las paletillas inoculadas con EFRV, el tratamiento con ácido láctico fue el más efectivo una vez aplicado, y el que mantuvo la carga más baja seguido del fosfato trisódico.

La carne es un reservorio de EFRV, lo que supone un riesgo sanitario para los consumidores ([Messi et al., 2006](#)). En el estudio de Badr ([2004](#)) se obtuvo un recuento de *Enterococcus faecalis* de  $4,26 \log_{10} \text{ ufc/g}$  en carne cruda de conejo recién sacrificado. Este valor es inferior a los presentados en esta tesis, ya que esta carne no fue inoculada previamente. En enterococos aislados de carne de pollo, un 67,5% fueron EFRV ([Talebi et al., 2015](#)).

## Resultados de pH

Sobre el pH de la carne de conejo existen diversos estudios ([Blasco y Piles, 1990](#); [Hulot y Ouhayoun, 1999](#); [Kozioł et al., 2015](#)). Rodríguez-Calleja *et al.* ([2005](#)) defiende que

los microorganismos que suelen degradar la carne de conejo (*Pseudomonas*, levaduras y *Brochothrix thermosphacta*), generan valores más altos de pH que los de la carne roja.

El pH de la carne de conejo está alrededor de 5,86 ([Hulot y Ouhayoun, 1999](#)), aunque existe heterogeneidad entre músculos diferentes y entre partes del mismo músculo. Además, existen ciertos factores que provocan la variación del pH, entre ellos, el peso y edad del conejo cuando fue sacrificado; factores genéticos como el sexo o la raza; la dieta, el tratamiento *ante mortem*, el modo de sacrificio, o el tratamiento *post mortem* como puede ser el enfriamiento ([Hulot y Ouhayoun, 1999](#)); además de factores tecnológicos como los cambios en ciertos metabolitos; por ejemplo, el glucógeno ([Dalle Zotte, 2002](#)). La media de pH que obtuvo Rodríguez-Calleja *et al.* ([2004](#)) en canales de conejo fue 5,98, valor ligeramente superior al 5,86 que expusieron Hulot y Ouhayoun ([1999](#)); mientras que Pereira y Malfeito-Ferreira ([2015](#)) obtuvieron valores de pH entre  $6,01 \pm 0,06$  y  $6,36 \pm 0,20$ . En comparación, las paletillas control mostraron valores de pH superiores que, además, fueron aumentando a medida que pasó el tiempo.

Después de 24 horas de almacenamiento después del sacrificio, la carne de conejo refleja distintos valores de pH según autores. Rodríguez-Calleja *et al.* ([2005](#)), tras mantener las canales de conejo limpias a 0 °C, midieron un pH de  $6,26 \pm 0,20$ . Este valor es inferior al de nuestro estudio y al de Koziol *et al.* ([2015](#)), en el que se obtuvieron valores de pH de  $5,90 \pm 0,14$  en canales de conejo mantenidas a 4 °C 24 horas después del sacrificio.

Las muestras tratadas con fosfato trisódico mostraron el mayor pH, ya que este compuesto es alcalino. Esta alcalinidad puede explicar la mayor efectividad para mantener las poblaciones microbianas en niveles bajos a lo largo de los días.

Las muestras tratadas con ácido láctico presentaron, durante todos los días, el menor pH. La acidez de estas muestras podría explicar que los niveles bacterianos sean más bajos que en las muestras tratadas con el resto de tratamientos el mismo día de la aplicación ([Moreno García, 2006](#)). Estos niveles de pH tan bajos pueden explicar que apareciesen en la superficie de la carne zonas blanquecinas y, en algunos casos, zonas negruzcas. En la carne tratada con ácido ascórbico también se observaron valores bajos de

pH respecto del control, pero ligeramente más altos que en las muestras tratadas con ácido láctico.

Nakyinsige *et al.* ([2015](#)) midieron el pH de carne de conejo almacenada a 4 °C. Los resultados fueron  $6,53 \pm 0,04$ , el día 0, y  $6,03 \pm 0,06$ , el día 7. Aunque el día 0 el valor es el mismo de nuestra muestra control; el día 7, en nuestro caso el pH asciende, mientras que en el estudio de Nakyinsige *et al.* se reduce. La diferencia de pH entre ambos casos podría explicar que los recuentos de nuestro estudio sean más bajos.

Otros autores también estudiaron los efectos del fosfato trisódico a distintas concentraciones sobre carne de pollo. A una concentración del 10%, los resultados de pH fueron superiores a los resultados aquí expuestos ([Rahman et al., 2016](#)), a una concentración del 12%, nuestros valores fueron similares a los del estudio de Alonso-Hernando *et al.* ([2015](#)) e inferiores, en otro de los mismos autores ([2012a](#)). En otros estudios ([Del Río et al., 2007a](#), [2007b](#)) se observa que el pH de las muestras de pollo tratadas con fosfato trisódico al 12% va disminuyendo con el tiempo y en las muestras no tratadas aumentando, al igual que en este estudio. También se ha probado el tratamientos con ácido ascórbico al 2% sobre la superficie de carne de pollo ([Rahman et al., 2016](#)), dando como resultado valores de pH mayores a los nuestros.

### **Análisis sensorial**

En relación al color, las muestras no tratadas tuvieron más aceptación, ya que los tratamientos modificaron el color de la superficie de la carne. Aun así, el color empeoró más rápido en las muestras no tratadas, ya que las muestras tratadas mantuvieron los niveles microbianos más bajos lo que redujo la degradación de la carne. En cuanto al olor y la aceptabilidad general, también se observaron las puntuaciones más altas al comienzo del estudio en las muestras sin tratar y las menores, al finalizar.

Las muestras tratadas con ácido láctico mostraron las peores puntuaciones en los tres parámetros sensoriales (color, olor, aceptabilidad general) tanto al principio como al final de la investigación. Esto puede explicarse a que la carne tratada con esta solución presentó zonas pálidas y zonas negras.

No se encontraron referencias de estudios sobre tratamientos descontaminantes en carne de conejo. El análisis sensorial de carne de pollo tratada con fosfato trisódico al 12% ([Del Río et al., 2007b](#)) refleja valores similares a los de nuestro estudio el día 0, pero un poco superiores el día 5. A pesar de que, según el estudio de Capita *et al.* ([2000](#)), el fosfato trisódico al 12% afecta de forma adversa a las cualidades sensoriales, siendo preferible utilizar concentraciones inferiores sobre carne de pollo.

### **Análisis de color**

En el análisis sensorial del color, las muestras tratadas con fosfato trisódico obtuvieron puntuaciones similares a las de las muestras sin tratar el día de la aplicación. Puede deberse a que el color deseable en carne de conejo es un rojo muy pálido, y eso es lo que reflejaron los parámetros de color medidos para este tratamiento con altos valores de luminosidad y más bajos de  $a^*$  y  $b^*$ .

Sobre el color de la carne de conejo no existe demasiada literatura con la que comparar los datos. En un estudio de canales de conejo mantenidas a 4 °C durante 24 horas después del sacrificio ([Kozioł et al., 2015](#)), los datos obtenidos de  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ , saturación y matiz fueron respectivamente  $55,43 \pm 1,20$ ,  $5,16 \pm 1,00$ ,  $3,48 \pm 0,85$ ,  $6,36 \pm 1,18$  y  $33,23 \pm 6,30$ . En todos los casos, son valores inferiores a los obtenidos en nuestro estudio, como sucede con los resultado de Lan *et al.* ([2016](#)) excepto en el valor  $b^*$  el día del sacrificio. En este estudio de canales de conejo mantenidas a 4 °C desde el sacrificio, los datos obtenidos de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  el día del sacrificio fueron respectivamente  $64,07 \pm 1,07$ ,  $2,37 \pm 0,51$  y  $10,53 \pm 0,83$ . Mientras que los datos obtenidos de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  el día 6 después del sacrificio fueron  $59,48 \pm 3,16$ ,  $0,15 \pm 0,33$  y  $10,50 \pm 0,88$ , respectivamente. Así, se observa una reducción de la luminosidad y del parámetro  $a^*$  mientras que el parámetro  $b^*$  se mantiene constante. En nuestro estudio, la luminosidad y el valor  $a^*$  se mantienen constantes entre el día del tratamiento y el día 5, mientras que el parámetro  $b^*$  aumenta entre esos días.

Aunque la carne tratada con ácido láctico obtuvo mayores valores de luminosidad y de rojez ( $a^*$ ), al presentar zonas anómalas similares a carne cocida, no obtuvo tanta puntuación en el análisis sensorial. La carne tratada con fosfato trisódico es la que obtuvo la segunda mejor puntuación en relación al color, después del control, junto con el menor

valor de la luminosidad y del parámetro  $b^*$ . En carne de pollo también se ha observado que el fosfato trisódico oscurece su superficie, reduce el parámetro  $a^*$  y, al contrario que en los resultados obtenidos en la carne de conejo, aumenta el  $b^*$  ([Singh et al., 2017](#)).

La saturación del color ( $c^*$ ) y el matiz ( $h^*$ ) fueron menores en las paletillas tratadas con fosfato trisódico el día del tratamiento, pero el último día del análisis el matiz no presentó diferencias ( $P>0,05$ ) entre las muestras tratadas y no tratadas.

Los tratamientos estudiados redujeron significativamente los niveles y presencia de microorganismos patógenos y mantuvieron bajos los niveles de la flora o microbiota aeróbica viable durante el almacenamiento en refrigeración. El ácido láctico al 2% afectó negativamente al color de la superficie de la carne de conejo, provocando manchas claras. El tratamiento de las muestras con fosfato trisódico no modificó las características de la carne una vez aplicado. La calidad sensorial de las muestras tratadas con fosfato trisódico al 8% y con ácido ascórbico al 2% mejoró a medida que transcurrían los días de almacenamiento en refrigeración. La superficie de la carne tratada mostró cambios de color. Esta variación no fue necesariamente negativa, ya que las puntuaciones del análisis sensorial en la carne de conejo después del almacenamiento en refrigeración fueron más altas en las muestras tratadas en comparación con las no tratadas. A pesar de la eficacia desinfectante y bacteriostática del uso de tratamientos de descontaminación en la superficie de la carne fresca de conejo, estos nunca deben sustituir las buenas prácticas de higiene.



## **CAPÍTULO III**

---

DIVERSIDAD, RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y  
CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE  
ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE PREPARADOS  
CÁRNICOS DE VACUNO, CERDO, POLLO Y PAVO



## **CAPÍTULO III. DIVERSIDAD, RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE ENTEROBACTERIAS AISLADAS DE PREPARADOS CÁRNICOS DE VACUNO, CERDO, POLLO Y PAVO**

Este trabajo tiene como objetivo conocer los patrones de resistencia a antibióticos y la capacidad de formación de biofilms de especies de enterobacterias aisladas de preparados de carne roja y aves de corral. Se analizaron un total de 44 muestras de preparados de carne de vacuno, cerdo y ave. Los recuentos medios ( $\log_{10}$  ufc/g) de enterobacterias fueron  $1,99 \pm 0,99$  (preparados de carne de vacuno),  $1,96 \pm 1,44$  (cerdo),  $2,09 \pm 0,92$  (pollo) y  $2,17 \pm 1,06$  (pavo) ( $P > 0,05$ ). Se identificaron 200 cepas de enterobacterias y se distinguieron 13 géneros (21 especies), incluidas especies que producen infecciones. Los géneros más comunes fueron *Escherichia* (32,5% de las cepas), *Serratia* (17,0%), *Hafnia* (12,5%) y *Salmonella* (12,0%). Se analizó la susceptibilidad a 15 antibióticos de las cepas aisladas mediante la técnica de difusión en disco. Un total de 126 cepas (63% de las cepas) fueron multirresistentes (con resistencia a dos o más antibióticos), 46 (23%) fueron resistentes a un antibiótico y 28 (14%) fueron sensibles a todos los antibióticos. El número medio de resistencias por cepa fue de  $2,53 \pm 2,05$ . Se observó un mayor número promedio de resistencias ( $P < 0,05$ ) en las cepas aisladas de pavo ( $3,14 \pm 2,55$ ) que en las cepas aisladas de vacuno ( $2,15 \pm 1,22$ ), cerdo ( $2,16 \pm 1,39$ ) o pollo ( $2,44 \pm 2,22$ ). Al menos el 50% de las cepas mostraron resistencia o susceptibilidad reducida a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima o estreptomina, considerados agentes antimicrobianos de importancia crítica en medicina humana. Setenta y nueve cepas (39,5%), 60 cepas (30,0%) y 46 cepas (23,0%) fueron productoras de biofilms débiles, moderadas y fuertes (ensayo de cristal violeta), respectivamente. Esta investigación evidencia que las bacterias presentes en los preparados de carne y aves de corral representan un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

### **INTRODUCCIÓN**

El consumo mundial per cápita de los tres tipos de carne más consumidos en 2017 fue de 15,7, 15,2 y 9,0 kg por persona y año, para carne de cerdo, de ave y de vacuno, respectivamente ([FAOSTAT](#)). Un determinado porcentaje de carne se consume en forma de preparados cárnicos. El Reglamento (CE) nº 853/2004 define los preparados de carne

como la carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que se ha sometido a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca.

El extenso consumo de carnes rojas y de aves de corral genera preocupaciones sobre los productos comercializados, puesto que estos deben ser seguros, tener una baja tasa de deterioro y mostrar una composición, envasado, color, sabor y apariencia adecuados. En dicho escenario, los productos excesivamente contaminados con microorganismos son indeseables ([Del Río et al., 2007b](#)). La evaluación de las enterobacterias de la carne es conveniente, puesto que estas actúan como indicadores de su calidad microbiológica y del nivel de higiene en los procesos de producción y manipulación, además, esta evaluación ayuda a predecir la vida útil potencial de los productos ([Alonso-Calleja et al., 2004](#); [Álvarez-Astorga et al., 2002](#)). La familia Enterobacteriaceae también incluye varias especies que causan infecciones, tanto en la comunidad como en entornos nosocomiales ([Rouger et al., 2017](#)).

Existe una preocupación cada vez mayor sobre la resistencia bacteriana a los medicamentos, tanto a nivel nacional como internacional. La resistencia a los antimicrobianos se ha definido como una pandemia mundial, una de las principales amenazas para la salud pública mundial y, en consecuencia, uno de los principales desafíos sanitarios del siglo XXI ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)). La resistencia a los antibióticos es una tendencia creciente, y se estima que, dentro de tres décadas, las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos serán la principal causa de mortalidad mundial con diez millones de muertes cada año en todo el mundo. Estas cifras deben contrastarse con las 700.000 muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos en 2014 ([O'Neill, 2016](#)). Las consecuencias económicas de la resistencia a los antibióticos también tienen un valor considerable, ya que se estima que estas infecciones cuestan 1,1 mil millones de euros cada año a los sistemas sanitarios de los países de la Unión Europea y del Espacio Económico Europeo ([Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico \[OECD\], 2019](#)).

La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los alimentos es un riesgo directo para los consumidores debido al potencial de estos microorganismos para causar infecciones transmitidas por los alimentos difíciles de tratar. También existe un riesgo indirecto de transferencia horizontal de genes de resistencia a microorganismos patógenos, incluso entre géneros no relacionados, en varios puntos de la cadena alimentaria ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)). Una especie de enterobacteria, *Escherichia coli*, actúa como reservorio de genes de resistencia, lo que es un hecho preocupante desde el punto de vista de la salud pública, ya que existe una alta probabilidad de transferencia de genes a otras bacterias patógenas. Además, esta circunstancia permite que este grupo bacteriano sea utilizado como centinela de la resistencia a los antibióticos ([Comité Científico sobre Riesgos para la Salud Emergentes y Recién Identificados \[SCENIHR\], 2009](#)). El seguimiento de la resistencia a los antibióticos es esencial no solo para obtener información sobre la magnitud de este problema y las tendencias dentro del mismo, sino también para planificar y supervisar la efectividad de las medidas de control introducidas.

Los biofilms son el modo predominante de crecimiento microbiano en la naturaleza ([Díez-García et al., 2012](#)). Estas estructuras se definen como comunidades complejas de microorganismos integrados en una matriz polimérica extracelular sintetizada por los propios microorganismos, con la capacidad de adherirse a superficies bióticas o abióticas diferentes ([González-Machado et al., 2018](#); [Rodríguez-Campos et al., 2019](#)). En lo que respecta a la industria alimentaria, una vez establecidos los biofilms, las bacterias residentes muestran una mayor resistencia a diferentes estreses ambientales, lo que fomenta su persistencia durante largos períodos y aumenta el riesgo de contaminación de los alimentos ([Capita et al., 2014](#)). Los biofilms presentes en las superficies de los equipos y las instalaciones de la industria alimentaria se han identificado como la causa de la mayor parte de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos ([Piercey et al., 2016](#)).

Existe información extremadamente limitada sobre las especies, la resistencia a los antibióticos y la producción de biofilms en las enterobacterias de la carne en el noroeste de España. El objetivo del presente trabajo fue conocer los patrones de resistencia a los

antibióticos y la capacidad de formación de biofilms de especies de enterobacterias aisladas de preparados a base de carne roja y aves de corral.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Muestras**

Se adquirieron un total de 44 muestras crudas de preparados cárnicos con un peso aproximado de 250 g cada una en diferentes supermercados de la ciudad de León, en el noroeste de España. Los preparados de carne de vacuno incluyeron hamburguesas (10 muestras); los preparados de cerdo incluyeron albóndigas (2), carne picada (6), hamburguesas (2) y longaniza (4); los preparados de pollo incluyeron hamburguesas (4), nuggets (2) y longaniza (2), y los preparados de pavo incluyeron albóndigas (4) y hamburguesas (8). Cada muestra se colocó en una bolsa de plástico estéril separada, se transportó al laboratorio inmediatamente en una nevera portátil y se analizó a su llegada o se almacenó a  $3 \pm 1$  °C durante menos de 4 horas antes de comenzar los análisis.

### **Análisis microbiológico**

Las muestras, cada una con un peso de 10 g, se colocaron en una bolsa stomacher estéril con 90 ml de agua de peptona estéril al 0,1% (p/vol) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y se homogeneizaron (Masticator Silver Panoramic; 9000520; Barcelona, España) durante 2 minutos. Las muestras de 10 g se tomaron de dos o más piezas de carne del mismo lote. Se prepararon diluciones decimales en serie en el mismo diluyente a partir del homogeneizado. De estas diluciones se sembró 1 mL en profundidad en medio VRBGA (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) por duplicado con sobrecapa y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para realizar el recuento de enterobacterias. Se contaron las placas con colonias típicas y se calcularon los recuentos medios. Los recuentos microbianos se transformaron a  $\log_{10}$  ufc/g.

### **Identificación de las especies de enterobacterias**

Se seleccionaron de 3 a 8 colonias en VRBGA de las placas de cada muestra, se transfirieron individualmente a agar soja tripton (TSA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para obtener cultivos puros, que se examinaron para determinar la morfología de las colonias y las células,

tinción de Gram y actividades oxidasa y catalasa. Las cepas correspondientes a bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos se identificaron con la ayuda de tiras API 20E (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La interpretación de los datos se realizó utilizando la base de datos Analytical Profile Index (API) (V5.0) con el software de identificación apiweb™ (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia). Las cepas se mantuvieron congeladas a -50 °C después de resuspenderlas en caldo de triptona soja (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) con glicerol al 20% (vol/vol).

### **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

Se analizaron un total de 200 cepas en agar Mueller-Hinton (MHA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) para determinar la susceptibilidad a un panel de 15 antibióticos, utilizando el método de difusión en disco como se describe en las directrices del Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio de EE.UU. ([CLSI, 2019](#)). Los discos (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) utilizados para estudiar la resistencia de las enterobacterias fueron los siguientes: amoxicilina-ácido clavulánico (AMC, 30 µg), ampicilina (AMP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), cefotaxima (CTX, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), cloranfenicol (C, 30 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), amikacina (AK, 30 µg), gentamicina (CN, 10 µg), estreptomina (S, 10 µg), imipenem (IPM, 10 µg), ácido nalixídico (NA, 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT, 25 µg) y tetraciclina (TE, 30 µg). Después de la incubación a 37 °C durante 18 a 24 horas, se midieron los halos de inhibición y se calificaron como susceptibles, intermedios (susceptibilidad reducida) o resistentes. Se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como cepas de referencia para el control de los discos con antibiótico.

### **Determinación de la capacidad de formación de biofilms**

Se siguió un procedimiento descrito anteriormente ([Díez-García et al., 2012](#)) para cuantificar los biofilms. Las cepas (200) cultivadas en TSA se transfirieron a TSB y se incubaron a 37 °C durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, los tubos mantuvieron una concentración de aproximadamente 10<sup>9</sup> ufc/mL. Se realizaron 4 diluciones decimales en TSB para alcanzar concentraciones de 10<sup>5</sup> ufc/ml, que luego se utilizaron para inocular los

pocillos de las placas de microtítulo de poliestireno (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 225  $\mu\text{L}$  de TSB y 25  $\mu\text{L}$  de cultivo bacteriano, de modo que la concentración final en el pocillo fue de  $10^4$  ufc/mL. Se incluyeron controles negativos con 250  $\mu\text{L}$  de TSB. Después de incubar la placa a 37 °C durante 24 horas, se vertió el contenido de la placa y se lavaron los pocillos con 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada esterilizada. Las bacterias que permanecieron adheridas se fijaron agregando 250  $\mu\text{l}$  de metanol a cada pocillo durante 15 minutos. A continuación, se vaciaron las placas, se secaron al aire y se tiñeron durante 5 minutos con 250  $\mu\text{l}$  por pocillo de una solución acuosa de cristal violeta al 0,5%. Los pocillos se vaciaron y lavaron colocando la placa bajo el grifo con agua corriente. Posteriormente, las placas se secaron al aire y el colorante unido a las células adherentes se resolubilizó con 250  $\mu\text{l}$  de ácido acético al 33% (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EE.UU.) por pocillo, dejándolo actuar durante un minuto. La densidad óptica a 580 nm ( $\text{OD}_{580}$ ) se determinó en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Las placas de microtítulo se agitaron durante 1 minuto antes de medir la turbidez. En cada análisis se incluyeron cepas de control fuertes y débiles productoras de biofilm de la colección de cultivos de la Universidad de León, España.

Las cepas se clasificaron en función de su capacidad para formar biofilms. La  $\text{DO}_{580}$  de corte ( $\text{DOc}$ ) se definió como 3 desviaciones estándar por encima de la  $\text{DO}_{580}$  media de los controles negativos. La densidad óptica de cada pocillo se comparó con el valor  $\text{DOc}$  para clasificar cada cepa en una de estas categorías ([Díez-García et al., 2012](#)):

- No productoras de biofilm: cuando  $\text{DO}_{580} \leq \text{DOc}$ .
- Débiles productoras de biofilm: cuando  $\text{DOc} < \text{DO}_{580} \leq (2\text{DOc})$ .
- Moderadas productoras de biofilm: cuando  $(2\text{DOc}) < \text{DO}_{580} \leq (4\text{DOc})$ .
- Fuertes productoras de biofilm: cuando  $(4\text{DOc}) < \text{DO}_{580}$ .

### **Análisis estadístico**

Los recuentos microbianos ( $\log_{10}$  ufc/g) y las diferencias en el grado de formación de biofilms se examinaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan para separar promedios. La prevalencia de las resistencias en diferentes especies de enterobacterias se comparó mediante la prueba

exacta de Fisher. La significancia se determinó al nivel del 95% ( $P < 0,05$ ). Todas las pruebas se realizaron con el paquete Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis microbiológico e identificación de enterobacterias

Todas las muestras de preparados cárnicos presentaron enterobacterias. El recuento promedio de enterobacterias fue de  $2,04 \pm 1,12 \log_{10}$  ufc/g. No se observaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ) entre los preparados cárnicos de vacuno ( $1,99 \pm 0,99 \log_{10}$  ufc/g), cerdo ( $1,96 \pm 1,44$ ), pollo ( $2,09 \pm 0,92$ ) y pavo ( $2,17 \pm 1,06$ ).

La mayoría de las enterobacterias que se encuentran en la carne proceden de la contaminación con heces debido a la ruptura del intestino o al uso de agua contaminada durante el sacrificio y la evisceración. Por lo tanto, su presencia en grandes cantidades puede indicar una higiene deficiente en el matadero en el que se obtiene la carne, una manipulación poco higiénica, un almacenamiento inadecuado o una combinación de estos factores ([Andritsos et al., 2012](#); [Scheutz et al., 2012](#); [Wong et al., 2004](#)). Cabe señalar que los recuentos para enterobacterias cumplieron con los criterios microbiológicos, que establecen que no deben exceder 2 (máximo 4)  $\log_{10}$  ufc/g ([Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos \[ICMSF\], 2011](#); [Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1997](#)) o 3,5 (máximo 4,5)  $\log_{10}$  ufc/g ([Uyttendaele et al., 2010](#)). Previamente se han encontrado recuentos de enterobacterias similares a los del presente estudio en la carne ([Cordero et al., 2019](#); [González-Gutiérrez et al., 2020](#); [Luning et al., 2011](#)).

Se aislaron 200 enterobacterias de preparados cárnicos de vacuno (47), cerdo (32), pollo (64) y pavo (57). Se detectaron un total de 24 cepas de *S. enterica* (12,0% de las 200 cepas aisladas) (tabla 31). La prevalencia de *S. enterica* fue de 8,5%, 31,3%, 7,8% y 8,8% para carne de vacuno, cerdo, pollo y pavo, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango de los datos obtenidos en otros trabajos de investigación para carnes rojas y aves, donde se han comunicado valores de 3,6% ([Doménech et al., 2015b](#)), 9,0% ([Doménech et al., 2015a](#)), 12,4% ([Álvarez-Fernández et al., 2012](#)), 18,1% ([Zwe et al., 2018](#)) y 34,0% ([Yildirim et al., 2011](#)). Cabe señalar, sin embargo, que no se utilizaron pasos de

enriquecimiento para el aislamiento de *Salmonella* en el presente estudio, lo que podría haber influido en los resultados obtenidos.

Cincuenta y cinco cepas de las 200 aisladas (27,5%) se identificaron como *E. coli*. Esta bacteria ha sido aislada en un alto porcentaje de carne cruda y productos no procesados listos para el consumo en varios estudios ([Capita et al., 2013](#); [Gwida et al., 2014](#)). El resto de las cepas pertenecían a la especie *Escherichia vulneris* (10 cepas; 5,0%), y a los géneros *Serratia* (34; 17,0%), *Hafnia* (25; 12,5%), *Enterobacter* (19; 9,5%), *Klebsiella* (14; 7,0%), *Pantoea* (5; 2,5%), *Yersinia* (4; 2,0%), *Proteus* (3; 1,5%), *Citrobacter* (2; 1,0%), *Kluyvera* (2; 1,0%), *Providencia* (2; 1,0%) y *Cedecea* (1; 0,5%) (tabla 31). Estos géneros han sido detectados previamente en la carne ([Gwida et al., 2014](#); [Stiles y Ng, 1981](#)). El número de especies bacterianas aisladas diferentes en cada tipo de preparado cárnico osciló entre 8 (pavo) y 13 (cerdo y pollo). Las especies más frecuentes en cada tipo de preparado cárnico fueron *E. coli* (pollo y pavo), *Hafnia alvei* (vacuno y cerdo), *S. enterica* (cerdo) y *Serratia liquefaciens* (vacuno y pavo). En particular, la mayoría de las especies detectadas en preparados de carne roja y aves de corral han estado implicadas en enfermedades humanas, por ejemplo, *S. enterica*, *E. coli*, *H. alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Kluyvera* spp. y *S. liquefaciens* ([Farmer III et al., 2007](#)). Cabe señalar que estos resultados deben considerarse con cautela, porque los métodos fenotípicos pueden dar lugar a identificaciones erróneas en algunos casos ([Osman et al., 2020](#)).

Tabla 31. Identificación y origen (especie animal) de 200 cepas de enterobacterias aisladas de preparados cárnicos de carne roja y aves de corral

Especie de enterobacteria	Origen (Número de cepas)				Número medio de resistencias a antibióticos	
	Vacuno (47)	Cerdo (32)	Pollo (64)	Pavo (57)		
<i>Cedecea lapegei</i>			1		2,00 ± 0,00	
<i>Citrobacter</i> spp.	<i>C. braakii</i>	1			2,00 ± 0,00	
	<i>C. freundii</i>	1			1,00 ± 0,00	
<i>Enterobacter</i> spp.	<i>E. aerogenes</i>	1			2,00 ± 0,00	
	<i>E. amnigenus</i>	1	3		4,75 ± 0,50	
	<i>E. asburiae</i>	4	1		4	1,11 ± 1,36
	<i>E. cloacae</i>	1	4		4	1,60 ± 0,55
<i>Escherichia</i> spp.	<i>E. coli</i>	1	25	29	3,95 ± 2,46	
	<i>E. vulneris</i>	5		5		1,10 ± 0,32
<i>Hafnia alvei</i>	10	8	3	4	2,84 ± 1,07	

<b><i>Klebsiella</i> spp.</b>	<i>K. oxytoca</i>	4		5		2,11 ± 1,05
	<i>K. pneumoniae</i>	1	2		2	2,00 ± 1,87
<b><i>Kluyvera</i> spp.</b>		1		1		3,00 ± 1,41
<b><i>Pantoea</i> spp.</b>		1		2	2	1,20 ± 1,64
<b><i>Proteus vulgaris</i></b>		3				1,67 ± 0,58
<b><i>Providencia alcalifaciens</i></b>		1		1		1,00 ± 1,41
<b><i>Salmonella enterica</i></b>		4	10	5	5	2,17 ± 1,66
<b><i>Serratia</i> spp.</b>	<i>S. liquefaciens</i>	13	3	6	10	1,59 ± 1,64
	<i>S. marcescens</i>		1			2,00 ± 0,00
	<i>S. plymuthica</i>		1			0,00 ± 0,00
<b><i>Yersinia</i> spp.</b>				3	1	2,25 ± 3,86

### Susceptibilidad antimicrobiana

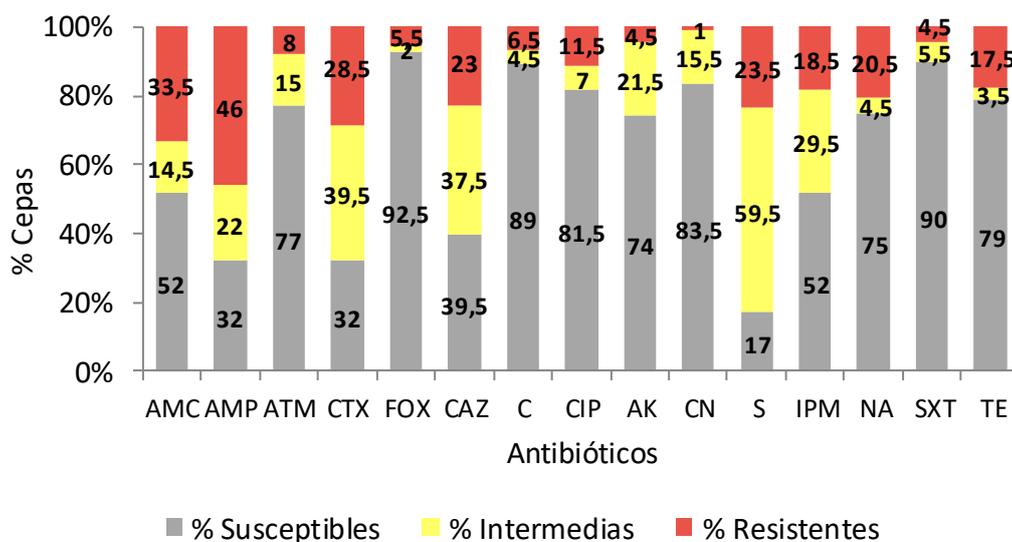
Se analizaron 200 aislados de enterobacterias de preparados cárnicos de carne roja y aves de corral para determinar su susceptibilidad a 15 antibióticos. La tabla 32 muestra el número y porcentaje de cepas que fueron multirresistentes (presentaron resistencia a dos o más antibióticos; M), resistentes a un antibiótico (R) y sensibles a todos los antibióticos (S). Un total de 126 (63%), 46 (23%) y 28 (14%) cepas se clasificaron como M, R o S, respectivamente. Las cepas multirresistentes fueron resistentes a 2 (43 cepas), 3 (28), 4 (25), 5 (12), 6 (6), 7 (5), 8 (5) o 9 (2) antibióticos. Es preocupante la considerable prevalencia de cepas resistentes y multirresistentes observadas en este trabajo, puesto que las resistencias detectadas probablemente reducirían la utilidad como opción terapéutica de varios antibióticos utilizados tanto en medicina humana como veterinaria. Las infecciones causadas por bacterias multirresistentes no solo se asocian con altas tasas de morbilidad y mortalidad, sino también con un aumento de los costes del tratamiento ([Capita et al., 2019](#); [Cosgrove, 2006](#)).

**Tabla 32.** Número y porcentaje de cepas de enterobacterias multirresistentes (M), resistentes (R) y sensibles (S) aisladas de preparados cárnicos de carne roja y de ave

Origen	M		R		S	
	nº	%	nº	%	nº	%
<b>Vacuno (n = 47)</b>	33	70%	10	21%	4	9%
<b>Cerdo (n = 32)</b>	21	66%	6	19%	5	16%
<b>Pollo (n = 64)</b>	35	55%	18	28%	11	17%
<b>Pavo (n = 57)</b>	37	65%	12	21%	8	14%
<b>Total (n = 200)</b>	126	63%	46	23%	28	14%

El número medio de resistencias por cepa fue de  $2,53 \pm 2,05$ . Se observó un mayor ( $P < 0,05$ ) número promedio de resistencias en las cepas de pavo ( $3,14 \pm 2,55$ ) que en las cepas de vacuno ( $2,15 \pm 1,22$ ), cerdo ( $2,16 \pm 1,39$ ) o pollo ( $2,44 \pm 2,22$ ). Estos valores medios se encuentran dentro del rango de los registrados previamente para bacterias Gram negativas en carne, con resistencias antimicrobianas de 0,57 ([Cordero et al., 2019](#)), 0,78 ([Capita et al., 2019](#)), 3,76 ([Capita et al., 2013](#)) y 4,0 ([Logue et al., 2003](#)) encontradas para aislados de enterobacterias de la carne. Cabe señalar que *Enterobacter amnigenus* ( $4,75 \pm 0,50$ ) y *E. coli* ( $3,95 \pm 2,46$ ) mostraron el mayor número medio de resistencias a los antibióticos. Este hecho es motivo de preocupación porque ambas especies bacterianas son patógenos humanos frecuentes ([Capita et al., 2019](#); [Raphael y Riley, 2017](#)). Por el contrario, *Serratia plymuthica* ( $0,00 \pm 0,00$ ), *Citrobacter freundii* ( $1,00 \pm 0,00$ ) y *Providencia alcalifaciens* ( $1,00 \pm 1,41$ ) tuvieron el menor número de resistencias a los antibióticos (tabla 31).

La figura 19 muestra el porcentaje de cepas que fueron susceptibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados. Se observaron resistencias en cepas aisladas de enterobacterias a amoxicilina-ácido clavulánico (AMC) (33,5% de las cepas), ampicilina (AMP) (46,0%), aztreonam (ATM) (8,0%), cefotaxima (CTX) (28,5%), ceftazidima (CAZ) (23,0%), cloranfenicol (C) (6,5%), ciprofloxacina (CIP) (11,5%), amikacina (AK) (4,5), gentamicina (CN) (1,0%), estreptomycin (S) (23,5%), imipenem (IPM) (18,5%), ácido nalidíxico (NA) (20,5%), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) (4,5%) y tetraciclina (TE) (17,5%). Se observó resistencia o susceptibilidad reducida frente a AMC (48,0% de las cepas), AMP (68,0%), ATM (23,0%), CTX (68,0%), FOX (7,5%), CAZ (60,5%), C (11,0%), CIP (18,5%), AK (26,0%), CN (16,5%), S (83,0%), IPM (48,0%), NA (25,0%), SXT (10,0%) y TE (21,0%). En estudios previos también se han observado niveles elevados de resistencia a estos antibióticos en enterobacterias aisladas de carnes rojas y aves de corral ([Alonso-Hernando et al., 2012b](#); [Álvarez-Fernández et al., 2013](#); [Buzón-Durán et al., 2017](#); [Capita et al., 2019](#); [Guerra et al., 2003](#); [Guerrero-Ramos et al., 2016a, 2016b](#)).



**Figura 19.** Porcentaje de cepas de enterobacterias susceptibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados. Amoxicilina-ácido clavulánico (AMC), ampicilina (AMP), aztreonam (ATM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cloranfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), amikacina (AK), gentamicina (CN), estreptomina (S), imipenem (IPM), ácido nalixídico (NA), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT) y tetraciclina (TE).

El gran número de cepas resistentes en alimentos de origen animal observado en diferentes trabajos de investigación parece estar relacionado con el uso de antibióticos en la producción animal y la práctica clínica ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)). En el presente estudio, se observó una alta prevalencia de resistencia a antibióticos utilizados ampliamente en la producción animal ([Cameron y McAllister, 2016](#); [De Briyne et al., 2014](#); [Roth et al., 2019](#)). Sin embargo, cabe destacar que también se observó una alta prevalencia de resistencia a sustancias cuyo uso ha estado prohibido en animales productores de alimentos durante algunas décadas, por ejemplo, el cloranfenicol. Los mecanismos de resistencia cruzada y co-resistencia pueden haber contribuido a la persistencia a lo largo del tiempo de genes de resistencia a estas sustancias, como se ha sugerido anteriormente ([Álvarez-Fernández et al., 2013](#); [Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)).

Cabe señalar que al menos el 50% de las cepas mostraron resistencia o susceptibilidad reducida a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima o estreptomina. Estos cuatro compuestos se consideran agentes antimicrobianos "de importancia crítica" en la medicina humana, según la Organización Mundial de la Salud ([2019](#)). La Organización

Mundial de Sanidad Animal (2018) enumera la ampicilina y la estreptomina como “agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica”.

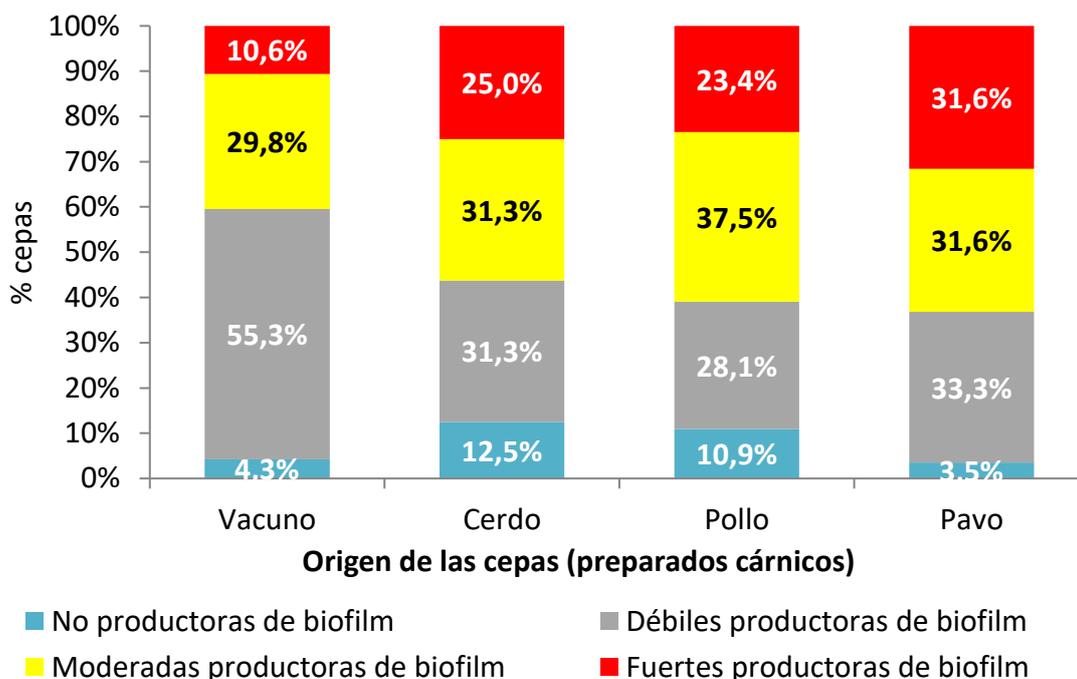
Se observaron 88 patrones de resistencia a los antibióticos entre las 200 cepas de enterobacterias. Los ocho patrones más frecuentes fueron: AMC/AMP (mostrado por 12 cepas; 6,0%), AMP (10 cepas; 5,0%), CTX/IMP (9 cepas; 4,5%), AMC/AMP/CAZ (7 cepas; 3,5%), NA (7 cepas; 3,5%), IPM (6 cepas; 3,0%), AMC (5 cepas; 2,5%) y CTX (5 cepas; 2,5%).

### Capacidad de formación de biofilms

La producción de biofilms facilita la persistencia bacteriana en las instalaciones de procesamiento de alimentos, proporcionando un entorno favorable para el intercambio de genes de resistencia a los antibióticos. Un total de 185 (92,5%) de las cepas examinadas fueron capaces de formar biofilm sobre poliestireno, de las cuales 79 (39,5%) cepas fueron débiles, 60 (30,0%) cepas fueron moderadas y 46 (23,0%) cepas fueron fuertes formadoras de biofilm. El valor medio de  $DO_{580}$  (ensayo de cristal violeta) para las 200 cepas de enterobacterias fue  $0,524 \pm 0,581$ . La  $DO_{580}$  observada en la presente investigación para las cepas no productoras de biofilm fue  $0,112 \pm 0,004$ . Los datos de las cepas débiles, moderadas y fuertes productoras de biofilm fueron  $0,209 \pm 0,071$ ,  $0,343 \pm 0,041$  y  $0,767 \pm 0,118$ , respectivamente ( $P < 0,05$ ). La capacidad de las enterobacterias para producir biofilms sobre poliestireno se ha demostrado previamente (Cosgrove, 2006; Díez-García *et al.*, 2012). Estos hallazgos son motivo de preocupación porque los materiales plásticos se utilizan con frecuencia para fabricar una variedad de superficies en las instalaciones de procesamiento de alimentos, como tuberías, tablas de cortar y otros equipos (Cosgrove, 2006; Díez-García *et al.*, 2012).

Se observó un número promedio de resistencias menor ( $P < 0,05$ ) para las cepas no productoras de biofilm ( $1,80 \pm 1,61$ ) que para las cepas fuertes productoras de biofilm ( $2,91 \pm 2,41$ ). Las productoras de biofilm débiles y moderados fueron resistentes a  $2,53 \pm 1,97$  y  $2,40 \pm 1,94$  antibióticos, respectivamente. Otros estudios también reflejan que la resistencia a los antibióticos es mayor entre las cepas productoras de biofilm que entre las que no lo son (Nirwati *et al.*, 2019; Saha *et al.*, 2018). Por el contrario, varios autores no han observado ninguna relación entre la producción de biofilms y la resistencia a antibióticos (Cepas *et al.*, 2019).

La figura 20 muestra el porcentaje de cepas no productoras de biofilm y de las cepas débiles, moderadas y fuertes productoras de biofilm aisladas de preparados cárnicos de vacuno, cerdo, pollo y pavo, respectivamente. No se observaron diferencias ( $P>0,05$ ) en la capacidad de formación de biofilm de las enterobacterias aisladas de preparados cárnicos de diferentes especies animales.



**Figura 20.** Porcentaje de cepas no productoras de biofilm y de cepas débiles, moderadas y fuertes productoras de biofilm aisladas de preparados cárnicos de vacuno, cerdo, pollo y pavo.

La tabla 33 muestra la capacidad de formación de biofilm de cada especie de enterobacterias aisladas de preparados de carne y aves de corral. El porcentaje más alto de cepas no productoras de biofilm se encuentra entre las cepas de *C. freundii* (el 100% de las cepas no eran productoras de biofilm), *E. amnigenus* (25%) y *S. enterica* (21%). Estos resultados no concuerdan con hallazgos anteriores, donde todas las cepas de *S. enterica* fueron capaces de formar biofilm (Capita *et al.*, 2019; Díez-García *et al.*, 2012). Estas discrepancias entre los trabajos de investigación pueden deberse a variaciones entre diferentes cepas de la misma especie, o incluso del mismo serotipo, con respecto a su capacidad para formar biofilm (Díez-García *et al.*, 2012). Si bien el ensayo de cristal violeta es uno de los métodos más utilizados para evaluar la formación de biofilm, debido a que es una herramienta de detección rápida y de alto rendimiento con gran valor para los

microbiólogos, este ensayo es conocido por su desviación sustancial de un experimento a otro, e incluso entre los pocillos. El ensayo de microtitulación de biofilm tiene varias trabas y puede dar lugar a resultados dispersos debido a un crecimiento heterogéneo, procedimientos disruptivos y deficiencias en la cuantificación de la biomasa y las células viables ([Kragh et al., 2018](#), [2019](#)). Lo cual también podría ser responsables de las diferencias observadas entre trabajos de investigación.

**Tabla 33.** Capacidad de formación de biofilm de diversas especies de enterobacterias aisladas de preparados cárnicos de carne roja y de ave

Especie de enterobacteria	nº cepas (%)			
	No productora de biofilm	Débil productora de biofilm	Moderada productora de biofilm	Fuerte productora de biofilm
<i>Cedecea lapegei</i>		1 (100%)		
<i>Citrobacter braakii</i>		1 (100%)		
<i>Citrobacter freundii</i>	1 (100%)			
<i>Enterobacter aerogenes</i>				1 (100%)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1 (25%)			3 (75%)
<i>Enterobacter asburiae</i>		5 (56%)	3 (33%)	1 (11%)
<i>Enterobacter cloacae</i>			2 (40%)	3 (60%)
<i>Escherichia coli</i>	5 (9%)	23 (42%)	14 (25%)	13 (24%)
<i>Escherichia vulneris</i>	1 (10%)	5 (50%)	2 (20%)	2 (20%)
<i>Hafnia alvei</i>		9 (36%)	12 (48%)	4 (16%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>		3 (33%)	4 (44%)	2 (22%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			1 (20%)	4 (80%)
<i>Kluyvera spp.</i>		2 (100%)		
<i>Pantoea spp.</i>		4 (80%)	1 (20%)	
<i>Proteus vulgaris</i>		3 (100%)		
<i>Providencia alcalifaciens</i>		1 (50%)	1 (50%)	
<i>Salmonella enterica</i>	5 (21%)	5 (21%)	12 (50%)	2 (8%)
<i>Serratia liquefaciens</i>	2 (6%)	16 (50%)	5 (16%)	9 (28%)
<i>Serratia marcescens</i>				1 (100%)
<i>Serratia plymuthica</i>				1 (100%)
<i>Yersinia spp.</i>		1 (25%)	3 (75%)	

Los preparados cárnicos de carne roja y aves de corral albergaban enterobacterias de especies patógenas, como *S. enterica*. Esto puede suponer un riesgo de infección humana por el consumo de preparados de carne crudos o poco cocidos y de contaminación cruzada con otros productos alimenticios. Un hecho preocupante que

surge de esta investigación es la considerable prevalencia de resistencias a antibióticos observada entre las cepas de enterobacterias aisladas de preparados de carne roja y aves de corral. No se observaron diferencias significativas entre los niveles o la prevalencia de resistencias a antibióticos en las bacterias aisladas de los diferentes preparados cárnicos. El alto porcentaje de cepas capaces de formar biofilm (92,5%) también es motivo de preocupación. Los resultados de este estudio proporcionan información sobre la prevalencia de la resistencia a antibióticos y la capacidad de formación de biofilm en cepas de enterobacterias aisladas de preparados de carne roja y aves de corral en España.





## **CAPÍTULO IV**

---

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CAPACIDAD DE  
FORMACIÓN DE BIOFILMS DE ENTEROCOCOS  
AISLADOS DE PREPARADOS DE CARNE ROJA Y AVES  
DE CORRAL



## **CAPÍTULO IV. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y CAPACIDAD DE FORMACIÓN DE BIOFILMS DE ENTEROCOCOS AISLADOS DE PREPARADOS DE CARNE ROJA Y AVES DE CORRAL**

Este estudio investigó la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biofilm de 200 cepas de enterococos aisladas de preparados de carne de vacuno (51 cepas), cerdo (47), pollo (50) y pavo (52) adquiridos en el noroeste de España. Se analizó la susceptibilidad frente a quince antibióticos de importancia clínica mediante el método de difusión en disco. El número medio de resistencias por cepa fue  $4,48 \pm 1,59$ . Tomando las cepas resistentes junto con las que mostraron una susceptibilidad reducida, el número total de resistencias por cepa fue de  $6,97 \pm 2,02$ . Dos cepas (1,0%) fueron resistentes a un solo antibiótico, 22 cepas (11,0%) presentaron resistencia a dos, una cepa (0,5%) fue resistente a tres y 175 cepas (87,5%) mostraron resistencia múltiple a tres o más categorías de antibióticos. La prevalencia de la resistencia varió entre 0,5% (gentamicina) y 100,0% (kanamicina). Todas las cepas produjeron biofilms en placas de microtítulo de poliestireno, lo cual se determinó mediante el ensayo de cristal violeta. Las cepas se clasificaron como de capacidad débil (51 cepas; densidad óptica promedio a 580 nanómetros ( $DO_{580}$ ) =  $0,206 \pm 0,033$ ), moderada (78 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $0,374 \pm 0,068$ ) o fuerte (71 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $1,167 \pm 0,621$ ) para producir biofilm ( $P < 0,05$ ). Las cepas aisladas de preparados de carne de vacuno produjeron los biofilms más notables ( $P < 0,05$ ). Los resultados de este estudio indican que los preparados de carne y aves de corral son reservorios de cepas de enterococos resistentes a antibióticos capaces de formar biofilms. La manipulación cuidadosa de estos productos alimenticios durante la preparación, evitando la contaminación cruzada y asegurando una cocción completa, es la mejor manera de prevenir las enfermedades transmitidas por los alimentos.

### **INTRODUCCIÓN**

La producción de carne en el mundo en 2021 alcanzó los 355,5 millones de toneladas, de las cuales 121,6 millones fueron de aves de corral; 120,4 millones fueron porcino, y 66,3 millones de toneladas, de carne de vacuno. En la Unión Europea se produjeron 23,6 millones de toneladas de carne de cerdo, 10,8 millones de toneladas de

pollo y 6,9 millones de toneladas de carne de vacuno. El consumo de los tres tipos de carne más consumidos en la Unión Europea en 2013 fue de 39,0 kg de cerdo, 22,5 kg de aves de corral (principalmente pollo) y 12,2 kg de carne de vacuno por persona y año ([FAOSTAT](#)). Parte de esta carne se consume en forma de preparados cárnicos. De acuerdo con el Reglamento (CE) nº 853/2004, se definen como la carne fresca, incluida la carne que ha sido troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que se ha sometido a transformaciones que no bastan para alterar la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, para eliminar las características de la carne fresca.

En las últimas décadas se observa una preocupación creciente por las bacterias resistentes a los antibióticos, que en la actualidad se consideran uno de los principales problemas de los sistemas sanitarios de todo el mundo ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)). La prevalencia de la resistencia a los antibióticos está aumentando, y se estima que, dentro de treinta años, las muertes anuales serán de diez millones de personas en todo el mundo como resultado de la infección por bacterias resistentes (una cifra mayor que los 8,2 millones de muertes esperadas por cáncer). Esta alta tasa contrasta con las 700.000 muertes atribuibles a la resistencia a los antibióticos en 2014 ([O'Neill, 2016](#)). La resistencia a los antibióticos también tiene importantes consecuencias financieras, ya que se estima que estas infecciones cuestan a los sistemas sanitarios de la Unión Europea y los países del Espacio Económico Europeo 1,1 millones de euros anuales ([OECD, 2019](#)).

La presencia de bacterias resistentes a los antibióticos en los alimentos implica riesgos tanto directos como indirectos para los consumidores. El riesgo directo es la posibilidad de que dichos microorganismos puedan causar infecciones transmitidas por los alimentos difíciles de tratar, como resultado de un cocinado insuficiente o por contaminación cruzada con otros alimentos debido a una manipulación inadecuada. El riesgo indirecto radica en la posibilidad de transferencia horizontal de genes de resistencia a microorganismos patógenos, incluidos géneros no relacionados ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)).

En las últimas décadas, los enterococos han surgido como una causa importante de infecciones nosocomiales y extrahospitalarias debido a la capacidad de estas bacterias

para adquirir rasgos de virulencia ([Guerrero-Ramos et al., 2016b](#)). Además, estas bacterias actúan como reservorio de genes de resistencia a los antibióticos, circunstancia que permite que este grupo microbiano sea utilizado como centinela de resistencias ([SCENIHR, 2009](#)). El control de la resistencia a los antibióticos es fundamental, no solo para obtener información sobre la magnitud del problema y las tendencias dentro del mismo, sino también para planificar y dar seguimiento a la eficacia de las medidas de control introducidas.

En la naturaleza, los microorganismos crecen preferentemente en forma de biofilms, comunidades complejas de microorganismos incrustados en una matriz polimérica extracelular sintetizada por los propios organismos, con la capacidad de adherirse a diferentes superficies bióticas o abióticas ([Díez-García et al., 2012](#); [Rodríguez-Melcón et al., 2019](#)). Las células sésiles que forman parte de un biofilm tienen una resistencia mucho mayor a diferentes factores de estrés, como desinfectantes y antibióticos, en comparación con las células planctónicas o de vida libre. Por lo tanto, los biofilms se han identificado como un factor determinante en la persistencia de patógenos transmitidos por los alimentos en los entornos de procesamiento de alimentos ([Capita et al., 2014](#)). Se ha demostrado que los biofilms son la principal fuente de contaminación de los alimentos y han sido asociados con la mayoría de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos ([Piercey et al., 2016](#)). Además, también provocan graves problemas de ingeniería, como la obstrucción de filtros y tubos, o la disminución de la eficiencia de los intercambiadores de calor, debido a la presencia de biofilms en los equipos y en las instalaciones de las plantas de procesamiento de alimentos ([Díez-García et al., 2012](#)).

Hay muy poca información disponible sobre la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formar biofilms de cepas enterocócicas que se encuentran en la carne. El objetivo de la presente investigación fue conocer los patrones de resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biofilms de los enterococos aislados de preparados de carne y de aves de corral adquiridos en el noroeste de España.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Muestras**

Se adquirieron 44 muestras, cada una con un peso aproximado de 250 g, de preparados cárnicos crudos de carne roja y ave de diversos supermercados de la ciudad de León, en el noroeste de España. Se obtuvieron diez muestras de hamburguesas de preparados de vacuno. Los preparados cárnicos de cerdo incluyeron albóndigas (2 muestras), carne picada (6), hamburguesas (2) y salchichas (4). Las muestras de preparados de pollo comprendieron hamburguesas (4), nuggets (2) y salchichas (2), y los preparados cárnicos de pavo fueron albóndigas (4) y hamburguesas (8). Todas las muestras se colocaron individualmente en bolsas de plástico estériles, se transportaron al laboratorio en una hielera y se analizaron en un lapso máximo de 4 horas desde su adquisición. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta que se realizó el análisis.

### **Análisis microbiológico**

Se tomaron porciones de 10 g de cada muestra y se colocaron en una bolsa stomacher estéril con 90 mL de agua de peptona estéril al 0,1% (p/vol) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y se homogeneizaron (Masticator Silver Panoramic; 9000520; Barcelona, España) durante 2 minutos. Las muestras de 10 g se tomaron de dos o más piezas del mismo lote. A partir de las porciones homogeneizadas, se prepararon diluciones decimales en serie en el mismo diluyente.

Se determinó la carga de microorganismos psicrotrofos mediante siembra en superficie (0,1 mL) sobre agar de recuento en placa (PCA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) por duplicado después de 10 días de incubación a 7 °C. Para realizar el recuento de enterococos se incubaron placas sembradas en profundidad de agar kanamicina esculina azida (KAA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra), preparadas con 1 mL de la dilución apropiada, durante 24 horas a 42 °C.

Se realizó el recuento en las placas con entre 25 y 250 colonias (siembra en superficie) y entre 30 y 300 colonias (siembra en profundidad), se calcularon los recuentos medios y se transformaron a  $\log_{10}$  unidades formadoras de colonias por gramo (ufc/g). De cada muestra, se seleccionaron entre 3 y 7 colonias típicas en KAA. Estas colonias se

transfirieron a agar soja triptona (TSA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) y se incubaron a 42 °C durante 24 horas para obtener cultivos puros. Se analizaron las colonias de cocos Gram positivos, catalasa negativos capaces de crecer a 10 °C y 45 °C y en presencia de cloruro sódico al 6,5% para determinar la susceptibilidad antimicrobiana y la capacidad de formación de biofilms. Las cepas se mantuvieron congeladas a -50 °C después de resuspenderlas en caldo soja triptona (TSB; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) con glicerol al 20% (vol/vol).

### **Prueba de susceptibilidad antimicrobiana**

La susceptibilidad de 200 aislados de enterococos a un panel de 15 antibióticos se determinó mediante el método de difusión en disco ([CLSI, 2019](#)), utilizando discos de antibióticos (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) en agar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra). Se utilizaron las siguientes clases de antibióticos: penicilinas (ampicilina; AMP 10 µg, penicilina G; P 10 µg), anfenicoles (cloranfenicol; C 30 µg), fluoroquinolonas (ciprofloxacina; CIP 5 µg), macrólidos (eritromicina; E 15 µg), derivados del ácido fosfónico (fosfomicina; FOS 50 µg), aminoglucósidos (gentamicina; CN 120 µg, kanamicina; K 120 µg, estreptomina; S 300 µg), derivados de nitrofurano (nitrofurantoína; F 300 µg), estreptograminas (quinupristín-dalfopristín; QD 15 µg), ansamicinas (rifampicina; RD 5 µg), tetraciclinas (tetraciclina; TE 30 µg) y glicopéptidos (teicoplanina; TEC 30 µg, vancomicina; VA 30 µg).

Estos antibióticos se clasifican como de importancia crítica (ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, fosfomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, rifampicina, teicoplanina, vancomicina), muy importantes (penicilina G, cloranfenicol, quinupristín-dalfopristín, tetraciclina) o importantes (nitrofurantoína) para la medicina humana ([OMS, 2019](#)). Además, de acuerdo con la Organización Mundial de Sanidad Animal, estos compuestos se clasifican como agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica (ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, tetraciclina) o de gran importancia veterinaria (fosfomicina, rifampicina) ([OIE, 2018](#)).

Los halos de inhibición se midieron después de la incubación a 37 °C durante 18 a 24 horas, y las cepas aisladas se clasificaron como susceptibles, intermedias

(susceptibilidad reducida) o resistentes. Se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como cepas de referencia para el control de los discos con antibióticos.

### **Determinación de la capacidad de formación de biofilm**

El estudio de la capacidad de formación de biofilm se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente por Díez-García *et al.* (2012). Las 200 cepas estudiadas, sembradas en TSA, se transfirieron a tubos de ensayo con TSB y se incubaron a 37 °C. Después de 18 horas, la concentración bacteriana en los tubos alcanzó aproximadamente  $10^9$  ufc/mL (datos no mostrados). Se realizaron 4 diluciones decimales en TSB para obtener concentraciones de  $10^5$  ufc/mL, las cuales se utilizaron para inocular los pocillos de las placas de microtítulo de poliestireno (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 225  $\mu$ L de TSB y 25  $\mu$ L de cultivo bacteriano, alcanzando una concentración final de  $10^4$  ufc/mL. Se emplearon controles negativos con 250  $\mu$ L de TSB. Después de la incubación a 37 °C durante 24 horas, se vertió el contenido de las placas y se lavaron los pocillos con 300  $\mu$ L de agua destilada esterilizada. Posteriormente, se añadieron 250  $\mu$ L de metanol (Sigma Aldrich, Steinhem, Alemania) a cada pocillo y se dejó actuar durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, las placas se vaciaron, se secaron al aire y se tiñeron mediante la adición de 250  $\mu$ L de una solución acuosa al 0,5% de cristal violeta (Panreac Química SA, Montplet & Esteban SA, Moncada y Reixach, Barcelona, España) a cada pocillo. Después de 5 minutos, los pocillos se vaciaron y se enjuagaron bajo el agua corriente del grifo. A continuación, las placas se secaron al aire una vez más y el colorante unido a las células adheridas se resolubilizó con 250  $\mu$ L en cada pocillo de ácido acético al 33% (Panreac Química SA, Moncada y Reixach, Barcelona, España). Transcurridos 60 segundos de contacto, se determinó la densidad óptica a 580 nm ( $DO_{580}$ ) en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Las placas de microtítulo se agitaron durante 1 minuto antes de medir la turbidez. En cada análisis se incluyeron cepas formadoras de biofilms fuertes y débiles de la colección de cultivos del Departamento de Higiene y Tecnología de Alimentos de la Universidad de León en España.

Para clasificar las cepas en función de su capacidad de formación de biofilm, se calculó la  $DO_{580}$  de corte (DOc), que se fijó en un valor de 3 desviaciones estándar por encima de la  $DO_{580}$  media de los controles negativos. Las cepas se agruparon en estas cuatro categorías ([Díez-García et al., 2012](#)):

- No productoras de biofilm: cuando  $DO_{580} \leq DOc$ .
- Débiles productoras de biofilm: cuando  $DOc < DO_{580} \leq (2 \times DOc)$ .
- Moderadas productoras de biofilm: cuando  $(2 \times DOc) < DO_{580} \leq (4 \times DOc)$ .
- Fuertes productoras de biofilm: cuando  $(4 \times DOc) < DO_{580}$ .

### **Análisis estadístico**

Los recuentos microbianos en  $\log_{10}$  ufc/g y los valores de  $DO_{580}$  del ensayo de cristal violeta se examinaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan para separar los promedios. La prevalencia de resistencia en los diferentes tipos de carne se comparó mediante la prueba exacta de Fisher. La significancia se determinó al nivel del 95% ( $P < 0,05$ ). Todas las pruebas se llevaron a cabo utilizando el paquete Statistica® 8.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, OK, EE.UU.).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Recuentos microbianos**

Los recuentos de psicrotrofos ( $\log_{10}$  ufc/g) fueron  $5,88 \pm 1,09$  en preparados de vacuno,  $5,50 \pm 2,00$  en cerdo,  $5,14 \pm 0,89$  en pollo y  $6,27 \pm 1,17$  en pavo ( $P > 0,05$ ). Estos resultados se encuentran dentro de un amplio rango de valores (entre  $3,68 \pm 1,75$   $\log_{10}$  ufc/g y  $9,57 \pm 0,37$   $\log_{10}$  ufc/g) previamente observados en preparados de carne de aves y mamíferos ([Buzón-Durán et al., 2017](#); [González-Gutiérrez et al., 2020](#)). Las muestras superaron el límite máximo de referencia de 5  $\log_{10}$  ufc/g establecido en España por Pascual-Anderson ([1992](#)) para preparados de aves de corral.

Ninguna de las muestras examinadas presentaba signos de deterioro sensorial, aunque en algunos casos los recuentos de psicrotrofos han superado los 8  $\log_{10}$  ufc/g. Este resultado coincide con hallazgos anteriores ([Buzón-Durán et al., 2017](#)). Por el contrario, otros investigadores ([Dainty y Mackey, 1992](#)) observaron que niveles de este grupo

microbiano entre 6 y 8 log<sub>10</sub> ufc/g son suficientes para afectar el olor y la apariencia de la carne.

Todas las muestras analizadas estaban contaminadas con enterococos. Las cargas de enterococos en los preparados de pollo ( $3,11 \pm 1,84$  log<sub>10</sub> ufc/g) fueron mayores ( $P < 0,05$ ) que las observadas en preparados de carne de vacuno ( $1,46 \pm 0,72$  log<sub>10</sub> ufc/g), cerdo ( $1,87 \pm 1,18$  log<sub>10</sub> ufc/g) y pavo ( $1,91 \pm 0,49$  log<sub>10</sub> ufc/g). Estos valores son similares a valores observados previamente en muestras de preparados de carnes rojas y aves, donde se encontraron niveles entre  $0,70 \pm 0,00$  log<sub>10</sub> ufc/g y  $3,97 \pm 1,29$  log<sub>10</sub> ufc/g ([Buzón-Durán et al., 2017](#); [González-Gutiérrez et al., 2020](#)).

La determinación de enterococos en carnes y productos cárnicos es útil porque estos microorganismos actúan como indicadores de la calidad microbiológica y de los estándares de higiene durante la producción y manipulación, así como del mantenimiento de la integridad de la cadena de frío. Además, contribuyen a predecir la vida útil potencial de los alimentos ([Alonso-Calleja et al., 2004](#); [Álvarez-Astorga et al., 2002](#)). La presencia de una alta concentración de enterococos en los productos alimenticios se asocia con prácticas de higiene inadecuadas, dada la resistencia de estas bacterias al secado, temperaturas extremas, agentes limpiadores y desinfectantes, junto con otros factores de estrés ([Franz et al., 1999](#); [Thian y Hartman, 1981](#)). Aparte de su papel como microorganismos indicadores, los enterococos son responsables de infecciones y generalmente presentan múltiples resistencias a diversos antibióticos de importancia clínica ([Cordero et al., 2019](#); [Guerrero-Ramos et al., 2016a, 2016b](#)). De hecho, los enterococos se consideran microorganismos centinelas de la resistencia a los antibióticos ([Capita y Alonso-Calleja, 2013](#)).

### **Resistencia a antibióticos**

Se investigó la susceptibilidad a 15 antibióticos de importancia clínica humana y veterinaria de 200 cepas de enterococos aisladas de preparados cárnicos de vacuno (51 cepas), cerdo (47), pollo (50) y pavo (52). Todas las cepas presentaron susceptibilidad intermedia a al menos un antibiótico. Se observó una media de  $4,48 \pm 1,59$  resistencias por cepa. El número de resistencias fue de  $4,57 \pm 1,37$  para cepas aisladas de carne de vacuno,  $4,17 \pm 1,81$  para las de cerdo,  $4,50 \pm 1,64$  para las de pollo y  $4,65 \pm 1,53$  para las

de pavo ( $P < 0,05$ ). Si se consideran en conjunto la resistencia y la susceptibilidad reducida, el número de resistencias por cepa fue de  $6,97 \pm 2,02$ . La cifra para la carne de vacuno fue de  $7,67 \pm 1,51$ ; la de cerdo,  $6,87 \pm 2,33$ ; la de pollo,  $6,42 \pm 1,93$ , y la de pavo,  $6,90 \pm 2,11$  ( $P < 0,05$ ). Dichos valores son similares a los observados anteriormente con respecto a las bacterias Gram positivas de origen cárnico. Estos fueron resistentes a una media de 6,35 antibióticos en el caso de *Staphylococcus aureus* ([Buzón-Durán et al., 2017](#)) y de 5,58 para los enterococos ([Cordero et al., 2019](#)).

En la tabla 34 se muestran los distintos patrones de resistencia, determinados por el método de difusión en disco, que se encontraron en las 200 cepas de enterococos aisladas de preparados cárnicos. Un grupo de expertos internacionales que trabaja en una iniciativa conjunta del Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU., como señalaron Magiorakos *et al.* ([2012](#)), ha propuesto una definición estándar para la resistencia adquirida a los antibióticos como una forma de describir adecuadamente los perfiles resistentes a múltiples fármacos de cepas bacterianas de importancia para la salud pública. Estos expertos definieron la resistencia a múltiples fármacos como la no susceptibilidad adquirida a al menos un agente de tres o más categorías de antibióticos (uno o más de los cuales se administran en la práctica clínica). Este criterio se utilizó en el presente estudio para caracterizar los perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de enterococos.

Ninguna de las cepas de enterococos estudiadas fue susceptible a todos los antibióticos probados, mientras que dos cepas (1,0% de las cepas; una cepa de pollo y otra de pavo) fueron resistentes a un solo antibiótico. Sin embargo, 22 aislamientos (11,0%) fueron resistentes a dos antibióticos, uno (0,5%) fue resistente a tres antibióticos y 175 aislamientos (87,5%) mostraron un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos. La contaminación de carnes rojas y aves de corral con bacterias resistentes a los antibióticos es un hallazgo frecuente ([Álvarez-Fernández et al., 2012](#); [Buzón-Durán et al., 2018](#); [Capita et al., 2013](#); [Davis et al., 2018](#); [González-Gutiérrez et al., 2020](#); [Hussain et al., 2017](#); [Koo y Woo, 2011](#); [Ojer-Usoz et al., 2013](#)). Al igual que en la presente investigación, otros autores han observado que el 100% de las cepas de carne mostraron resistencia a uno o más antibióticos ([Carramiñana et al., 2004](#)). En esta investigación se ha observado un amplio

porcentaje de cepas con resistencia a múltiples fármacos, que es más alto que la mayoría de las cifras observadas para otras bacterias aisladas de alimentos ([EFSA-ECDC, 2020](#)), lo que es un resultado alarmante.

Tabla 34. Patrones de resistencia a antibióticos en 200 aislados de enterococos de preparados cárnicos

Patrones de resistencia a antibióticos	Nº de cepas	Patrones de resistencia a antibióticos	Nº de cepas	Patrones de resistencia a antibióticos	Nº de cepas
K	2	CIP/K/F/RD	3	AMP/P/CIP/K/RD/TE	1
CIP/K	2	CIP/K/F/TE	2	AMP/P/E/K/F/RD	2
E/K	6	CIP/K/F/VA	1	AMP/P/E/K/F/TE	1
K/RD	4	CIP/K/RD/TE	1	AMP/CIP/K/S/QD/TE	1
K/TE	9	E/K/F/RD	1	P/CIP/E/K/F/TE	1
K/VA	1	E/K/QD/RD	3	P/CIP/E/K/RD/TE	1
AMP/P/K	1	E/K/QD/VA	1	P/CIP/K/F/RD/VA	1
AMP/CIP/K	1	K/QD/RD/VA	5	P/E/FOS/K/F/RD	1
P/CIP/K	1	K/QD/TE/VA	4	P/E/K/QD/RD/VA	1
P/K/F	2	K/RD/TE/VA	1	CIP/E/FOS/K/F/RD	1
P/K/RD	2	AMP/P/CIP/K/F	2	CIP/E/K/F/RD/TE	1
P/K/TE	2	AMP/P/CIP/K/RD	1	CIP/E/K/QD/RD/TE	2
CIP/K/RD	3	AMP/P/CIP/K/TE	2	CIP/E/K/QD/RD/VA	4
CIP/K/TE	2	AMP/P/K/F/RD	2	CIP/E/K/QD/TE/VA	1
E/K/QD	1	AMP/P/K/F/TE	1	CIP/K/QD/RD/TE/VA	6
E/K/TE	8	AMP/CIP/E/K/RD	1	E/K/QD/RD/TE/VA	3
E/K/VA	1	AMP/CIP/K/S/TE	1	E/K/QD/RD/TEC/VA	3
FOS/K/VA	1	P/CIP/K/F/RD	3	AMP/P/CIP/E/FOS/K/TE	1
K/F/RD	6	P/CIP/K/F/TE	1	AMP/P/CIP/K/F/RD/TE	3
K/F/TE	1	P/E/K/F/RD	1	AMP/P/E/FOS/K/F/RD	1
K/QD/TE	2	P/FOS/K/F/RD	1	AMP/CIP/E/FOS/K/F/RD	2
K/RD/VA	1	P/K/F/RD/VA	1	P/CIP/E/K/F/RD/TE	1
AMP/P/K/RD	1	CIP/E/K/F/TE	1	P/CIP/E/K/F/RD/VA	1
AMP/CIP/K/RD	2	CIP/E/K/RD/TE	1	P/CIP/K/RD/TE/TEC/VA	1
AMP/CIP/K/TE	1	CIP/K/F/RD/TE	1	CIP/E/K/QD/RD/TE/VA	1
AMP/E/K/RD	2	CIP/K/QD/RD/VA	3	CIP/K/QD/RD/TE/TEC/VA	2
P/CIP/K/F	2	P/E/K/RD/TE	1	E/K/S/F/QD/RD/TE	1
P/CIP/K/RD	1	E/K/S/QD/RD	1	E/K/S/QD/RD/TE/VA	1
P/CIP/K/TE	1	E/K/F/RD/TE	3	AMP/P/CIP/E/FOS/K/F/RD	1
P/K/F/RD	3	E/K/QD/RD/VA	8	AMP/P/CIP/K/F/RD/TE/VA	1
P/K/RD/TE	1	E/K/RD/TEC/VA	1	AMP/CIP/E/K/S/QD/RD/VA	1

C/E/K/TE	1	K/QD/RD/TE/VA	5	CIP/E/CN/K/QD/RD/TE/VA	1
C/K/F/RD	1	AMP/P/CIP/E/K/TE	1	CIP/E/K/S/QD/RD/TE/TEC/VA	1
CIP/E/K/F	1	AMP/P/CIP/K/F/RD	1		
CIP/E/K/TE	4	AMP/P/CIP/K/F/TE	3		

Ampicilina (AMP), penicilina G (P), cloranfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (E), fosfomicina (FOS), gentamicina (CN), kanamicina (K), estreptomycin (S), nitrofurantoína (F), quinupristín-dalfopristín (QD), rifampicina (RD), tetraciclina (TE), teicoplanina (TEC) y vancomicina (VA).

La figura 21 muestra los porcentajes de cepas que fueron susceptibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados. No se observaron diferencias sustanciales entre los tipos de preparados cárnicos con respecto a las clases de antibióticos a los que las cepas eran resistentes. La resistencia observada de las cepas de enterococos respecto a la ampicilina fue en el 19,0% de las cepas, a la penicilina G el 29,0% y al cloranfenicol el 1,0%. En cuanto a la ciprofloxacina, la cifra fue del 43,5% y para la eritromicina ascendió al 41,5%. Para la fosfomicina, el valor fue del 4,5% y para la gentamicina del 0,5%, siendo para la kanamicina del 100%. En el caso de la estreptomycin, la cifra fue del 3,5%, y para la nitrofurantoína fue del 32,0%, mientras que frente a quinupristín-dalfopristín fue del 31,0%. El valor para la rifampicina fue del 61,0%, para la tetraciclina del 46,0%, para la teicoplanina del 4,0% y para la vancomicina del 31,5%. Se observó resistencia o susceptibilidad reducida para ampicilina (19,0% de las cepas), penicilina G (29,0%), cloranfenicol (9,0%), ciprofloxacina (93,5%), eritromicina (91,5%), fosfomicina (19,5%), gentamicina (2,0%), kanamicina (100%), estreptomycin (7,0%), nitrofurantoína (44,5%), quinupristín-dalfopristín (49,0%), rifampicina (71,5%), tetraciclina (66,5%), teicoplanina (48,5%) y vancomicina (46,5%). La resistencia a estos antibióticos se ha informado anteriormente en cepas de enterococos aisladas de la carne ([Cordero et al., 2019](#); [Guerrero-Ramos et al., 2016a, 2016b](#)), y también ha sido observado por otros investigadores ([Poeta et al., 2007](#); [Radhouani et al., 2013](#); [Radimersky et al., 2010](#); [Santos et al., 2013](#); [Silva et al., 2010](#); [Zigo et al., 2017](#)).

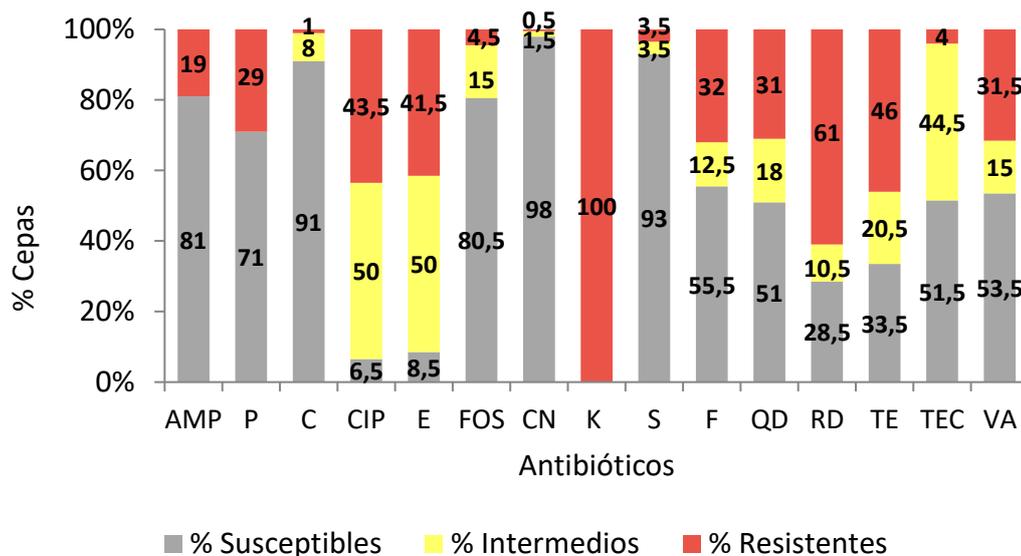


Figura 21. Porcentaje de cepas de enterococos susceptibles, intermedias o resistentes a cada uno de los antibióticos probados. Ampicilina (AMP), penicilina G (P), cloranfenicol (C), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (E), fosfomicina (FOS), gentamicina (CN), kanamicina (K), estreptomicina (S), nitrofurantoína (F), quinupristín-dalfopristín (QD), rifampicina (RD), tetraciclina (TE), teicoplanina (TEC) y

El considerable número de bacterias resistentes a antibióticos en alimentos de origen animal que reflejan la mayoría de las publicaciones consultadas está relacionado con el uso de antibióticos en diversos ámbitos, como la agricultura, la producción animal y la práctica clínica. Esto ha tenido un gran impacto en las poblaciones microbianas y ha desencadenado la selección y proliferación de bacterias resistentes ([González-Gutiérrez et al., 2020](#)). En esta línea, el presente trabajo observó una gran prevalencia de resistencia a los antibióticos ampliamente empleados en la producción animal ([Cameron y McAllister, 2016](#); [De Briyne et al., 2014](#); [Roth et al., 2019](#)). Además, se encontraron cepas resistentes a sustancias cuyo uso ha estado prohibido durante décadas en animales productores de alimentos, como el cloranfenicol o la nitrofurantoína. Cabe señalar que los mecanismos de resistencia cruzada o co-resistencia pueden haber contribuido a la persistencia en el tiempo de los genes de resistencia a estas sustancias, como se ha sugerido previamente ([Álvarez-Fernández et al., 2013](#); [Capita et al., 2013](#)).

La fuerte prevalencia de cepas de enterococos que son resistentes o tienen una susceptibilidad reducida a varios antibióticos que se encontró en este estudio es un hecho preocupante. Esto se debe a que, en el caso de una infección, probablemente se reduciría la utilidad de numerosos antibióticos empleados en la práctica clínica tanto en la medicina

humana como en la veterinaria. En tal escenario, debe señalarse que la ampicilina, ciprofloxacina, eritromicina, fosfomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomina, rifampicina, teicoplanina y vancomicina se clasifican como antibióticos de importancia crítica, mientras que la penicilina G, cloranfenicol, quinupristín-dalfopristín y tetraciclina se clasifican como antibióticos de gran importancia, y la nitrofurantoína como antibiótico importante para la medicina humana ([OMS, 2019](#)). Según la Organización Mundial de Sanidad Animal, la ampicilina, la ciprofloxacina, la eritromicina, la gentamicina, la kanamicina, la estreptomina y la tetraciclina se clasifican como agentes antimicrobianos veterinarios de importancia crítica, mientras que la fosfomicina y la rifampicina se consideran agentes antimicrobianos veterinarios de gran importancia ([OIE, 2018](#)).

### **Capacidad de formación de biofilms**

La capacidad de las bacterias para formar biofilms es motivo de preocupación tanto en la industria alimentaria como en entornos clínicos ([Díez-García et al., 2012](#)). En la presente investigación, todas las cepas de enterococos estudiadas produjeron biofilms en placas de micropocillos de poliestireno, con valores de  $DO_{580}$  (ensayo de cristal violeta) que oscilan entre  $0,146 \pm 0,012$  y  $3,192 \pm 0,024$ . La  $DO_{580}$  promedio observada entre las 200 cepas probadas fue  $0,613 \pm 0,558$ . Para la clasificación de las cepas se utilizó un valor de corte de tres desviaciones estándar por encima de la  $DO_{580}$  media de los controles negativos, calculada en 0,133. Las cepas aisladas se clasificaron como débiles productoras (51 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $0,206 \pm 0,033$ ), moderadas (78 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $0,374 \pm 0,068$ ) y fuertes (71 cepas;  $DO_{580}$  promedio =  $1,167 \pm 0,621$ ) de biofilm ( $P < 0,05$ ). Si bien la capacidad de los enterococos para producir biofilm sobre poliestireno ha sido previamente demostrada, hay que señalar que el porcentaje de cepas de enterococos formadoras de biofilm observado en la presente investigación (100%) es superior a las cifras obtenidas de alimentos, tanto en estudios previos ([Guerrero-Ramos et al., 2016b](#)) como en trabajos de investigación de otros autores ([Barbosa et al., 2010](#); [Ducková et al., 2014](#); [Koreňová et al., 2009](#); [Necidová et al., 2009](#)). La figura 22 muestra el porcentaje de cepas fuertes, moderadas y débiles productoras de biofilm aisladas de preparados de carne de vacuno, cerdo, pollo y pavo. Las muestras de carne de vacuno mostraron el porcentaje más alto ( $P < 0,05$ ) de cepas fuertes productoras de biofilm.

Un punto a destacar es que las cepas que fueron fuertes productoras de biofilm mostraron un número promedio de resistencias mayor ( $P < 0,05$ ) ( $4,73 \pm 1,49$ ) que las productoras débiles ( $4,06 \pm 1,74$ ). El número promedio de resistencias por cepa en las moderadas productoras de biofilm fue de  $4,53 \pm 1,54$  ( $P < 0,05$ ). Esta es la primera vez que se ha informado de una relación directa entre la resistencia a los antibióticos y la formación de biofilms en enterococos de preparados de carne y aves de corral, y se necesitan más estudios para respaldar este hallazgo. Cepas *et al.* (2019) han demostrado que la adquisición de resistencias antimicrobianas específicas puede comprometer o mejorar la formación de biofilms en varias especies de bacterias Gram negativas. Por el contrario, otros autores han observado que las cepas con un mayor nivel de resistencia tienden a formar biofilms más débiles (Qi *et al.*, 2016). Se ha sugerido que el biofilm actúa como un mecanismo que mejora la supervivencia de las bacterias, especialmente en cepas aisladas que presenten bajos niveles de resistencia. Además, aunque los biofilms que están formados por cepas con un alto nivel de resistencia son débiles, podrían proporcionar un nivel similar de protección para las bacterias.

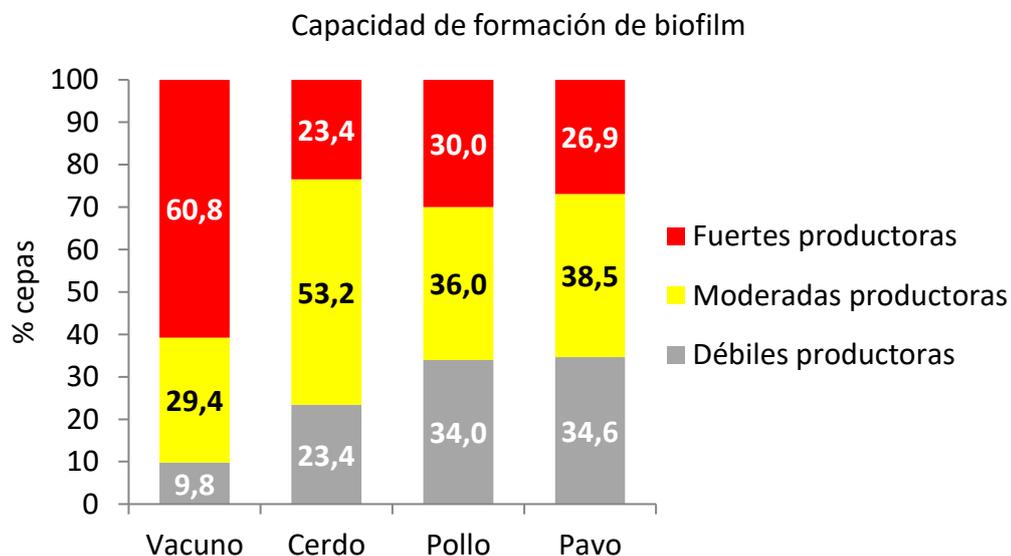


Figura 22. Porcentaje de cepas de enterococos débiles, moderadas y fuertes productoras de biofilm aisladas de carne de vacuno, cerdo, pollo y pavo.

Los resultados de esta investigación dejan claro que las cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de preparados de carne y aves de corral suponen una amenaza potencial para los consumidores, en vista de la considerable prevalencia de cepas resistentes o con susceptibilidad reducida a los antibióticos. Esto es un hallazgo que preocupa desde el

punto de vista de la salud pública y la seguridad alimentaria, no solo por el riesgo directo de infección por el consumo o manipulación de preparados cárnicos contaminados con enterococos, sino también por el riesgo indirecto derivado de una posible transferencia genética horizontal a otras bacterias patógenas. Las cepas de enterococos estudiadas mostraron débil (25,5%), moderada (39,0%) o fuerte (35,5%) capacidad para formar biofilms sobre poliestireno. Los resultados de esta investigación sugieren una relación directa entre la resistencia a los antibióticos y la capacidad de producir biofilms. Se destaca la necesidad de tomar medidas para reducir las tasas de resistencia a los antibióticos en las bacterias presentes en los preparados cárnicos y avícolas, incluido el uso prudente de los antibióticos en la producción animal. También se subraya la importancia de la manipulación cuidadosa de estos productos alimenticios para evitar la contaminación cruzada y la necesidad de garantizar una cocción completa.





# **CONCLUSIONES**

---



## CONCLUSIONES

Atendiendo a los resultados obtenidos en los diferentes estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, se desprenden las siguientes conclusiones.

**OBJETIVO 1. Si la prevalencia y/o niveles de contaminación con microorganismos patógenos e indicadores de falta de higiene en carne y preparados cárnicos se ajustan a la normativa vigente.**

La carne fresca de vacuno y los preparados cárnicos analizados presentan una baja calidad microbiológica con niveles altos de la flora o microbiota patógena y alterante. Esto supone un riesgo para la salud de los consumidores, por lo que se aconseja mejorar las prácticas higiénicas durante la manipulación de la carne y la elaboración de preparados cárnicos.

**OBJETIVO 2.1. Si el uso de diferentes tratamientos químicos de descontaminación reduce significativamente los niveles microbianos de la carne, tanto inmediatamente después del tratamiento como a lo largo del almacenamiento en refrigeración.**

El uso de ácido láctico (4%), ácido cítrico (2% y 4%) y fosfato trisódico (10%) sobre la superficie de carne de vacuno reduce los niveles de la microbiota o flora aerobia mesófila, psicrotrofa, de *Pseudomonas*, *Pseudomonas* fluorescentes y enterobacterias. El tratamiento con ácido cítrico al 2% es más eficaz que el resto de los tratamientos.

En relación con la carne de conejo, el uso de fosfato trisódico (8%), ácido ascórbico (2%) y ácido láctico (2%) reduce de forma significativa la flora o microbiota patógena, especialmente el ácido láctico. Además, estos tratamientos, sobre todo el tratamiento con fosfato trisódico, mantienen unos niveles más bajos de la flora o microbiota aerobia viable durante el almacenamiento en refrigeración.

A pesar de la eficacia desinfectante y bacteriostática del uso de tratamientos de descontaminación sobre la superficie de carne fresca, estos nunca deben ser un sustituto de las buenas prácticas de higiene.

**OBJETIVO 2.2. Si el uso de diferentes tratamientos químicos de descontaminación no modifica los parámetros de color instrumental de la superficie de la carne.**

El fosfato trisódico (10%) mantiene el color de la carne de vacuno, al contrario que el ácido láctico al 4%, que provoca el blanqueamiento de la superficie durante el almacenamiento en refrigeración. El parámetro rojo/verde ( $a^*$ ) de la carne tratada con ácido cítrico (2%) o con fosfato trisódico es similar al de la carne no tratada después del almacenamiento en refrigeración.

El uso de ácido ascórbico (2%) sobre carne de conejo provoca el blanqueamiento de su superficie, mientras que el uso de ácido láctico (2%), la oscurece. A medida que avanza el tiempo de almacenamiento en refrigeración, la carne tratada con ácido láctico se aclara. Ni el fosfato trisódico ni los ácidos orgánicos previamente mencionados afectan al parámetro rojo/verde ( $a^*$ ). El parámetro amarillo/azul ( $b^*$ ) es presenta valores reducidos en las muestras tratadas con fosfato trisódico.

La superficie de la carne varía de color cuando se utilizan ácidos orgánicos o fosfato trisódico en su superficie. Esta variación no es necesariamente negativa en todos los casos, puesto que las puntuaciones del análisis sensorial en carne de conejo tras el almacenamiento en refrigeración son superiores en las muestras tratadas con compuestos descontaminantes respecto de las no tratadas.

**OBJETIVO 2.3. Si el uso de diferentes tratamientos químicos de descontaminación no modifica las características sensoriales de la carne.**

La superficie de la carne de vacuno tratada con fosfato trisódico (10%) muestra una calidad sensorial similar a la de las muestras sin tratar tras el tratamiento, pero a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento en refrigeración, es el ácido cítrico al 2% el que mantiene la carne en mejores condiciones. El ácido láctico (4%) no mejora la calidad sensorial de la carne, porque provoca manchas en la superficie similares al aspecto de la carne cocida.

El ácido láctico (2%) afecta negativamente al color de la superficie de la carne de conejo, provocando manchas claras. El tratamiento de las muestras con fosfato trisódico no modifica las características de la carne una vez aplicado. La calidad sensorial de las muestras tratadas con fosfato trisódico (8%) y con ácido ascórbico (2%) mejora a medida que pasan los días de almacenamiento en refrigeración.

Los ácidos orgánicos afectan negativamente a la superficie de la carne cuando están recién aplicados, pero retrasan la degradación de esta durante el almacenamiento en refrigeración, de tal manera que aumentan su calidad sensorial respecto de las muestras no tratadas. El fosfato trisódico también mantiene la calidad organoléptica de la carne durante el almacenamiento y, además, no afecta negativamente a la carne una vez aplicado.

**OBJETIVO 3. Si las cepas microbianas aisladas de preparados cárnicos presentan características fenotípicas y/o genotípicas de especial interés en Salud Pública.**

Los preparados cárnicos contienen cepas de enterobacterias y enterococos con resistencia a diversos antibióticos, lo que pone en peligro la salud de los consumidores. Entre las enterobacterias existen cepas patógenas, sobre todo en carne de ave.

Una mayor capacidad de formación de biofilm se relaciona con un mayor número de antibióticos frente a los que las cepas presentan resistencia. Los enterococos aislados de preparados cárnicos de vacuno tienen una mayor capacidad de formación de biofilms.

Por todo ello, se aconseja una buena manipulación de los preparados cárnicos para evitar la diseminación de cepas resistentes o de genes de resistencia.





## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdel-Wareth, A.A.A., Ahmed, A.E., Hassan, H.A., Abd El-Sadek, M.S., Ghazalah, A.A. y Lohakare, J. (2019). Nutritional impact of nano selenium, garlic oil, and their combination on growth and reproductive performance of male Californian rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 249, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.016>
- Abee, T., Kovács, Á.T., Kuipers, O.P. y van der Veen, S. (2011). Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(2), 172-179. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.10.016>
- Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos. (2016). *Meat hygiene manual of procedures*. Recuperado el 19 de mayo de 2021, de <http://www.inspection.gc.ca/food/meat-and-poultry-products/manual-of-procedures/chapter-5/eng/1395150894222/1395150895519?chap=2#s20c2>
- Alonso-Calleja, C., Martínez-Fernández, B., Prieto, M. y Capita, R. (2004). Microbiological quality of vacuum-packed retail ostrich meat in Spain. *Food Microbiology*, 21(2), 241-246. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00060-1](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00060-1)
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2009a). Comparative analysis of acid resistance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains before and after exposure to poultry decontaminants. Role of the glutamate decarboxylase (GAD) system. *Food Microbiology*, 26(8), 905-909. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.06.008>
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. y 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., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2013a). Effectiveness of several chemical decontamination treatments against Gram-negative bacteria on poultry during storage under different simulated cold chain disruptions. *Food Control*, 34(2), 574-580. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.020>

- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2013b). 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>
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2015). Effect of various decontamination treatments against Gram-positive bacteria on chicken stored under differing conditions of temperature abuse. *Food Control*, 47, 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.032>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2012a). Behaviour of co-inoculated pathogenic and spoilage bacteria on poultry following several decontamination treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 159(2), 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.011>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013c). Decontamination treatments for psychrotrophic microorganisms on chicken meat during storage at different temperatures. *Journal of Food Protection*, 76(11), 1.977-1.980. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-175>
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y 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), 1.108-1.111. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.02.011>
- Alonso-Hernando, A., Guevara-Franco, J.A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2013d). Effect of the temperature of the dipping solution on the antimicrobial effectiveness of various chemical decontaminants against pathogenic and spoilage bacteria on poultry. *Journal of Food Protection*, 76(5), 833-842. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-396>
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2012b). 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-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. y García-Fernández, M.C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, 62(1), 45-50. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00225-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00225-X)
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C. y 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.011>
- Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díaz-Vega, C., Capita, R. y 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>
- Andritsos, N.D., Mataragas, M., Mavrou, E., Stamatiou, A. y Drosinos, E.H. (2012). The microbiological condition of minced pork prepared at retail stores in Athens, Greece. *Meat Science*, 91(4), 486-489. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.02.036>
- Anónimo. (1990). *The Oxoid Manual*. Oxoid, United Kingdom.
- Asociación Española de Normalización y Certificación. (2017a). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección, enumeración y serotipado de Salmonella. Parte 1: Detección de Salmonella spp.* (UNE-EN ISO 6579-1). <https://www.en.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/une?c=N0058760>
- Asociación Española de Normalización y Certificación. (2017b). *Microbiología de la cadena alimentaria. Método horizontal para la detección y el recuento de Listeria monocytogenes y de Listeria spp. Parte 1: Método de detección* (UNE-EN ISO 11290-1). <https://www.aenor.com/normas-y-libros/buscador-de-normas/une?c=N0059546>

Australia Nueva Zelanda. (2003). *Initial assessment report. Application A476. Acidified sodium chlorite*. Food Standards Australia New Zealand. [http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Documents/A476\\_Acidified\\_Sodium\\_Chlorite\\_IAR.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Documents/A476_Acidified_Sodium_Chlorite_IAR.pdf)

Australia Nueva Zelanda. (2005). *Scientific assessment of the public health and safety of poultry meat in Australia*. Food Standards Australia New Zealand. [http://www.foodstandards.gov.au/code/proposals/Documents/P282\\_Poultry%20%20DAR%20Attach3.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/code/proposals/Documents/P282_Poultry%20%20DAR%20Attach3.pdf)

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2006). Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the Commission related to treatment of poultry carcasses with chlorine dioxide, acidified sodium chlorite, trisodium phosphate and peroxyacids. *EFSA Journal*, 4(1):297, 1-27. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2006.297>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2008). Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *EFSA Journal*, 6(4):659, 1-26. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.659>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2010). Guidance on Revision of the joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin intended for human consumption. *EFSA Journal*, 8(4), 1.544-1.575. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1544>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2016). Scientific opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal*, 15(3), e04664. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4664>

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. (2019). The European Union One Health 2018 zoonoses report. *EFSA Journal*, 17(12), e05926. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5926>

- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. (2020). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal*, 18(3), e06007. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades. (2022). The European Union One Health 2021 zoonoses report. *EFSA Journal*, 20(12), 7666. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>
- Badr, H.M. (2004). Use of irradiation to control foodborne pathogens and extend the refrigerated market life of rabbit meat. *Meat Science*, 67(4), 541-548. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.11.018>
- Baird, R.M., Corry, J.E.L. y Curtis, G.D.W. (1987). Pharmacopoeia of culture media for food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 5, 221-222.
- Banović, M., Grunert, K.G., Barreira, M.M. y Fontes, M.A. (2009). Beef quality perception at the point of purchase: A study from Portugal. *Food Quality and Preference*, 20(4), 335-342. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.02.009>
- Barbosa, J., Gibbs, P.A. y Teixeira, P. (2010). Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control*, 21(5), 651-656. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.002>
- Belessi, C.E.A., Gounadaki, A.S., Psomas, A.N. y Skandamis, P.N. (2011). Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), S46-S52. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.020>
- Bernabéu, R., Rabadán, A., El Orche, N.E. y Díaz, M. (2018). Influence of quality labels on the formation of preferences of lamb meat consumers. A Spanish case study. *Meat Science*, 135, 129-133. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.09.008>

- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P.Ø. y Høiby, N. (2013). The *in vivo* biofilm. *Trends in Microbiology*, 21(9), 466-474. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.06.002>
- Blasco, A. y Piles, M. (1990). Muscular pH of the rabbit. *Annales de Zootechnie*, 39(2), 133-136. <https://doi.org/10.1051/animres:19900205>
- Bolder, N.M. (1997). Decontamination of meat and poultry carcasses. *Trends in Food Science & Technology*, 8(7), 221-227. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(97\)01040-6](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(97)01040-6)
- Bridier, A., Sánchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piardc, J.C., Naïtali, M. y Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45(B), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. y Sørensen, S.J. (2014). Review. Interactions in multispecies biofilms: Do they actually matter? *Trends in Microbiology*, 22(2), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Buzón-Durán, L., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2017). Microbial loads and antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* in different types of raw poultry-based meat preparations. *Poultry Science*, 96(11), 4.046-4.052. <https://doi.org/10.3382/ps/pex200>
- Buzón-Durán, L., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2018). Antibiotic susceptibility of methicillin-resistant staphylococci (MRS) of food origin: A comparison of agar disc diffusion method and a commercially available miniaturized test. *Food Microbiology*, 72, 220-224. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.018>
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R. y Harwood, V.J. (2012). Enterococci in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 685-706. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00023-12>
- Cameron, A. y McAllister, T.A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science Biotechnology*, 7(1), artículo 68. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0127-3>

- Capita, R. y 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., García-Fernández, M.C. y Moreno, B. (2003). Effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes* on excised and nonexcised chicken skin. *Journal of Food Protection*, 66(1), 61-64. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.1.61>
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Sierra, M., Moreno, B. y García-Fernández, M.C. (2000). Effect of trisodium phosphate solutions washing on the sensory evaluation of poultry meat. *Meat Science*, 55(4), 471-474. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00002-4)
- Capita, R., Álvarez-Fernández, E., Fernández-Buelta, E., Manteca, J. y 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., Cordero, J., González-Molina, D., Igrejas, G., Poeta, P. y Alonso-Calleja, C. (2019). 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., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2004). Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, 67(6), 1.303-1.308. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1303>
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A. y 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), 1.268-1.280. <https://doi.org/10.1128/AEM.02283-13>
- Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I. y Herrera, A. (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry

## Referencias bibliográficas

---

- slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology*, 104(1-2), 133-139.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.010>
- Castaños, E. (2015). *Las proteínas globulares* [Imagen en blog].  
<https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/tag/mioglobina/>
- Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades y Organización Mundial de la Salud. (2022). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022*.  
<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Joint-WHO-ECDC-AMR-report-2022.pdf>
- Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades y Agencia Europea de Medicamentos. (2009). *The bacterial challenge: Time to react*.  
<https://doi.org/10.2900/2518>
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J.P., Bosch, J. y Soto, S.M. (2019). Relationship between biofilm formation and antimicrobial resistance in Gram-Negative bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72-79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Collins, M.D., Jones, D., Farrow, J.A.E., Kilpper-Bälz, R. y Schleifer, K.H. (1986). *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*, 34(2), 220-223. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-361>
- Comisión Europea. (2019). *Agricultural outlook for markets and income 2019-2030*. Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural.  
<https://doi.org/10.2762/904294>
- Comisión Europea. (2022). *EU agricultural outlook for markets, income and environment, 2022-2032*. Dirección General de Agricultura y Desarrollo Rural.  
<https://doi.org/10.2762/29222>

- Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas en Alimentos. (2011) *Microorganisms in Foods 8. Use of Data for Assessing Process Control and Product Acceptance*. Springer.
- Comité Científico de medidas Veterinarias relativo a la Salud Pública. (1998). *Benefits and limitations of antimicrobial treatments for poultry carcasses*. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scv\\_out14\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scv_out14_en.pdf)
- Comité Científico sobre Riesgos para la Salud Emergentes y Recién Identificados (2019). *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihp/docs/scenihp\\_o\\_021.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf)
- Consejería de Sanidad. Red de Vigilancia Epidemiológica de Castilla y León. (2022). *Informe de brotes epidémicos. Castilla y León. Año 2020 y 2021*. Dirección General de Salud Pública, Servicio de Epidemiología. <https://www.saludcastillayleon.es/profesionales/es/inf-epidemiologicos/informes-epidemiologicos-castilla-leon/informes-brotos-alertas-epidemiologicas.ficheros/2187273-INFORME%20-EPI%20BROTOS%20EPIDEMICOS%202020-21.pdf>
- Cordero, J., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C. y 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. <https://doi.org/10.3390/foods8110536>
- Corino, C., Pastorelli, G., Pantaleo, L., Oriani, G. y Salvatori, G. (1999). Improvement of color and lipid stability of rabbit meat by dietary supplementation with vitamin E. *Meat Science*, 52(3), 285-289. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(99\)00004-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(99)00004-2)
- Cosgrove, S.E. (2006). The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases*, 42(2), S82-S89. <https://doi.org/10.1086/499406>
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. y Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>

- Courvalin, P. (2016). Why is antibiotic resistance a deadly emerging disease? *Clinical Microbiology and Infection*, 22(5), 405-407. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.012>
- Cousin, M.A., Jay, J.M. y Vasavada, P.C. (2001). Psychrotrophic microorganisms. En F.P. Downes y K. Ito (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* (4ª ed., pp. 159-166). American Public Health Association.
- Cox, G. y Wright, G.D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 287-292. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Cwíková, O. y Pytel, R. (2017). Evaluation of rabbit meat microbiota from the viewpoint of marketing method. *Potravinárstvo Slovak Journal of Food Science*, 11(1), 391-397. <https://doi.org/10.5219/764>
- Dabbou, S., Gai, F., Renna, M., Rotolo, L., Dabbou, S., Lussiana, C., Kovitvadhi, A., Brugiapaglia, A., De Marco, M., Helal, A.N., Zoccarato, I. y Gasco, L. (2017). Inclusion of bilberry pomace in rabbit diets: Effects on carcass characteristics and meat quality. *Meat Science*, 124, 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.10.013>
- Dainty, R.H. y Mackey, B.M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *The Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 73(s21), 103s-114s. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb03630.x>
- Dalle Zotte, A. (2002). Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*, 75(1), 11-32. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00308-6](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00308-6)
- Dalle Zotte, A., Celia, C. y Szendrő, Zs. (2016a). Herbs and spices inclusion as feedstuff or additive in growing rabbit diets and as additive in rabbit meat: A review. *Livestock Science*, 189, 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.04.024>

- Dalle Zotte, A., Cullere, M., Rémignon, H., Alberghini, L. y Paci, G. (2016b). Meat physical quality and muscle fibre properties of rabbit meat as affected by the sire breed, season, parity order and gender in an organic production system. *World Rabbit Science*, 24(2), 145-154. <https://doi.org/10.4995/wrs.2016.4300>
- Da Silva Meira, Q.G., de Medeiros Barbosa, I., Alves Aguiar Athayde, A.J., de Siqueira-Júnior, J.P. y Leite de Souza, E. (2012). Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*, 25(2), 469-475. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.030>
- Davis, G.S., Waits, K., Nordstrom, L., Grande, H., Weaver, B., Papp, K., Horwinski, J., Koch, B., Hungate, B.A., Liu, C.M. y Price, L.B. (2018). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiology*, 18, artículo 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1322-5>
- De Barcellos, M.D., Kügler, J.O., Grunert, K.G., Wezemaël, L.V., Pérez-Cueto, F.J.A., Ueland, Ø. y Verbeke, W. (2010). European consumers' acceptance of beef processing technologies: A focus group study. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(4), 721-732. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.05.003>
- De Briyne, N., Atkinson, J., Borriello, S.P. y Pokludová, L. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record*, 175(13), 325. <https://doi.org/10.1136/vr.102462>
- Decreto 2484/1967, de 21 de septiembre, por el que se aprueba el texto del Código Alimentario Español. *Boletín Oficial del Estado*, 248, de 17 de octubre de 1967, pp. 14.180-14.448. <https://boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-1967-16485>
- DeGeer, S.L., Wang, L., Hill, G.N., Singh, M., Bilgili, S.F. y Bratcher, C.L. (2016). Optimizing application parameters for lactic acid and sodium metasilicate against pathogens on fresh beef, pork and deli meats. *Meat Science*, 118, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.008>
- Del Río, E., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2006). Comparison of pathogenic and spoilage bacterial levels on refrigerated poultry parts following treatment with

- trisodium phosphate. *Food Microbiology*, 23(2), 195-198.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.02.003>
- Del Río, E., González de Caso, B., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y 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>
- Del Río, E., Muriente, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007a). Effectiveness of trisodium phosphate, acidified sodium chlorite, citric acid, and peroxyacids against pathogenic bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection*, 70(9), 2.063-2.071. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.9.2063>
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007b). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 115(3), 268-280. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.048>
- Dias-Morse, P.N., Pohlman, F.W., Iglesias, J.M., Devine, T.L. y Beers, K.L. (2015). Evaluation of antimicrobial efficacy of citric and lactic acid based treatments on *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. removal in fresh beef steaks. *Meat Science*, 101, 152.  
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.09.120>
- Díez-García, M., Capita, R. y 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>
- Dikeman, M.E. (2017). *Ensuring safety and quality in the production of beef. Vol. 2. Quality.* (1ª ed.). Burleigh Dodds Science Publishing.
- Dodds, D.R. (2017). Antibiotic resistance: A current epilogue. *Biochemical Pharmacology*, 134, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.005>
- Doménech, E., Jiménez-Belenguer, A., Amoros, J.A., Ferrus, M.A. y Escribe, I. (2015a). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella*

- strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. *Food Control*, 47, 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.043>
- Doménech, E., Jiménez-Belenguer, A., Pérez, R., Ferrús, M.A. y Escriche, I. (2015b). Risk characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* in meat products. *Food Control*, 57, 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.04.001>
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donlan, R.M. y Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128%2FCMR.15.2.167-193.2002>
- Dourou, D., Beauchamp, C.S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K.E., Smith, G.C., Nychas, G.J.E. y Sofos, J.N. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 262-268. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004>
- Dubourg, G., Cédric Abat, C. y Raoult, D. (2017). Why new antibiotics are not obviously useful now. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 49(5), 549-553. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.11.015>
- Ducková, V., Čanigová, M. y Kročko, M. (2014). Enterococci and their resistance to antibiotics and thyme essential oil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(1), 1-4. [https://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2014/01/1\\_jmbfs\\_duckova\\_2014\\_m.pdf](https://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2014/01/1_jmbfs_duckova_2014_m.pdf)
- Echegaray, N., Gómez, B., Barba, F.J., Franco, D., Estévez, M., Carballo, J., Marszałek, K. y Lorenzo, J.M. (2018). Chestnuts and by-products as source of natural antioxidants in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 82, 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.10.005>
- Eddy, B.P. e Ingram, M. (1953). Interaction between ascorbic acid and bacteria. *Bacteriological Reviews*, 17(2), 93-107

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC180761/pdf/bactrev00013-0007.pdf>

Elmali, M., Yaman, H., Tekinşen, K.K., Öner, S. y Çekin, E. (2012). Inhibitory effects of different decontamination agents on the levels of *Listeria monocytogenes* in the experimentally inoculated raw beef samples in the laboratory conditions. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(5), 763-768. <https://pdfs.semanticscholar.org/ea4d/e32a9b76317971b69b752fceb806e7bf.pdf?ga=2.73403282.1284989712.1621527291-908713998.1621527291>

Even, C., Marlière, C., Ghigo, J.M., Allain, J.M., Marcellan, A. y Raspaud, E. (2017). Recent advances in studying single bacteria and biofilm mechanics. *Advances in Colloid and Interface Science*, 247, 573-588. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.026>

Fadare, A.O. y Arogbo, V.K. (2015). Influence of breed on the organoleptic properties of rabbit. *Journal of Agriculture and Sustainability*, 8(1), 1-13. [https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwihq7iN8Z\\_hAhUMQBoKHWygAJgQFjABegQIAhAC&url=http%3A%2F%2Finfinitypress.info%2Findex.php%2Fias%2Farticle%2Fdownload%2F1141%2F563&usg=AOvVaw1WSaUA7BEcT9eFyKL3ICvS](https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwihq7iN8Z_hAhUMQBoKHWygAJgQFjABegQIAhAC&url=http%3A%2F%2Finfinitypress.info%2Findex.php%2Fias%2Farticle%2Fdownload%2F1141%2F563&usg=AOvVaw1WSaUA7BEcT9eFyKL3ICvS)

FAOSTAT. Base de datos. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QL>

Farmer III, J.J., Boatwright, K.D. y Janda, J.M. (2007). Enterobacteriaceae: Introduction and identification. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry y M.A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9ª ed., pp. 649-669). American Society of Microbiology Press.

Fernqvist, F. y Ekelund, L. (2014). Credence and the effect on consumer liking of food- A review. *Food Quality and Preference*, 32(C), 340-353. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.10.005>

Foulquié Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E. y De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106(1), 1-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>

- Founou, L.L., Founou, R.C. y Essack, S.Y. (2016). Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1.881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01881>
- Franz, C.M., Holzapfel, W.H. y Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), 1-24. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00007-0](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00007-0)
- Frieri, M., Kumar, K. y Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. y Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176(2), 269-275. <https://doi.org/10.1128/jb.176.2.269-275.1994>
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretrø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S. y Nychas, G.J. (2014). Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*, 97(3), 298-309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023>
- González-Gutiérrez, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2020). Microbial load and antibiotic resistance in raw beef preparations from northwest Spain. *Food Science & Nutrition*, 8(2), 777-785. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1319>
- González-Machado, C., Capita, R., Riesco-Peláez, F. y Alonso-Calleja, C. (2018). Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. *PLoS ONE*, 13(7), e0200011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200011>
- Grunert, K.G., Bredahl, L. y Brunsø, K. (2004). Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector- a review. *Meat Science*, 66(2), 259-272. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00130-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00130-X)

- Grunert, K.G., Loose, S.M., Zhou, Y. y Tinggaard, S. (2015). Extrinsic and intrinsic quality cues in Chinese consumers' purchase of pork ribs. *Food Quality and Preference*, 42(1), 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.01.001>
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S. y Helmuth, R. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), 489-492. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg362>
- Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2016a). Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiology*, 53(Pt 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. y 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>
- Gwida, M., Hotzel, H., Geue, L. y Tomaso, H. (2014). Occurrence of Enterobacteriaceae in raw meat and in human samples from Egyptian retail sellers. *International Scholarly Research Notices*, 565671. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/565671>
- Henchion, M., McCarthy, M. y Resconi, V.C. (2017). Beef quality attributes: A systematic review of consumer perspectives. *Meat Science*, 128, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.006>
- Henchion, M., McCarthy, M., Resconi, V.C. y Troy, D. (2014). Meat consumption: Trends and quality matters. *Meat Science*, 98(3), 561-568. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.007>
- Holman, B.W.B., van de Ven, R.J., Mao, Y., Coombs, C.E.O. y Hopkins, D.L. (2017). Using instrumental (CIE and reflectance) measures to predict consumers' acceptance of beef colour. *Meat Science*, 127, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.005>

- Howard, S.J., Catchpole, M., Watson, J. y Davies, S.C. (2013). Antibiotic resistance: Global response needed. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1.001-1.003. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70195-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70195-6)
- Hulot, F. y Ouhayoun, J. (1999). Muscular pH and related traits in rabbits: A review. *World Rabbit Science*, 7(1), 15-36. <https://doi.org/10.4995/wrs.1999.378>
- Hunt, M., King, A., Barbut, S., Claus, J., Cornforth, D., Hanson, D., Lindahl, G., Mancini, R., Milkowski, A., Mohan, A., Pohlman, F., Raines, C., Seyfert, M., Sørheim, O., Suman, S., Weber, M., Merok, K.J., Joseph, P. y Ramanathan, R. (2012). *Meat color measurement guidelines*. Asociación Americana de la Ciencia de la Carne. [https://www.meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/Hot-Topics/download-the-ebook-format-pdf-of-the-meat-color-measurement-guidelines.pdf?sfvrsn=a218b8b3\\_0](https://www.meatscience.org/docs/default-source/publications-resources/Hot-Topics/download-the-ebook-format-pdf-of-the-meat-color-measurement-guidelines.pdf?sfvrsn=a218b8b3_0)
- Hussain, A., Shaik, S., Ranjan, A., Nandanwar, N., Tiwari, S.K., Majid, M., Baddam, R., Qureshi, I.A., Semmler, T., Wieler, L.H., Islam, M.A., Chakravortty, D. y Ahmed, N. (2017). Risk of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from commercial broiler and free-range retail chicken in India. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2.120. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02120>
- Inoue, H. y Minghui, R. (2017). Antimicrobial resistance: Translating political commitment into national action. *Bull World Health Organ*, 95(4), 242. <https://doi.org/10.2471%2FBLT.17.191890>
- Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos. (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today*, 11(3), 137-176. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.474.2198&rep=rep1&type=pdf>
- Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio. (2019). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 29ª edición. CLSI supplement M100. <https://www.techstreet.com/mss/products/preview/2031512>

- Instituto Nacional de Estadística. (2020). *España en cifras 2020*. Catálogo de publicaciones oficiales de la Administración General del Estado. <https://www.ine.es>
- Instituto Nacional de Estadística. (2022). *España en cifras 2022*. Catálogo de publicaciones oficiales de la Administración General del Estado. <https://www.ine.es>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M.A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M. y Kamil, M.A. (2018). Review. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jay, J.M. (2002). A review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1.200-1.206. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.7.1200>
- Jenkins, C., Rentenaar, R.J., Landraud, L., Brisse, S. (2017). Enterobacteriaceae. En J. Cohen, W.G. Powderly y S.M. Opal (Eds.), *Infectious Diseases* (4ª ed., Vol. 2, pp. 1.565-1.578), Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00180-5>
- Jerney, Z., Bodnar, K., Paraszt, M., Privoczki, Z.I. y Makra, L. (2017). Global rabbit meat production with a special focus on the role of China. *Lucrări Științifice Management Agricol*, 19(3), 31-36. <http://lsma.ro/index.php/lsma/article/view/1245/pdf>
- Jessen, B. y Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 265-269. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(03\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00046-5)
- Jiménez-Villarreal, J.R., Pohlman, F.W., Johnson, Z.B. y Brown Jr., A.H. (2003a). Lipid, instrumental color and sensory characteristics of ground beef produced using trisodium phosphate, cetylpyridinium chloride, chlorine dioxide or lactic acid as multiple antimicrobial interventions. *Meat Science*, 65(2), 885-891. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00295-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00295-4)
- Jiménez-Villarreal, J.R., Pohlman, F.W., Johnson, Z.B., Brown, A.H. y Baublits, R.T. (2003b). The impact of single antimicrobial intervention treatment with cetylpyridinium chloride, trisodium phosphate, chlorine dioxide or lactic acid on ground beef lipid,

- instrumental color and sensory characteristics. *Meat Science*, 65(3), 977-984.  
[https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00315-7](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00315-7)
- Judge, M.D., Aberle, E.D., Forrest, J.C., Hendricks, H.B. y Merkel, R.A. (1989). Properties of fresh meat. En M.D. Judge (Con.). *Principles of meat science* (2ª ed., pp. 178-185). Kendall/Hunt Publishing Company.
- Jutkina, J., Marathe, N.P., Flach, C.F. y Larsson, D.G.J. (2018). Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of the Total Environment*, 616-617, 172-178.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.312>
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. y Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kassem, A., Meade, J., Gibbons, J., McGill, K., Walsh, C., Lyng, J. y Whyte, P. (2017). Evaluation of chemical immersion treatments to reduce microbial populations in fresh beef. *International Journal of Food Microbiology*, 261, 19-24.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.005>
- Ke, S., Huang, Y., Decker, E.A. y Hultin, H.O. (2009). Impact of citric acid on the tenderness, microstructure and oxidative stability of beef muscle. *Meat Science*, 82(1), 113-118. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.12.010>
- Khlijji, S., van de Ven, R., Lamb, T.A., Lanza, M. y Hopkins., D.L. (2010). Relationship between consumer ranking of lamb colour and objective measures of colour. *Meat Science*, 85(2), 224-229. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.01.002>
- Kohler, R., Krause, G., Beutin, L., Stephan, R. y Zweifel, C. (2008). Shedding of food-borne pathogens and microbiological carcass contamination in rabbits at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 132(1-2), 149-157.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.020>
- Koné, A.P., Abdelwahed, M.Z., Cinq-Mars, D., Desjardins, Y., Guay, F., Gosselin, A. y Saucier, L. (2015). Improvement of rabbit meat microbial quality by feed

- supplementation with natural sources of polyphenols. *Meat Science*, 99, 145. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.07.014>
- Koo, H.J. y Woo, G.J. (2011). Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.003>
- Koreňová, J., Lopašovská, J. y Kuchta, T. (2009). Biofilm forming bacterial contaminants in small and medium-sized ewes' milk and meat processing enterprises in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*, 48(3), 115-120. <https://www.vup.sk/resources/bulletin/jfnr-2009-3-p115-120-korenova.pdf>
- Kozioł, K., Maj, D. y Bieniek, J. (2015). Changes in the color and pH of rabbit meat in the aging process. *Medycyna Weterynaryjna*, 71(2), 104-108 <https://repo.ur.krakow.pl/info/article/UR48450f4cbf4f4f8ca053a5eedcfee8c0/>
- Kozioł, K., Siudak, Z., Pałka, S., Kmiecik, M., Otwinowska-Mindur, A., Migdal, L. y Bieniek, J. (2017). The effect of breed and sex on the texture of rabbit meat. *Scientific Annals of Polish Society of Animal Production*, 13(2), 55-60. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0013.5224>
- Kragh, K.N., Alhede, M., Kvich, L. y Bjarnsholt, T. (2019). Into the well- A close look at the complex structures of a microtiter biofilm and the crystal violet assay. *Biofilm*, 1, 100006. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100006>
- Kragh, K.N., Alhede, M., Rybtke, M., Stavnsberg, C., Jensen, P.Ø., Tolker-Nielsen, T., Whiteley, M. y Bjarnsholt, T. (2018). The inoculation method could impact the outcome of microbiological experiments. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(5), e02264-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.02264-17>
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z. y Hasnain, S.E. (2017). Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 481-489. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2017.09.016>

- Lan, Y., Shang, Y., Song, Y. y Dong, Q. (2016). Changes in the quality of superchilled rabbit meat stored at different temperatures. *Meat Science*, 117, 173-181. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.02.017>
- Lancette, G.A. y Tatini, S.R. (1992). *Staphylococcus aureus*. En C. Vanderzant y D.F. Splittstoesser (Eds.), *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (p. 533). American Public Health Association, Washington D.C.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K.M., Wertheim, H.F.L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Quizhpe, A., Qamar, F.N., Mir, F., ... Cars, O. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases Commission*, 13(12), 1.057-1.098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- Ledward, D.A. (1985). Post-slaughter influences on the formation of metmyoglobin in beef muscles. *Meat Science*, 15(3), 149-171. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(85\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0309-1740(85)90034-8)
- Logue, C.M., Sherwood, J.S., Olah, P.A., Elijah, L.M. y Dockter, M.R. (2003). The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1), 16-24. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01815.x>
- Lorés, A. (22 de agosto de 2012). *Vídeo: El color de la carne y los diferentes estados del pigmento responsable, la mioglobina* [Imagen en blog]. <http://www.esbertus.com/blog/2012/08/22/video-el-color-de-la-carne-y-los-diferentes-estados-del-pigmento-responsable-la-mioglobina-en/>
- Luning, P.A., Jacxsens, L., Rovira, J., Osés, S.M., Uyttendaele, M. y Marcelis, W.J. (2011). A concurrent diagnosis of microbiological food safety output and food safety management system performance: Cases from meat processing industries. *Food Control*, 22(3-4), 555-565. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.10.003>
- Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice,

- L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T. y Monnet, D.L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Maj, D., Bieniek, J., Sternstein, I., Węglarz, A. y Zapletal, P. (2012). Effect of genotype and sex on meat colour changes in rabbit. *Archiv fur Tierzucht*, 55(4), 385-390. <https://doi.org/10.5194/aab-55-385-2012>
- Mancini, R.A. y Hunt, M.C. (2005). Current research in meat color. *Meat Science*, 71(1), 100-121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.03.003>
- Mancini, R.A., Hunt, M.C., Seyfert, M., Kropf, D.H., Hachmeister, K.A., Herald, T.J. y Johnson, D.E. (2007). Effects of ascorbic and citric acid on beef lumbar vertebrae marrow colour. *Meat Science*, 76(3), 568-573. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.01.015>
- Mancini, S., Preziuso, G., Dal Bosco, A., Roscini, V., Szendrő, Z., Fratini, F. y Paci, G. (2015). Effect of turmeric powder (*Curcuma longa* L.) and ascorbic acid on physical characteristics and oxidative status of fresh and stored rabbit burgers. *Meat Science*, 110, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.07.005>
- Mancini, R.A. y Ramanathan, R. (2014). Effects of postmortem storage time on color and mitochondria in beef. *Meat Science*, 98(1), 65-70. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.007>
- Merlino, V.M., Borra, D., Girgenti, V., Dal Vecchio, A. y Massaglia, S. (2018). Beef meat preferences of consumers from Northwest Italy: Analysis of choice attributes. *Meat Science*, 143, 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.023>
- Messi, P., Guerrieri, E., de Niederhäusern, S., Sabia, C. y Bondi, M. (2006). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology*, 107(2), 218-222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.026>

- Meyerding, S.G.H., Gentz, M., Altmann, B. y Meier-Dinkel, L. (2018). Beef quality labels: A combination of sensory acceptance test, stated willingness to pay, and choice-based conjoint analysis. *Appetite*, 127, 324-333. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2018.05.008>
- Michael, C.A., Dominey-Howes, D. y Labbate, M. (2014). The antimicrobial resistance crisis: Causes, consequences, and management. *Frontiers in Public Health*, 2(145), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00145>
- Milan, C., Agostinetto, A., Conceição, R.C.S., Gonzalez, H.L. y Timm, C.D. (2015). Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(2), 642-646. <https://doi.org/10.1590/1678-7298>
- Min, J.S., Lee, S.O., Jang, A., Jo, C. y Lee, M. (2007). Irradiation and organic acid treatment for microbial control and the production of biogenic amines in beef and pork. *Food Chemistry*, 104(2), 791-799. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.12.030>
- Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. (2017). *Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.), Indicaciones Geográficas Protegidas (I.G.P.) y Especialidades Tradicionales Garantizadas (E.T.G.) de productos agroalimentarios. Año 2016*. Secretaría General de Agricultura y Alimentación, Dirección General de la Industria Alimentaria. [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/informedop\\_igp\\_2016\\_ver4\\_tcm30-451593.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/informedop_igp_2016_ver4_tcm30-451593.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022a). *El sector cunícola en cifras. Principales indicadores económicos 2021*. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Producciones Ganaderas y cinegéticas. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicoscuniculturaok\\_tcm30-627054.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicoscuniculturaok_tcm30-627054.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022b). *El sector de la avicultura de carne en cifras. Principales indicadores económicos 2021*. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Producciones

- Ganaderas y cinegéticas.  
[https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informecompletoparasubirindicadores\\_tcm30-623991.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/informecompletoparasubirindicadores_tcm30-623991.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022c). *El sector de la carne de cerdo en cifras. Principales indicadores económicos 2021*. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Producciones Ganaderas y cinegéticas. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoressectorporcino2021\\_tcm30-564427.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoressectorporcino2021_tcm30-564427.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022d). *El sector de la carne de vacuno en cifras. Principales indicadores económicos 2021*. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios, Subdirección General de Producciones Ganaderas y cinegéticas. [https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoresanualesvacunodecarne\\_datos2021\\_provisional2\\_tcm30-381390.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoresanualesvacunodecarne_datos2021_provisional2_tcm30-381390.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2022e). *Informe del consumo alimentario en España 2021*. Secretaría General Técnica. [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res\\_tcm30-624017.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-consumo-alimentario-2021-baja-res_tcm30-624017.pdf)
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. (2023). *Avance anual de comercio exterior 2022*. Subsecretaría de Agricultura, Pesca y Alimentación, Subdirección General de Análisis, Coordinación y Estadística. [https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/avanceanualcomercioexterior2022\\_tcm30-647699.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/ministerio/servicios/analisis-y-prospectiva/avanceanualcomercioexterior2022_tcm30-647699.pdf)
- Ministerio de Ciencia e Innovación. (2022a). *Informe epidemiológico sobre la situación de la campilobacteriosis en España. Años 2019 y 2020*. Instituto de Salud Carlos III. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. <https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/Enfer>

[medadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Campilobacteriosis/Informe%202019\\_2020\\_Campilobacteriosis\\_final2.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Campilobacteriosis/Informe%202019_2020_Campilobacteriosis_final2.pdf)

Ministerio de Ciencia e Innovación. (2022b). *Informe epidemiológico sobre la situación de la salmonelosis en España. Años 2019 y 2020*. Instituto de Salud Carlos III. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Salmonelosis/Informe%202019\\_2020\\_Salmonelosis\\_final.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Salmonelosis/Informe%202019_2020_Salmonelosis_final.pdf)

Ministerio de Ciencia e Innovación. (2022c). *Informe epidemiológico sobre la situación de la yersiniosis en España. Años 2019 y 2020*. Instituto de Salud Carlos III. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Yersiniosis/Informe%202019\\_2020\\_Yersiniosis\\_final.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/archivos%20A-Z/Yersiniosis/Informe%202019_2020_Yersiniosis_final.pdf)

Ministerio de Ciencia e Innovación. (2023). *Informe epidemiológico sobre la situación de la infección por cepas de Escherichia coli productoras de toxina Shiga o Vero en España. Años 2019 y 2020*. Instituto de Salud Carlos III. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/Informe\\_VTEC\\_19-20\\_final.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/Informe_VTEC_19-20_final.pdf)

Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. (2019). *Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018*. Instituto de Salud Carlos III. Sistema de Información Microbiológica. Centro Nacional de Epidemiología. [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/resultados%20vigilancia/Informe\\_listeriosis-RENAVE\\_28082019.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/resultados%20vigilancia/Informe_listeriosis-RENAVE_28082019.pdf)

- Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. (2019). *Información sobre el brote de listeriosis por consumo de productos fabricados por la empresa Magrudis S.L.* Secretaría General de Sanidad y Consumo, Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación, Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias. [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/20190920\\_Brote\\_de\\_listeriosis\\_asociado\\_al\\_consumo\\_de\\_carne\\_mecha\\_da.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/listeriosis/docs/20190920_Brote_de_listeriosis_asociado_al_consumo_de_carne_mecha_da.pdf)
- 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(1), 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.046>
- Monahan, F.J., Skibsted, L.H. y Andersen, M.L. (2005). Mechanism of oxymyoglobin oxidation in the presence of oxidizing lipids in bovine muscle. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(14), 5.734-5.738. <https://doi.org/10.1021/jf0502956>
- Monds, R.D. y O'Toole, G.A. (2009). The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17(2), 73-87. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>
- Moreno García, B. (2006). *Higiene e inspección de carnes. Vol. I. Procedimientos recomendados e interpretación de la normativa legal* (2ª ed.). Díaz de Santos, Madrid.
- Murray, C.J.L., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L.,... y Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10.325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nakyinsige, K., Sazili, A.Q., Aghwan, Z.A., Zulkifli, I., Goh, Y.M., Abu Bakar, F. y Sarah, S.A. (2015). Development of microbial spoilage and lipid and protein oxidation in rabbit meat. *Meat Science*, 108, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.029>

- Napolitano, F., Girolami, A. y Braghieri, A. (2010). Consumer liking and willingness to pay for high welfare animal-based products. *Food Science & Technology*, 21(11), 537-543. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.07.012>
- Nataro, J.P., Bopp, C.A., Fields, P.I., Kaper, J.B. y Strockbine, N.A. (2007). *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry y M.A. Pfaller (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (9ª ed., pp. 670-687). American Society of Microbiology Press, Washington D.C.
- Necidová, L., Janštová, B., Karpíšková, S., Cupáková, Š., Dušková, M. y Karpíšková, R. (2009). Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(1), s354-s356. <https://doi.org/10.17221/1087-cjfs>
- Ngapo, T.M., Braña Varela, D. y Rubio Lozano, M.S. (2017). Mexican consumers at the point of meat purchase. Beef choice. *Meat Science*, 134, 34-43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.07.013>
- Ngapo, T.M., Rubio Lozano, M.S. y Braña Varela, D. (2018). Mexican consumers at the point of meat purchase. Pork choice. *Meat Science*, 135, 27-35. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.08.005>
- Nguyen, H.D.N. y Yuk, H.G. (2013). Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*, 29(1), 236-240. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.006>
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrnissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V.P., Hakim, M.S., Meliala, A., Aman, A.T. y Nuryastuti, T. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, 13(11), artículo 20. <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
- Nobile, C.G.A., Costantino, R., Bianco, A., Pileggi, C. y Pavia, M. (2013). Prevalence and pattern of antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. in poultry meat in Southern Italy. *Food Control*, 32(2), 715-718. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.02.011>

Nulty, K.M., Soon, J.M., Wallace, C.A. y Nastasijevic, I. (2016). Antimicrobial resistance monitoring and surveillance in the meat chain: A report from five countries in the European Union and European Economic Area. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.010>

Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos. (2021a). *Food and drugs. Part 182. Substances generally recognized as safe*. Código electrónico de Regulaciones Federales. Recuperado el 23 de abril de 2021, de [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#se21.3.182\\_11778](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=e956d645a8b4e6b3e34e4e5d1b690209&mc=true&node=pt21.3.182&rgn=div5#se21.3.182_11778)

Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos. (2021b). *Food and drugs. Part 184. Direct food substances affirmed as generally recognized as safe*. Código electrónico de Regulaciones Federales. Recuperado el 23 de abril de 2021, de <https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=&SID=f1e44f812d151a58253abf19e403026a&mc=true&r=PART&n=pt21.3.184>

Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos. (2021c). *Food and drugs. Specific usage additives. 21 CFR 173.300*. Código electrónico de Regulaciones Federales. Recuperado el 23 de abril de 2021, de [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=22909d8e0e18f7eec5d91963cd06caf&mc=true&node=se21.3.173\\_1300&rgn=div8](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=22909d8e0e18f7eec5d91963cd06caf&mc=true&node=se21.3.173_1300&rgn=div8)

Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos. (2021d). *Food and drugs. Specific usage additives. 21 CFR 173.325*. Código electrónico de Regulaciones Federales. Recuperado el 23 de abril de 2021, de [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d7a64bf28dd622c4bdacdba8a931fa88&mc=true&node=se21.3.173\\_1325&rgn=div8](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d7a64bf28dd622c4bdacdba8a931fa88&mc=true&node=se21.3.173_1325&rgn=div8)

Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos. (2021e). *Food and drugs. Specific usage additives. 21 CFR 173.370*. Código electrónico de Regulaciones Federales. Recuperado el 23 de abril de 2021, de [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d7a64bf28dd622c4bdacdba8a931fa88&mc=true&node=se21.3.173\\_1370&rgn=div8](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d7a64bf28dd622c4bdacdba8a931fa88&mc=true&node=se21.3.173_1370&rgn=div8)

- Oficina de Publicaciones del Gobierno de los Estados Unidos. (2021f). *Food and drugs. Specific usage additives. 21 CFR 173.375*. Código electrónico de Regulaciones Federales. Recuperado el 23 de abril de 2021, de [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d7a64bf28dd622c4bdacdba8a931fa88&mc=true&node=se21.3.173\\_1375&rgn=div8](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=d7a64bf28dd622c4bdacdba8a931fa88&mc=true&node=se21.3.173_1375&rgn=div8)
- Ojer-Usoz, E., González, D., Vitas, A.I., Leiva, J., García-Jalón, I., Febles-Casquero, A. y Escolano, M.S. (2013). Prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science*, 93(2), 316-321. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.09.009>
- Olson, J.C. y Jacoby, J. (1972). Cue utilization in the quality perception process. En M. Venkatesan (Ed.), *Third Annual Conference of the Association for Consumer Research* (pp. 167-179). Association for Consumer Research. <http://www.acrwebsite.org/volumes/11997/volumes/sv02/SV-02>
- OMS Pathogens priority list working group (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- O'Neill, J. (2016). *Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations*. Gobierno de Reino Unido. [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Ordóñez Pereda, J.A., Cambero Rodríguez, M.I., Fernández Álvarez, L., García Sanz, M.L., García de Fernando Minguillón, G.D., de la Hoz Perales, L. y Selgas Cortecero, M.D. (1998). *Tecnología de los alimentos. Vol. II. Alimentos de origen animal*. Editorial Síntesis.
- Ordóñez Pereda, J.A., García de Fernando Minguillón, G.D., Selgas Cortecero, M.D., García Sanz, M.L., Cambero Rodríguez, M.I., Fernández Álvarez, L., Fernández Álvarez, M. y Hierro Paredes, E. (2014). *Tecnología de los alimentos de origen animal. Vol. I. Fundamentos de bioquímica y microbiología de los alimentos*. Editorial Síntesis.

## Referencias bibliográficas

---

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). *The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020*. <http://www.fao.org/3/a-i5996e.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2017). Biannual report on global food markets. *Food Outlook* 11 <http://www.fao.org/3/a-l8080e.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *Meat Market Review*. <http://www.fao.org/3/l9286EN/i9286en.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019a). Biannual report on global food markets. *Food Outlook* 11. <http://www.fao.org/3/ca4526en/ca4526en.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2019b). *Meat market review*. <http://www.fao.org/3/ca3880en/ca3880en.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020a). Biannual report on global food markets. *Food Outlook* 1. <http://www.fao.org/3/ca9509en/ca9509en.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020b). *Meat market review*. <http://www.fao.org/3/ca8819en/ca8819en.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022a). Biannual report on global food markets. *Food Outlook* 1. <https://www.fao.org/3/cb9427en/cb9427en.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022b). *Meat market review*. <https://www.fao.org/3/cc0984en/cc0984en.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (2015a). *Global action plan on antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>
- Organización Mundial de la Salud (2015b). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group*

- 2007-2015. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1)
- Organización Mundial de la Salud. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine* (6ª ed.).  
<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>
- Organización Mundial de la Salud, Organización Mundial de la Propiedad Intelectual y Organización Mundial del Comercio. (2016). *Antimicrobial resistance- A global epidemic*. WIPO-WHO-WTO/IP/GE/16/INF 2  
[http://www.wipo.int/edocs/mdocs/mdocs/en/wipo\\_who\\_wto\\_ip\\_ge\\_16/wipo\\_who\\_wto\\_ip\\_ge\\_16\\_inf\\_2.pdf](http://www.wipo.int/edocs/mdocs/mdocs/en/wipo_who_wto_ip_ge_16/wipo_who_wto_ip_ge_16_inf_2.pdf)
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2018). *OIE List of Antimicrobial Agents of Veterinary Importance*. <https://www.oie.int/app/uploads/2021/03/a-oie-list-antimicrobials-may2018.pdf>
- Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (2019). Antimicrobial resistance. Tackling the burden in the European Union. <https://www.oecd.org/health/health-systems/AMR-Tackling-the-Burden-in-the-EU-OECD-ECDC-Briefing-Note-2019.pdf>
- Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2018). *OECD-FAO Agricultural outlook 2018-2027*. OECD Publishing. [https://doi.org/10.1787/agr\\_outlook-2018-en](https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2018-en)
- Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2020). *OECD-FAO Agricultural outlook 2020-2029*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>
- Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2022). *OECD-FAO Agricultural outlook 2022-2031*. OECD Publishing. <https://doi.org/10.1787/f1b0b29c-en>

- Osman, E.A., El-Amin, N., Adrees, E.A.E., Al-Hassan, L. y Mukhtar, M. (2020). Comparing conventional, biochemical and genotypic methods for accurate identification of *Klebsiella pneumoniae* in Sudan. *Access Microbiology*, 2(3). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000096>
- O'Sullivan, M.G., Byrne, D.V., Martens, H., Gidskehaug, L.H., Andersen, H.J. y Martens, M. (2003). Evaluation of pork colour: Prediction of visual sensory quality of meat from instrumental and computer vision methods of colour analysis. *Meat Science*, 65(2), 909-918. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00298-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00298-X)
- O'Toole, G.A. y Wong, G.C.L. (2016). Sensational biofilms: Surface sensing in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.004>
- Pascual-Anderson, M.R. (1992). *Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas*. Díaz de Santos, Madrid.
- Pereira, M. y Malfeito-Ferreira, M. (2015). A simple method to evaluate the shelf life of refrigerated rabbit meat. *Food Control*, 49, 70-74. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.10.021>
- Pesavento, G., Ducci, B., Comodo, N. y Lo Nostro, A. (2007). Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Food Control*, 18(3), 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.09.013>
- Petrova, O.E. y Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersión. *Current Opinion in Microbiology*, 30, 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.01.004>
- Piedrahíta, M.L. (2001). Estafilococos y enterococos: ¿Amenazas a la salud pública? *Revista Universidad Pontificia Bolivariana*, 20(1), 49-59 <https://revistas.upb.edu.co/index.php/medicina/article/view/3385>
- Piercey, M.J., Hingston, P.A. y Hansen, L.T. (2016). Genes involved in *Listeria monocytogenes* biofilm formation at a simulated food processing plant

- temperature of 15 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 223, 63-74.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.009>
- Poeta, P., Costa, D., Igrejas, G., Rodrigues, J. y Torres, C. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). *Veterinary Microbiology*, 125(3-4), 368-374.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.06.003>
- Pohlman, F.W., Stivarius, M.R., McElyea, K.S., Johnson, Z.B. y Johnson, M.G. (2002a). The effects of ozone, chlorine dioxide, cetylpyridinium chloride and trisodium phosphate as multiple antimicrobial interventions on microbiological, instrumental color, and sensory color and odor characteristics of ground beef. *Meat Science*, 61(3), 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00198-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00198-X)
- Pohlman, F.W., Stivarius, M.R., McElyea, K.S. y Waldroup, A.L. (2002b). Reduction of *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, coliforms, aerobic bacteria, and improvement of ground beef color using trisodium phosphate or cetylpyridinium chloride before grinding. *Meat Science*, 60(4), 349-356. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00142-5)
- Potthast, K. (1987). Meat colour, colour stability and reddening. *Fleischwirtschaft*, 67(1), 50-55.
- Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, X., Qiu, S. y Song, H. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 483.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00483>
- Radhouani, H., Igrejas, G., Gonçalves, A., Pacheco, R., Monteiro, R., Sargo, R., Brito, F., Torres, C. y Poeta, P. (2013). Antimicrobial resistance and virulence genes in *Escherichia coli* and enterococci from red foxes (*Vulpes vulpes*). *Anaerobe*, 23, 82-86. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.013>
- Radimersky, T., Frolkova, P., Janoszowska, D., Dolejska, M., Svec, P., Roubalova, E., Cikova, P., Cizek, A. y Literak, I. (2010). Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia*

- coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *Journal of Applied Microbiology*, 109(5), 1.687-1.695. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04797.x>
- Rahman, U.U., Sahar, A., Pasha, I., Rahman, S.U., Sohaib, M., Ishaq, A., Chughtai, M.F.J. y Zafar, H. (2016). Augmenting quality and microbial safety of broiler meat at refrigeration storage by applying chemical interventions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(4), e13030. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13030>
- Rajkovic, A., Smigic, N. y Devlieghere, F. (2010). Contemporary strategies in combating microbial contamination in food chain. Review. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S29-S42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.019>
- Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M.L.E., Igrejas, G. y Poeta, P. (2020). Enterococci, from harmless bacteria to a pathogen. *Microorganisms*, 8(8), 1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081118>
- Ramsey, M., Hartke, A. y Huycke, M. (2014). The physiology and metabolism of enterococci. En M.S. Gilmore, D.B. Clewell, Y. Ike, N. Shankar (Eds.), *Enterococci: From commensals to leading causes of drug resistant infection*, Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190432/>
- Raphael, E. y Riley, L.W. (2017). Infections caused by antimicrobial drug-resistant saprophytic Gram-negative bacteria in the environment. *Frontiers in Medicine*, 4, 183. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00183>
- Rather, I.A., Kim, B.C., Bajpai, V.K. y Park, Y.H. (2017). Self-medication and antibiotic resistance: Crisis, current challenges, and prevention. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4), 808-812. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.01.004>
- Real Academia Española (2014). *Diccionario de la lengua española* (23ª ed.). Espasa Libros, Madrid. <http://www.rae.es>
- Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre de 2010, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. *Boletín Oficial del Estado*, 17, de 20 de enero de 2011, pp. 6.292-6.304. <https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2011-1011>

- Realini, C.E., Kallas, Z., Pérez-Juan, M., Gómez, I., Olleta, J.L., Beriain, M.J., Albertí, P. y Sañudo, C. (2014). Relative importance of cues underlying Spanish consumers' beef choice and segmentation, and consumer liking of beef enriched with *n*-3 and CLA fatty acids. *Food Quality and Preference*, 33, 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.11.007>
- Regan, Á., Henchion, M. y McIntyre, B. (2018). Ethical, moral and social dimensions in farm production practices: A segmentation study to assess Irish consumers' perceptions of meat quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 57(1), 9-14. <https://doi.org/10.1515/ijafr-2018-0002>
- Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 139, de 30 de abril de 2004, pp. 1-54. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0852-20090420>
- Reglamento (CE) nº 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 139, de 30 de abril de 2004, pp. 55-205. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02004R0853-20210101>
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, de 22 de diciembre de 2005, pp. 1-26. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02005R2073-20200308>
- Reglamento (CE) nº 543/2008 de la Comisión, de 16 de junio de 2008, por el que se establecen normas de desarrollo del Reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo en lo que atañe a la comercialización de carne de aves de corral. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 157, de 17 de junio de 2008, pp. 46-87. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02008R0543-20130701>

Reglamento (UE) nº 271/2010 de la Comisión, de 24 de marzo de 2010, que modifica el Reglamento (CE) nº 889/2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, en lo que atañe al logotipo de producción ecológica de la Unión Europea. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 84, de 31 de marzo de 2010, pp. 19-22. <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2010/271/oj/spa>

Reglamento (UE) nº 101/2013 de la Comisión, de 4 de febrero de 2013, relativo a la utilización de ácido láctico para reducir la contaminación de superficie de las canales de bovinos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 34, de 5 de febrero de 2013, pp. 1-3. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0101>

Reglamento de Ejecución (UE) 2019/627 de la Comisión, de 15 de marzo 2019, por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) nº 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 131, de 17 de mayo de 2019, pp. 51-100. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A02019R0627-20210101>

Renner, M. y Labas, R. (1987). Biochemical factors influencing metmyoglobin formation in beef muscles. *Meat Science*, 19(2), 151-165. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(87\)90020-9](https://doi.org/10.1016/0309-1740(87)90020-9)

Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J., Findlay, D., Gyssens, I., Heur, O.E., Kahlmeter, G., Kruse, H., Laxminarayan, R., Liébana, E., López-Cerero, L., MacGowan, A., Martins, M., Rodríguez-Baño, J., Rolain, J.M., ... Vila, J. (2015). The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. *New Microbes and New Infections*, 6, 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2015.02.007>

- Røder, H.L., Sørensen, S.J. y Burmølle, M. (2016). Review. Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start? *Trends in Microbiology*, 24(6), 503-513. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.019>
- Rodríguez-Calleja, J.M., García-López, I., García-López, M.L., Santos, J.A. y Otero, A. (2006). Rabbit meat as a source of bacterial foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 69(5), 1.106-1.112. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.5.1106>
- Rodríguez-Calleja, J.M., García-López, M.L., Santos, J.A. y Otero, A. (2005). Development of the aerobic spoilage flora of chilled rabbit meat. *Meat Science*, 70(2), 389-394. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.01.009>
- Rodríguez-Calleja, J.M., Santos, J.A., Otero, A. y García-López, M.L. (2004). Microbiological quality of rabbit meat. *Journal of Food Protection*, 67(5), 966-971. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.5.966>
- Rodríguez-Campos, D., Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2019). Persistent *Listeria monocytogenes* isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains. *Pathogens*, 8(4), 250. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2017). Lactic acid concentrations that reduce microbial load yet minimally impact colour and sensory characteristics of beef. *Meat Science*, 129, 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2017.01.007>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C. y 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>
- Rodríguez-Melcón, C., Riesco-Peláez, F., Carballo, J., García-Fernández, C., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2018). Structure and viability of 24- and 72-h-old biofilms formed by four pathogenic bacteria on polystyrene and glass contact surfaces. *Food Microbiology*, 76, 513-517. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.016>
- Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A. y Blázquez, J. (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of*

- Medical Microbiology*, 303(6-7), 293-297.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C. y Doming, K.J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1.791-1.804. <https://doi.org/10.3382/ps/pey539>
- Rouger, A., Tresse, O. y Zagorec, M. (2017). Bacterial contaminants of poultry meat: Sources, species, and dynamics. *Microorganisms*, 5(3), 50. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030050>
- Saha, S., Devi, K.M., Damrolien, S., Devi, K.S., Krossnunpuii y Sharma, K.T. (2018). Biofilm production and its correlation with antibiotic resistance pattern among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in north-East India. *International Journal of Advances in Medicine*, 5(4), 964-968. <https://doi.org/10.18203/2349-3933.ijam20183129>
- Samant, S.S., Crandall, P.G. y Seo, H.S. (2016). The effect of varying educational intervention on consumers' understanding and attitude toward sustainability and process-related labels found on chicken meat products. *Food Quality and Preference*, 48(A), 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.09.005>
- Samant, S.S. y Seo, H.S. (2016). Quality perception and acceptability of chicken breast meat labeled with sustainability claims vary as a function of consumers' label-understanding level. *Food Quality and Preference*, 49, 151-160. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2015.12.004>
- Santagati, M., Campanile, F. y Stefani, S. (2012). Genomic diversification of enterococci in hosts: The role of the mobilome. *Frontiers in microbiology*, 3(95), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00095>
- Santos, T., Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Micael, J., Rodrigues, T., Resendes, R., Gonçalves, A., Marinho, C., Gonçalves, D., Cunha, R. y Poeta, P. (2013). Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from

- wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*, 24, 25-31.  
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.09.004>
- Sarjit, A. y Dykes, G.A. (2015). Trisodium phosphate and sodium hypochlorite are more effective as antimicrobials against *Campylobacter* and *Salmonella* on duck as compared to chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 203, 63-69.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.026>
- Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, Rg., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S. y O'Brien, A.D. (2012). Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(9), 2.951-2.963. <https://doi.org/10.1128/JCM.00860-12>
- Schleifer, K.H. y Kilpper-Bälz, R. (1987). Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci and lactococci: A review. *Systematic and Applied Microbiology*, 10(1), 1-19. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(87\)80002-4](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(87)80002-4)
- Selgas, D., Marín, M.L., Pin, C. y Casas, C. (1993). Attachment of bacteria to meat surfaces: A review. *Meat Science*, 34(3), 265-273. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90076-T](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90076-T)
- Servicio de Seguridad e Inspección Alimentaria (1996). *Directiva 6355.1. Use of Chlorine Dioxide in Poultry Chill Water*. Departamento de Agricultura de EE.UU.  
<http://www.aamp.com/Directive7120-1-Amendment6.pdf.pdf>
- Silva, N., Igrejas, G., Figueiredo, N., Gonçalves, A., Radhouani, H., Rodrigues, J. y Poeta, P. (2010). Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Science of the Total Environment*, 408(20), 4.871-4.876.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.06.046>
- Simões, M., Simões, L. y Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.12.008>

- Singh, P., Lee, H.C., Silva, M.F., Chin, K.B. y Kang, I. (2017). Trisodium phosphate dip, hot water dip, and combination dip with/ without brushing on broiler carcass decontamination. *Food Control*, 77, 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.015>
- Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos. (2018). *The Rapid Alert System for Food and Feed- 2017 annual report*. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f4adf22f-4f7c-11e9-a8ed-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-174743070>
- Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos. (2019). *The Rapid Alert System for Food and Feed- 2018 annual report*. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/c3318331-d9c4-11e9-9c4e-01aa75ed71a1/language-en/format-PDF/source-174743070>
- Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos. (2021). *The Rapid Alert System for Food and Feed- 2020 annual report*. [https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-08/rasff\\_pub\\_annual-report\\_2020.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2021-08/rasff_pub_annual-report_2020.pdf)
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (2018). *Nota de prensa: Más de 35.000 personas mueren cada año con infecciones causadas por bacterias multirresistentes*. [https://seimc.org/contenidos/noticias/2018/seimc-nt-180517-Presentacion del registro de pacientes BMR SEIMC.pdf](https://seimc.org/contenidos/noticias/2018/seimc-nt-180517-Presentacion_del_registro_de_pacientes_BMR_SEIMC.pdf)
- Solano, C., Echeverz, M. y Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and *quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.02.008>
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. y De Keersmaecker, S.C.J. (2012). *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*, 45(2), 502-531. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.01.038>
- Steenkamp, J.-B.E.M. (1990). Conceptual model of the quality perception process. *Journal of Business Research*, 21(4), 309-333. [https://doi.org/10.1016/0148-2963\(90\)90019-A](https://doi.org/10.1016/0148-2963(90)90019-A)

- Stiles, M.E. y Ng, L.K. (1981). Enterobacteriaceae associated with meats and meat handling. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(4), 867-872. <https://doi.org/10.1128/aem.41.4.867-872.1981>
- Švec, P., Vancanneyt, M., Sedláček, I., Naser, S.M., Snauwaert, C., Lefebvre, K., Hoste, B. y Swings, J. (2006). *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(3), 577-581. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63937-0>
- Tacconelli, E., Sifakis, F., Harbarth, S., Schrijver, R., van Mourik, M., Voss, A., Sharland, M., Rajendran, N.B. y Rodríguez-Baño, J. (2018). Surveillance for control of antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), E99-E106. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30485-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30485-1)
- Talebi, M., Sadeghi, J., Rahimi, F. y Pourshafie, M.R. (2015). Isolation and biochemical fingerprinting of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from meat, chicken and cheese. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(4), e15815. [https://doi.org/10.5812/jjm.8\(4\)2015.15815](https://doi.org/10.5812/jjm.8(4)2015.15815)
- Tang, K.L., Caffrey, N.P., Nóbrega, D.B., Cork, S.C., Ronksley, P.E., Barkema, H.W., Polachek, A.J., Ganshorn, H., Sharma, N., Kellner, J.D. y Ghali, W.A. (2017). Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Health*, 1(8), 316-327. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(17\)30141-9](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(17)30141-9)
- Tapp III, W.N., Yancey, J.W.S. y Apple, J.K. (2011). How is the instrumental color of meat measured? *Meat Science*, 89(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.021>
- Teixeira, L.M., Siqueira Carvalho, M.G. y Facklam, R.R. (2007). *Enterococcus*. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry y M.A. Pfaller (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (9ª ed., pp. 430-442). American Society of Microbiology Press, Washington D.C.

- Telligman, A.L., Worosz, M.R. y Bratcher, C.L. (2017). "Local" as an indicator of beef quality: An exploratory study of rural consumers in the southern U.S. *Food Quality and Preference*, 57, 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2016.11.001>
- Teuber, M. (2001). Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), 493-499. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00241-1](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00241-1)
- Thian, T.S. y Hartman, P.A. (1981). Gentamicin-thallos-carbonate medium for isolation of fecal streptococci from foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3), 724-728. <https://doi.org/10.1128/aem.41.3.724-728.1981>
- Troy, D.J. y Kerry, J.P. (2010). Consumer perception and the role of science in the meat industry. *Meat Science*, 86(1), 214-226. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.05.009>
- Tsuneda, S., Aikawa, H., Hayashi, H., Yuasa, A. e Hirata, A. (2003). Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiology Letters*, 223(1), 287-292. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00399-9)
- Tůmová, E., Bízková, Z., Skřivanová, V., Chodová, D., Martinec, M. y Volek, Z. (2014). Comparisons of carcass and meat quality among rabbit breeds of different sizes, and hybrid rabbits. *Livestock Science*, 165, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.04.019>
- Turan, N.B., Chormey, D.S., Büyükpınar, Ç., Engin, G.O. y Bakirdere, S. (2017). Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *Trends in Analytical Chemistry*, 91, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.007>
- Uyttendaele, M., Jacxsens, L., De Loy-Hendrickx, A., Devlieghere, F. y Debevere, J. (2010). *Microbiologische Richtwaarden & Wettelijke Microbiologische Criteria*. Departamento de Seguridad y Calidad Alimentaria, Universidad de Ghent. <https://biblio.ugent.be/publication/1169787>
- Van Loo, E., Caputo, V., Nayga Jr., R.M., Meullenet, J.F., Crandall, P.G. y Ricke, S.C. (2010). Effect of organic poultry purchase frequency on consumer attitudes toward organic

- poultry meat. *Journal of Food Science*, 75(7), S384-S397. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01775.x>
- Van Loo, E.J., Caputo, V., Nayga Jr., R.M. y Verbeke, W. (2014). Consumers' valuation of sustainability labels on meat. *Food Policy*, 49(1), 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.foodpol.2014.07.002>
- Verbeke, W., Pérez-Cueto, F.J.A., de Barcellos, M.D., Krystallis, A. y Grunert, K.G. (2010a). European citizen and consumer attitudes and preferences regarding beef and pork. *Meat Science*, 84(2), 284-292. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.05.001>
- Verbeke, W., Wezemaal, L.V., de Barcellos, M.D., Kügler, J.O., Hocquette, J.F., Ueland, Ø. y Grunert, K.G. (2010b). European beef consumers' interest in a beef eating-quality guarantee insights from a qualitative study in four EU countries. *Appetite*, 54(2), 289-296. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2009.11.013>
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R. y Kolter, R. (2008). Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Development*, 22(7), 945-953. <https://doi.org/10.1101/gad.1645008>
- Wang, H., Cai, L., Li, Y., Xu, X. y Zhou, G. (2018). Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control*, 91, 397-403. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.035>
- Wang, H., Wu, N., Jiang, Y., Ye, K., Xu, X. y Zhou, G. (2016). Response of long-term acid stress to biofilm formation of meat-related *Salmonella* Enteritidis. *Food Control*, 69, 214-220. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.055>
- Wanger, A. (2007). *Yersinia*. En P.R. Murray, E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.L. Landry y M.A. Tenover (Eds.), *Manual of clinical microbiology* (9ª ed., pp. 688-697). American Society of Microbiology Press, Washington D.C.
- Werner, G., Coque, T.M., Franz, C.M.A.P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W. y Weaver, K. (2013). Antibiotic resistant enterococci- tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 360-379. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.03.001>

- Whitehead, K.A. y 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>
- Wong, T., Whyte, R.J., Cornelius, A.J. y Hudson, J.A. (2004). Enumeration of *Campylobacter* and *Salmonella* on chicken packs. *British Food Journal*, 106(9), 651-662. <https://doi.org/10.1108/00070700410558184>
- Wu, L. (2022). Rabbit meat trade of major countries: regional pattern and driving forces. *World Rabbit Science*, 30(1), 69-82. <https://doi.org/10.4995/wrs.2022.13390>
- Yang, X., Wang, H., He, A. y Tran, F. (2018). Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient *Escherichia coli* isolated from meat fabrication equipment. *Food Control*, 90, 205-211. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.02.050>
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Pamuk, S. y Ertas, N. (2011). Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Research International*, 44(3), 725-728. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.040>
- Zadernowska, A., Chajęcka-Wierzchowska, W. y Zakrzewski, A. (2017). Prevalence and biofilm forming ability of *Listeria monocytogenes* isolated from meat. En P. Hájek, O. Vít, P. Bašová, M. Krijt, H. Paszeková, O. Součková y R. Mudřík (Eds.), *CBU International Conference on Innovations in Science and Education 2017* (Vol. 5, pp. 1.104-1.107). Central Bohemia University. <https://doi.org/10.12955/cbup.v5.1078>
- Zaman, S.B., Hussain, M.A., Nye, R., Mehta, V., Mamun, K.T. y Hossain, N. (2017). A review on antibiotic resistance: Alarm bells are ringing. *Cureus*, 9(6), e1403. <https://doi.org/10.7759/cureus.1403>
- Zigo, F., Takac, L., Zigova, M., Takacova, J. y Vasi, M. (2017). Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in carrier pigeons during the race season. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 10, 10-13. [https://pigeonracingwebshop.com/content/literature/diseases/infectious\\_disease\\_s/other\\_bacterial\\_infections/Ab\\_resistant\\_bacterial\\_strains.pdf](https://pigeonracingwebshop.com/content/literature/diseases/infectious_disease_s/other_bacterial_infections/Ab_resistant_bacterial_strains.pdf)

Zwe, Y.H., Tang, V.C.Y., Aung, K.T., Gutiérrez, R.A., Ng, L.C. y Yuk, H.G. (2018). Prevalence, sequence types, antibiotic resistance and, *gyrA* mutations of *Salmonella* isolated from retail fresh chicken meat in Singapore. *Food Control*, 90, 233-240.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.004>





**ANEXO I**

PUBLICACIONES



Capita, R., Castaño-Arriba, A., Rodríguez-Melcón, C., Igrejas, G., Poeta, P. y Alonso-Calleja, C. (2020). Diversity, antibiotic resistance, and biofilm-forming ability of Enterobacteria isolated from red meat and poultry preparations. *Microorganisms*, 8(8), 1226.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms808122>

6. Q2 en 2020 (JCR-WOS).

## ABSTRACT

A total of 44 samples of beef, pork, and poultry preparations were tested. Average counts (log cfu/g) of enterobacteria were  $1.99 \pm 0.99$  (beef preparations),  $1.96 \pm 1.44$  (pork),  $2.09 \pm 0.92$  (chicken), and  $2.17 \pm 1.06$  (turkey) ( $P > 0.05$ ). Two hundred enterobacterial strains were identified and 13 genera (21 species) were distinguished, including species that are a significant cause of infection. The most common genera were *Escherichia* (32.5% of strains), *Serratia* (17.0%), *Hafnia* (12.5%), and *Salmonella* (12.0%). Isolates were screened by disc diffusion for susceptibility to 15 antibiotics. A total of 126 strains (63% of the isolates) were multiresistant (having resistance to two or more antibiotics), 46 (23%) were resistant to one antibiotic, and 28 (14%) were sensitive to all antibiotics. The average number of resistances per strain was  $2.53 \pm 2.05$ . A higher ( $P < 0.05$ ) average number of resistances was observed in strains from turkey ( $3.14 \pm 2.55$ ) than in strains from beef ( $2.15 \pm 1.22$ ), pork ( $2.16 \pm 1.39$ ), or chicken ( $2.44 \pm 2.22$ ). At least 50% of strains showed resistance or reduced susceptibility to ampicillin, cefotaxime, ceftazidime, or streptomycin, considered to be “critically important” antimicrobial agents in human medicine. Seventy-nine strains (39.5%), 60 strains (30.0%), and 46 strains (23.0%) were weak, moderate, and strong biofilm producers (crystal violet assay), respectively. This investigation provides evidence that bacteria from red meat and poultry preparations pose major potential risk to consumers.

## RESUMEN

Se analizaron un total de 44 muestras de preparados cárnicos crudos de carne de vacuno, cerdo y aves. Los recuentos medios (log ufc/g) de enterobacterias fueron  $1,99 \pm 0,99$  (preparados de carne de vacuno),  $1,96 \pm 1,44$  (cerdo),  $2,09 \pm 0,92$  (pollo) y  $2,17 \pm 1,06$  (pavo) ( $P > 0,05$ ). Se identificaron 200 cepas de enterobacterias y se distinguieron 13 géneros (21 especies), incluidas especies que son una causa importante de toxiinfección alimentaria. Los géneros más comunes fueron *Escherichia* (32,5% de las cepas), *Serratia* (17,0%), *Hafnia* (12,5%) y *Salmonella* (12,0%). Los aislamientos se examinaron mediante difusión en disco para determinar la susceptibilidad a 15 antibióticos. Un total de 126 cepas (63% de los aislados)

fueron multirresistentes (resistencia a dos o más antibióticos), 46 (23%) resistentes a un antibiótico y 28 (14%) sensibles a todos los antibióticos. El valor medio de resistencias por cepa fue de  $2,53 \pm 2,05$ . Se observó un mayor número medio de resistencias ( $P < 0,05$ ) en cepas de pavo ( $3,14 \pm 2,55$ ) que en cepas de vacuno ( $2,15 \pm 1,22$ ), cerdo ( $2,16 \pm 1,39$ ) o pollo ( $2,44 \pm 2,22$ ). Al menos el 50 % de las cepas mostró resistencia o sensibilidad reducida a la ampicilina, la cefotaxima, la ceftazidima o la estreptomina, considerados agentes antimicrobianos de "importancia crítica" en la medicina humana. Setenta y nueve cepas (39,5%), 60 cepas (30,0%) y 46 cepas (23,0%) fueron productores de biofilms o biopelículas débiles, moderados y fuertes (ensayo de cristal violeta), respectivamente. Esta investigación proporciona evidencia de que las bacterias presentes en los preparados cárnicos de carnes rojas y aves representan un riesgo potencial importante para los consumidores.

Castaño-Arriba, A., González-Machado, C., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2020). Antibiotic resistance and biofilm-forming ability in Enterococcal isolates from red meat and poultry preparations. *Pathogens*, 9(12), 1021. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121021>. Q2 en 2020 (JCR-WOS).

## **ABSTRACT**

This study investigated the resistance to antibiotics and the capacity to form a biofilm of 200 isolates of enterococci isolated from raw preparations of beef (51 strains), pork (47), chicken (50), and turkey (52) acquired in north-western Spain. Fifteen antimicrobials of clinical importance were tested by the disc diffusion method. The average number of resistances per strain was  $4.48 \pm 1.59$ . If resistant strains were taken together with those showing reduced susceptibility, the total number of resistances per strain was  $6.97 \pm 2.02$ . Two isolates (1.0% of strains) were resistant to a single antibiotic, twenty-two isolates (11.0%) presented resistance to two, one strain (0.5%) was resistant to three, and 175 isolates (87.5%) showed a multiple drug-resistant phenotype (MDR; defined as no susceptibility to at least one agent from each of three or more antimicrobial categories). The prevalence of resistance varied between 0.5% (gentamicin) and 100% (kanamycin). All strains produced biofilm on polystyrene microwell plates, determined using crystal violet assay. Isolates were classified as having a weak (51 strains; average optical density at 580 nanometers ( $OD_{580}$ ) =  $0.206 \pm 0.033$ ), moderate (78 strains; average  $OD_{580}$  =  $0.374 \pm 0.068$ ), or strong (71 strains; average  $OD_{580}$  =  $1.167 \pm 0.621$ ) ability to produce biofilm ( $P < 0.05$ ). Isolates from beef preparations produced the most substantial ( $P < 0.05$ ) biofilms. The results of this study indicate that meat and poultry preparations are major reservoirs of antibiotic-resistant enterococcal strains capable of forming a biofilm. In order for food-borne infections to be prevented, the importance of careful handling of these foodstuffs during preparation, avoiding cross-contamination, and ensuring thorough cooking, is stressed.

## **RESUMEN**

En este estudio se ha investigado la resistencia a los antibióticos y la capacidad de formación de biofilms o biopelículas en 200 aislamientos o cepas de enterococos aislados de carne y preparados cárnicos crudos de vacuno (51 cepas), cerdo (47), pollo (50) y pavo (52) adquiridos en el noroeste de España. La resistencia a quince antimicrobianos de importancia clínica se ha determinado por el método de difusión en disco. El valor medio de resistencias por cepa fue de  $4,48 \pm 1,59$ . Si se

juntan los datos de las cepas resistentes con las que mostraban susceptibilidad reducida, el número total de resistencias por cepa era de  $6,97 \pm 2,02$ . Dos aislamientos (1,0% de las cepas) fueron resistentes a un solo antibiótico, veintidós aislamientos (11,0%) presentaron resistencia a dos, una cepa (0,5%) fue resistente a tres y 175 aislamientos (87,5%) mostraron resistencia a múltiples fármacos -fenotipo resistente- (MDR; definido como ausencia de susceptibilidad al menos a un agente de cada una de tres o más categorías de antimicrobianos). La prevalencia de resistencia varió entre 0,5% (gentamicina) y 100% (kanamicina). Todas las cepas produjeron biopelícula en placas de microtítulo de poliestireno, determinadas mediante el ensayo de cristal violeta. Los aislamientos se clasificaron como débiles (51 cepas; densidad óptica promedio a 580 nanómetros ( $OD_{580}$ ) =  $0,206 \pm 0,033$ ), moderadas (78 cepas; promedio  $OD_{580}$  =  $0,374 \pm 0,068$ ) o fuertes (71 cepas; promedio  $OD_{580}$  =  $1,167 \pm 0,621$ ) capacidad de producir biofilm ( $P < 0,05$ ). Los aislamientos procedentes de preparados cárnicos de vacuno produjeron las biopelículas más importantes ( $P < 0,05$ ). Los resultados de este estudio indican que los preparados cárnicos de carne de mamíferos y los preparados cárnicos de origen avícola son importantes reservorios de cepas de enterococos resistentes a los antibióticos capaces de formar una biopelícula o biofilm. Para prevenir las infecciones transmitidas por los alimentos, se destaca la importancia del manejo cuidadoso de estos alimentos durante la preparación, evitando la contaminación cruzada y asegurando un cocinado (tratamiento térmico) completo.