



**UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Escherichia
coli* y *Enterococcus* spp. DE ORIGEN ALIMENTARIO”**

Memoria que presenta la Licenciada en Veterinaria

Emilia Guerrero Ramos

para optar al Grado de Doctora por la Universidad de León

Programa de Doctorado Interuniversitario con Mención de Calidad “Estrategias para la mejora y
control de calidad de los alimentos de origen animal”

Dirigida por:

Dra. Rosa Capita González

Profesora Titular del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

Dr. Carlos Alonso Calleja

Profesor Titular del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

León, Noviembre de 2015



**UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE *Escherichia
coli* y *Enterococcus* spp. DE ORIGEN ALIMENTARIO”**

“Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance
in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. strains of food origin”

Emilia Guerrero Ramos

León, Noviembre de 2015

El trabajo recogido en la presente Memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en la Universidad de León y ha sido subvencionado por el Ministerio de Educación (Proyecto PR2010-0603), el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2011-29645) y la Junta de Castilla y León (Proyecto LE13A10-2).

"Y, al principio, todo fue curiosidad"

Isaac Asimov (1920-1992).

AGRADECIMIENTOS

Este Estudio lleva mi nombre pero no hubiera sido posible sin la colaboración de un gran equipo de personas a las que expreso mi sincero agradecimiento.

En primer lugar a la Dra. Dña. Rosa Capita González y al Dr. D. Carlos Alonso Calleja por haber dirigido este trabajo con tanta generosidad, rigor y seriedad. Agradezco su confianza, su tiempo precioso, su capacidad de trabajo, su inestimable apoyo y, por supuesto, su delicadísimo sentido del humor. Gracias por haber permitido que este sueño se cumpliera, por ser mis profesores, consejeros y amigos.

A mis compañeros del Laboratorio de Control Microbiológico en las Industrias Alimentarias y del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL) de la Universidad de León, por haber compartido conmigo tantos fines de semana entre tubos de ensayo.

A la Dra. Patrícia Poeta y al Dr. Gilberto Igrejas, de la Universidad de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real, Portugal), por la cesión de algunas cepas con genes de resistencia a antibióticos, utilizadas como controles positivos en el presente Trabajo.

A Luis Miguel Guerrero, por estar ahí cuando surgía cualquier problema con la informática, cualquier error crítico, siempre dispuesto a ayudarme, gracias por el apoyo práctico y moral.

A Javier Guerrero, por su colaboración en el diseño de la portada y sus magníficas fotografías científicas.

A Celedonio Núñez, que ha compartido mis inquietudes; nunca hubiera empezado este proyecto si él no me hubiese animado. Al final la semilla sembrada, contra todo pronóstico, logró germinar.

A Emilio Sánchez, Jefe de la Sección de Higiene de los Alimentos y Sanidad Ambiental (HASA) del Servicio Territorial de Sanidad y Bienestar Social de Valladolid y a Margarita Díez, Técnico de la Sección HASA, compañeros de trabajo y amigos, gracias por su paciencia, sensibilidad y valiosos comentarios.

Finalmente, a mis compañeros de los Servicios Veterinarios Oficiales de Salud Pública, por lo que me han enseñado y lo que me han obligado a aprender. Quiero destacar a dos de ellos, también amigos, María Jesús Casasola e Ignacio Flórez, gracias por sus ánimos y apoyo.

A mis padres, Francisco y Remedios, por su amor y su apoyo
incondicionales.

A Enrique, Rodrigo y Alberto.

RESUMEN

RESUMEN

OBJETIVO 1. Determinar si la exposición de *Escherichia coli* ATCC 12806 a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico, nitrito sódico o hipoclorito sódico provoca la adaptación de la cepa y si esta adaptación se asocia con protección cruzada a otros biocidas.

OBJETIVO 2. Conocer el papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular en la adaptación de *E. coli* ATCC 12806 al fosfato trisódico, nitrito sódico e hipoclorito sódico.

Se estimó la adaptación a lo largo del tiempo mediante los parámetros de crecimiento (ecuación de Gompertz modificada): fase de latencia, ritmo máximo de crecimiento y densidad celular en la fase estacionaria. Se pretendió asimismo determinar si las bombas de expulsión (en presencia del inhibidor carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona -CCCP-) y los cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular (ensayo de adhesión microbiana a solventes -MATS-) están asociados con esta adaptación. Las células de *Escherichia coli* se examinaron antes y después de la adaptación (fosfato trisódico -FTS-, nitrito sódico -NS-, hipoclorito sódico -HIP-, sin compuesto -NC-), en ausencia y en presencia de los biocidas (FTS, NS, HIP, NC). Por lo tanto, se ensayaron 16 combinaciones de diferentes condiciones (adaptación y exposición). Después de repetidos pases en medios de cultivo estáticos que contenían concentraciones crecientes subinhibitorias de FTS, NS o HIP, *E. coli* mostró una tolerancia adaptativa, especialmente al NS y al HIP. El aumento de la tolerancia era estable y se mantuvo después de 7 pasos sucesivos en un medio de cultivo libre de biocidas. Se observó adaptación cruzada entre diferentes biocidas (NS e HIP). Tanto las bombas de expulsión como los cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular parecen estar asociados con la adaptación al NS y al HIP. Se sugiere que la exposición a dosis subletales de biocidas de uso en la Industria Alimentaria representa un riesgo de desarrollo de adaptación y adaptación cruzada a dichos compuestos. Hay que señalar, sin embargo, que estos datos derivan de ensayos de laboratorio, por lo que la extracción de conclusiones sólidas debe ir precedida por experimentos realizados en condiciones reales.

OBJETIVO 3. Conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

OBJETIVO 4. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

En este trabajo se utilizaron un total de 55 aislamientos de *Enterococcus* (45 *E. faecium*, 7 *E. faecalis* y tres *E. durans*) procedentes de carne de caza silvestre (corzo, jabalí,

RESUMEN

conejo de monte, faisán y paloma) en el noroeste de España. Se determinó la susceptibilidad de las cepas frente a un panel de 14 antimicrobianos de importancia clínica utilizando la técnica de difusión por disco. Todas las cepas presentaron un fenotipo de multi-resistencia (resistencia a entre tres y 10 antimicrobianos). Las cepas exhibieron elevados porcentajes de resistencia a eritromicina (89,1%), tetraciclina (67,3%), ciprofloxacina (92,7%), nitrofurantoína (67,3%) y quinupristina-dalfopristina (81,8%). Los valores más bajos (9,1%) se observaron para la resistencia de alto nivel a gentamicina, kanamicina y estreptomicina. El número medio de resistencias por cepa fue de 5,8 en el caso de las cepas de *E. faecium*, 7,9 para *E. faecalis* y 5,7 para *E. durans*. Se estudiaron los genes de resistencia a antibióticos y de virulencia utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un total de 15 (57,7%) de las 26 cepas resistentes a la vancomicina presentaban el gen *vanA*. Otros genes de resistencia detectados fueron *vanB*, *erm(B)* y/o *erm(C)*, *tet(L)* y/o *tet(M)*, *acc(6')-aph(2")* y *aph(3')-IIIa* en las cepas resistentes a vancomicina, eritromicina, tetraciclina, gentamicina y kanamicina, respectivamente. Se detectaron los genes específicos del transposon Tn5397 en el 54,8% de los enterococos positivos para el gen *tet(M)*. Se estudiaron nueve factores de virulencia (*gelE*, *agg*, *ace*, *cpd*, *frs*, *esp*, *hyl*, *efaAfs* y *efaAfm*), detectándose todos ellos con la excepción del gen *frs*. Se encontró al menos un gen de virulencia en el 20,0% de las cepas de *E. faecium*, 71,4% de *E. faecalis* y 33,3% de *E. durans*, siendo los genes *ace* y *cpd* los más frecuentes (6 aislamientos cada uno). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la carne de caza silvestre podría jugar un papel en la diseminación a lo largo de la cadena alimentaria de enterococos con genes de resistencia y de virulencia.

OBJETIVO 5. Conocer la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE) en preparados de carne de ave, cerdo y vacuno del noroeste de España.

OBJETIVO 6. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en aislamientos de VRE de preparados cárnicos en el noroeste de España y conocer la capacidad de las cepas para formar *biofilm*.

OBJETIVO 7. Estudiar la diversidad genética de las cepas de VRE aisladas mediante su ribotipado.

Se examinaron 160 muestras de preparados de carne de ave (80), cerdo (40) y vacuno (40) (salchichas rojas, salchichas blancas, hamburguesas, albóndigas, *nuggets*, carne picada, escalope y crepes) procedentes de establecimientos de venta al público del noroeste de España para conocer la prevalencia de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE). Se detectaron cepas de VRE en 38 (23,8%) muestras (37,5% de ave, 15,0% de cerdo y 5,0% de vacuno, respectivamente). Se utilizó

una cepa de cada muestra positiva para su posterior caracterización. Los aislamientos se identificaron como *Enterococcus faecium* (14 cepas), *E. durans* (10), *E. hirae* (7), *E. gallinarum* (5) y *E. casseliflavus/E. flavesiens* (dos). Todas las cepas mostraron resistencia o susceptibilidad intermedia a tres o más antibióticos de importancia clínica, además de a la vancomicina. Se observaron elevadas tasas de resistencia o susceptibilidad intermedia para la teicoplanina (81,6% de los aislamientos), cloranfenicol (81,6%), eritromicina (100%), quinupristina-dalfopristina (89,5%) y ciprofloxacina (81,6%). Se encontraron niveles moderados de resistencia o susceptibilidad intermedia a ampicilina (34,2%) y tetraciclina (36,8%). Se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para estudiar los genes de resistencia a antibióticos y los factores de virulencia. Los genes *vanA*, *vanB*, *vanC-1* y *vanC-2/vanC-3* se identificaron en 27, uno, 5 y dos aislamientos, respectivamente. Otros genes de resistencia o transposones encontrados fueron *catA* (cloranfenicol), *tet(L)*, *tet(M)*, *Tn5397* (tetraciclina), *erm(A)*, *erm(B)* (eritromicina), *vat(D)* y *vat(E)* (quinupristina-dalfopristina). La mayoría de los aislamientos carecían de determinantes de virulencia (los genes *agg*, *hyl* y *efaAfm* se detectaron en una, una y 5 cepas, respectivamente). Las cepas se clasificaron como no productoras (4 aislamientos) o débiles productoras (34 aislamientos) de *biofilm* (ensayo con cristal violeta). El análisis de *cluster* (ribotipado, *EcoRI*) puso de manifiesto una fuerte relación genética entre cepas procedentes de diferentes tipos de preparados cárnicos, especies animales y establecimientos de venta. Este estudio sugiere que los preparados cárnicos podrían jugar un importante papel en la transmisión al hombre de VRE con diferentes genes de resistencia y de virulencia.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1. ANTIMICROBIANOS USADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA	3
1.1. BIOCIDAS	3
1.1.1. Definición e importancia	3
1.1.2. Adaptación bacteriana a los biocidas: causas	7
1.1.3. Adaptación bacteriana a los biocidas: consecuencias.....	8
1.1.4. Biocidas de uso alimentario: fosfato trisódico (FTS), nitrito sódico (NS) e hipoclorito sódico (HIP).....	9
1.2. ANTIBIÓTICOS	13
1.2.1. Definición y mecanismos de acción.....	13
1.2.2. Mecanismos de resistencia a antibióticos.....	14
1.2.3. Resistencia intrínseca	19
1.2.4. Resistencia adquirida	20
1.2.5. Causas de la resistencia a antibióticos.....	24
1.2.6. Consecuencias de la resistencia a antibióticos	27
1.2.7. Tendencias de la resistencia a antibióticos	29
2. INTERÉS DEL ESTUDIO DE <i>Escherichia coli</i> Y <i>Enterococcus</i> spp. EN EL ESCENARIO DE LA ADQUISICIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD REDUCIDA A LOS ANTIMICROBIANOS	33
3. CARNE Y PREPARADOS CÁRNICOS.....	35
3.1. PRINCIPALES DEFINICIONES.....	35
3.2. PRODUCCIÓN DE CARNE.....	36
3.3. CONSUMO DE CARNE	40
3.4. PRINCIPAL NORMATIVA APLICABLE EN CARNE Y PREPARADOS CÁRNICOS.....	46
3.4.1. Normativa europea de aplicación directa.....	46
3.4.2. Normativa estatal.....	47
4. CARNE DE CAZA.....	49
4.1. CALIDAD DE LA CARNE DE CAZA.....	50
4.1.1. Composición nutricional de la carne de caza	50

Índice General

4.1.2. <i>Calidad higiénico-sanitaria de la carne de caza</i>	51
4.2. CONSUMO Y COMERCIALIZACIÓN DE LA CARNE DE CAZA	52
4.2.1. <i>El sector de la carne de caza en España</i>	54
4.2.2. <i>Perspectivas de futuro.....</i>	58
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	61
1. ADAPTACIÓN Y ADAPTACIÓN CRUZADA DE <i>Escherichia coli</i> A DIFERENTES BIOCIDAS DE USO ALIMENTARIO.....	63
2. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y VIRULENCIA EN ENTEROCOCOS PROCEDENTES DE CARNE DE CAZA.....	66
3. PREVALENCIA, RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE ENTEROCOCOS RESISTENTES A LA VANCOMICINA EN PREPARADOS CÁRNICOS.....	68
4. OBJETIVOS	71
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
OBJETIVO 1. DETERMINAR SI LA EXPOSICIÓN DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 A CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE FOSFATO TRISÓDICO, NITRITO SÓDICO O HIPOCLORITO SÓDICO PROVOCA LA ADAPTACIÓN DE LA CEPA Y SI ESTA ADAPTACIÓN SE ASOCIA CON PROTECCIÓN CRUZADA A OTROS BIOCIDAS	75
1.1. CEPA DE <i>Escherichia coli</i> Y CONDICIONES DE CULTIVO	75
1.2. BIOCIDAS	75
1.3. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS	75
1.4. EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE BIOCIDAS	76
1.5. ESTABILIDAD DE LA ADAPTACIÓN.....	77
1.6. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	77
1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	78
OBJETIVO 2. CONOCER EL PAPEL DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LOS CAMBIOS DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR EN LA ADAPTACIÓN DE <i>E. coli</i> ATCC 12806 AL FOSFATO TRISÓDICO, NITRITO SÓDICO E HIPOCLORITO SÓDICO	78
2.1. INHIBICIÓN DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN CON CCCP	78
2.2. DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR	78
2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	79

OBJETIVO 3. CONOCER LA PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. AISLADAS DE CARNE DE CAZA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA	79
3.1. MUESTRAS Y CEPAS	79
3.2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	82
OBJETIVO 4. DETERMINAR LA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA Y DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. AISLADAS DE CARNE DE CAZA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA	83
4.1. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	83
4.2. DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA	83
OBJETIVO 5. CONOCER LA PREVALENCIA Y LOS PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE ENTEROCOCOS RESISTENTES A LA VANCOMICINA (<i>vancomycin-resistant enterococci</i>, VRE) EN PREPARADOS DE CARNE DE AVE, CERDO Y VACUNO DEL NOROESTE DE ESPAÑA.....	85
5.1. TOMA DE MUESTRAS	85
5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	85
5.3. RIBOTIPIA	86
5.4. IDENTIFICACIÓN POR PCR	86
5.5. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	87
OBJETIVO 6. DETERMINAR LA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA Y DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS DE VRE DE PREPARADOS CÁRNICOS EN EL NOROESTE DE ESPAÑA Y CONOCER LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS PARA FORMAR <i>BIOFILM</i>	88
6.1. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	88
6.2. DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA	88
6.3. FORMACIÓN DE <i>BIOFILM</i>	89
OBJETIVO 7. ESTUDIAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS CEPAS DE VRE AISLADAS MEDIANTE SU RIBOTIPADO.....	90
7.1. RIBOTIPIA	90
RESULTADOS	91
OBJETIVO 1. DETERMINAR SI LA EXPOSICIÓN DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 A CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE FOSFATO TRISÓDICO, NITRITO SÓDICO O HIPOCLORITO SÓDICO PROVOCAN LA ADAPTACIÓN DE LA CEPA Y SI ESTA ADAPTACIÓN SE ASOCIA CON PROTECCIÓN CRUZADA A OTROS BIOCIDAS	93
1.1. ADAPTACIÓN Y ADAPTACIÓN CRUZADA	93

Índice General

OBJETIVO 2. CONOCER EL PAPEL DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LOS CAMBIOS DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR EN LA ADAPTACIÓN DE <i>E. coli</i> ATCC 12806 AL FOSFATO TRISÓDICO, NITRITO SÓDICO E HIPOCLORITO SÓDICO	99
2.1. MODIFICACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR DESPUÉS DE LA ADAPTACIÓN	99
OBJETIVO 3. CONOCER LA PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. AISLADAS DE CARNE DE CAZA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA.....	101
3.1. ESPECIES DE <i>Enterococcus</i>	101
3.2. PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA	101
OBJETIVO 4. DETERMINAR LA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA Y DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. AISLADAS DE CARNE DE CAZA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA	104
4.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	104
4.2. GENES DE VIRULENCIA.....	106
OBJETIVO 5. CONOCER LA PREVALENCIA Y LOS PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE ENTEROCOCOS RESISTENTES A LA VANCOMICINA (<i>vancomycin-resistant enterococci</i>, VRE) EN PREPARADOS DE CARNE DE AVE, CERDO Y VACUNO DEL NOROESTE DE ESPAÑA	107
5.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VRE	107
5.2. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE VRE	107
OBJETIVO 6. DETERMINAR LA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA Y DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS DE VRE DE PREPARADOS CÁRNICOS EN EL NOROESTE DE ESPAÑA Y CONOCER LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS PARA FORMAR <i>BIOFILM</i>	116
6.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	116
6.2. GENES DE VIRULENCIA.....	117
6.3. PRODUCCIÓN DE <i>BIOFILM</i>	117
OBJETIVO 7. ESTUDIAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS CEPAS DE VRE AISLADAS MEDIANTE SU RIBOTIPADO.....	119
7.1. RIBOTIPIA.....	119
DISCUSIÓN	121
OBJETIVO 1. DETERMINAR SI LA EXPOSICIÓN DE <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 A CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE FOSFATO TRISÓDICO, NITRITO SÓDICO O HIPOCLORITO SÓDICO PROVOCAN LA ADAPTACIÓN DE LA CEPA Y SI ESTA ADAPTACIÓN SE ASOCIA CON PROTECCIÓN CRUZADA A OTROS BIOCIDAS	123
1.1. ADAPTACIÓN Y ADAPTACIÓN CRUZADA	123

OBJETIVO 2. CONOCER EL PAPEL DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LOS CAMBIOS DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR EN LA ADAPTACIÓN DE <i>E. coli</i> ATCC 12806 AL FOSFATO TRISÓDICO, NITRITO SÓDICO E HIPOCLORITO SÓDICO	128
2.1. MODIFICACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR DESPUÉS DE LA ADAPTACIÓN	128
OBJETIVO 3. CONOCER LA PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. AISLADAS DE CARNE DE CAZA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA.....	132
3.1. ESPECIES DE <i>Enterococcus</i>	132
3.2. PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA	132
OBJETIVO 4. DETERMINAR LA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA Y DE VIRULENCIA EN CEPAS DE <i>Enterococcus</i> spp. AISLADAS DE CARNE DE CAZA EN EL NOROESTE DE ESPAÑA	134
4.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	134
4.2. GENES DE VIRULENCIA.....	136
OBJETIVO 5. CONOCER LA PREVALENCIA Y LOS PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE ENTEROCOCOS RESISTENTES A LA VANCOMICINA (<i>vancomycin-resistant enterococci</i>, VRE) EN PREPARADOS DE CARNE DE AVE, CERDO Y VACUNO DEL NOROESTE DE ESPAÑA.....	138
5.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VRE	138
5.2. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE VRE	139
OBJETIVO 6. DETERMINAR LA FRECUENCIA DE GENES DE RESISTENCIA Y DE VIRULENCIA EN AISLAMIENTOS DE VRE DE PREPARADOS CÁRNICOS EN EL NOROESTE DE ESPAÑA Y CONOCER LA CAPACIDAD DE LAS CEPAS PARA FORMAR <i>BIOFILM</i>	139
6.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	139
6.2. GENES DE VIRULENCIA.....	142
6.3. PRODUCCIÓN DE <i>BIOFILM</i>	143
OBJETIVO 7. ESTUDIAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS CEPAS DE VRE AISLADAS MEDIANTE SU RIBOTIPADO.....	143
7.1. RIBOTIPIA.....	143
CONCLUSIONES.....	145
BIBLIOGRAFÍA.....	149
ANEXO I. PUBLICACIONES (<i>Journal Citation Reports</i>)	171

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (Capita González, 2013; EEA, 2010; IFT, 2006; OJEC, 1998; SCENIHR, 2009)	4
Tabla 2. Principales antibióticos y mecanismos de acción antimicrobiana (adaptada de Sosa <i>et al.</i> , 2009; Tenover, 2006)	15
Tabla 3. Mecanismos asociados con el incremento de la resistencia a biocidas y antibióticos de las bacterias de los <i>biofilms</i> (Capita y Alonso-Calleja, 2013).....	17
Tabla 4. Producción de carne en el mundo (FAOSTAT, 2015).....	36
Tabla 5. Producción de carne en Europa (FAOSTAT, 2015).....	38
Tabla 6. Producción de carne en la Unión Europea (FAOSTAT, 2015).....	38
Tabla 7. Producción de carne en España (FAOSTAT, 2015).....	39
Tabla 8. Proporción (%) de la carne y despojos en el suministro de energía de la dieta (FAO, 2014a).....	41
Tabla 9. Consumo de carne y productos cárnicos entre enero de 2014 y enero de 2015 (MAGRAMA, 2015g)	45
Tabla 10. Capturas, pesos y valores por especie en 2011 (MAGRAMA, 2014).....	55
Tabla 11. Países receptores de carne de caza procedente de España (cantidad exportada en kg y valor en euros) (Cámara de Comercio de España, 2015)	57
Tabla 12. Genes diana y condiciones usadas para la identificación por PCR de <i>Enterococcus</i> spp.	81
Tabla 13. Genes diana y condiciones usadas en las reacciones de PCR llevadas a cabo en el presente Trabajo	84
Tabla 14. Fase de latencia (L; horas) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 adaptada y/o expuesta a diferentes compuestos.....	95

Índice de Tablas

Tabla 15. Ritmo máximo de crecimiento (μ ; incremento de densidad óptica por hora) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 adaptada y/o expuesta a diferentes compuestos	98
Tabla 16. Máxima densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (E; DO ₄₂₀₋₅₈₀) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 adaptada y/o expuesta a diferentes compuestos	98
Tabla 17. Hidrofobicidad (porcentaje de afinidad al xileno) de las células patrón (no adaptadas) y adaptadas en ausencia o presencia de concentraciones subinhibitorias de biocidas (MIC/2).....	100
Tabla 18. Prevalencia de la resistencia a antimicrobianos (%) en 55 enterococos aislados de muestras de carne de caza silvestre en el noroeste de España	102
Tabla 19. Patrones de resistencia a los antibióticos observados en enterococos aislados de carne de caza silvestre en el noroeste de España	103
Tabla 20. Distribución de los genes de resistencia a antibióticos entre los enterococos aislados de carne de caza silvestre en el noroeste de España	105
Tabla 21. Distribución de los genes de virulencia entre los enterococos aislados de carne de caza silvestre en el noroeste de España	106
Tabla 22. Prevalencia de resistencia a antibióticos en 38 cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) aisladas de preparados cárnico en el noroeste de España	114
Tabla 23. Fenotipos de resistencia a antimicrobianos de las 38 cepas de VRE aisladas de preparados cárnico en el noroeste de España	115
Tabla 24. Distribución de los genes de resistencia a antibióticos en las 38 cepas de VRE obtenidas de preparados cárnico en el noroeste de España	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales antimicrobianos usados en las distintas etapas de la cadena alimentaria (Capita González, 2013).....	5
Figura 2. Estructura hipotética de la bomba de expulsión AcrB en <i>Escherichia coli</i> (Pos <i>et al.</i> , 2004)	8
Figura 3. Reacciones químicas que ocurren entre la materia orgánica y el hipoclorito sódico (adaptada de Estrela <i>et al.</i> , 2002).....	12
Figura 4. Mecanismos de acción y mecanismos de resistencia a antibióticos asociados a los principales antibióticos (adaptada de Wright, 2010).....	16
Figura 5. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias (adaptada de Furuya y Lowy, 2006).....	22
Figura 6. Epidemiología de la resistencia bacteriana a los antibióticos (adaptada de Capita y Alonso-Calleja, 2013).....	25
Figura 7. Número de antibióticos aprobados por la FDA en los últimos 30 años (Spellberg, 2012).....	27
Figura 8. Fechas de puesta en el mercado de los principales antibióticos (se incluyen también los antimicrobianos de naturaleza sintética, marcados con asterisco) y fechas de aparición de resistencias (adaptada de Torres Manrique, 2012).....	29
Figura 9. Proporción de cepas de <i>Escherichia coli</i> de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a cefalosporinas de tercera generación en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015)	30
Figura 10. Proporción de cepas de <i>Escherichia coli</i> de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a fluoroquinolonas en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).....	30
Figura 11. Proporción de cepas de <i>Escherichia coli</i> de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a aminoglucósidos en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).....	31

Índice de Figuras

Figura 12. Proporción de cepas de <i>Enterococcus faecium</i> de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a vancomicina en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015)	31
Figura 13. Proporción de cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).....	32
Figura 14. Tasa de crecimiento (%) de la producción media de carne en el periodo 2000-2013 (FAOSTAT, 2015).....	37
Figura 15. Comercio exterior del sector cárnico en España (MAGRAMA, 2015c, d)	40
Figura 16. Comparativa consumo de carnes en 2013 y 2014 (MAGRAMA, 2015e, f, g)	43
Figura 17. Variación (%) del consumo de carne 2014 respecto a 2013 (MAGRAMA, 2015f).....	43
Figura 18. Consumo per cápita de carne en el hogar por CC.AA. (MAGRAMA, 2015e).....	44
Figura 19. Producción mundial de carne en el año 2012 (FAO, 2014a, b).....	53
Figura 20. Producción mundial de carne de caza (FAOSTAT, 2015).....	53
Figura 21. Comparativa de las capturas de caza mayor y menor, según número, peso y valor, en el año 2011 (MAGRAMA, 2014)	56
Figura 22. Evolución del comercio intracomunitario de carne de caza (Cámara de Comercio de España, 2015)	58
Figura 23. Relación entre los recuentos microbianos y la densidad óptica medida a 420-580 nm ($DO_{420-580}$) de la cepa <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 incubada a $37\pm1^\circ C$	93
Figura 24. Curvas de crecimiento (n=3) de <i>Escherichia coli</i> ATCC 12806 examinada bajo diferentes condiciones	96
Figura 25. Dendrograma que muestra el análisis de <i>cluster</i> de los ribotipos de 14 cepas de <i>Enterococcus faecium</i> resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el	

método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18	109
Figura 26. Dendrograma que muestra el análisis de <i>cluster</i> de los ribotipos de 10 cepas de <i>Enterococcus durans</i> resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18	110
Figura 27. Dendrograma que muestra el análisis de <i>cluster</i> de los ribotipos de 7 cepas de <i>Enterococcus hirae</i> resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18	111
Figura 28. Dendrograma que muestra el análisis de <i>cluster</i> de los ribotipos de 5 cepas de <i>Enterococcus gallinarum</i> resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18	112
Figura 29. Ribotipos y características de dos cepas de <i>Enterococcus casseliflavus/Enterococcus flavesiens</i> resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18	113

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN, ácido desoxirribonucleico

AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

ANICE, Asociación Nacional de Industrias de la Carne de España

APPCC, Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico

ARN, ácido ribonucleico

ASICCAZA, Asociación Interprofesional de la Carne de Caza

ATCC, *American Type Culture Collection* (Colección Americana de Cultivos Tipo)

ATP, adenosin trifosfato

BOE, Boletín Oficial del Estado

CAE, Código Alimentario Español

CC.AA., Comunidades Autónomas, España

CCCP, carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona

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

CLSI, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Normas Cínicas y de Laboratorio, Estados Unidos)

DO, densidad óptica

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

EE.UU., Estados Unidos de América del Norte

EEA, *European Environment Agency* (Agencia Europea de Medio Ambiente)

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

EIEC, enteroinvasivo *Escherichia coli*

EMEA, *European Medicines Agency* (Agencia Europea de Medicamentos)

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

FAOSTAT, división estadística de la FAO

FDA, *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos, Estados Unidos)

FTS, fosfato trisódico

Abreviaturas

- GRAS**, *Generally Recognized as Safe* (Generalmente Reconocido Como Seguro, Estados Unidos)
- HIP**, hipoclorito sódico
- HLR**, *high-level resistance* (resistencia de alto nivel)
- IFT**, *Institute of Food Technologists* (Instituto de Tecnólogos de Alimentos, Estados Unidos)
- L**, fase de latencia
- L+D**, limpieza y desinfección
- MAGRAMA**, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (España)
- MATS**, *microbial adhesion to solvents* (ensayo de adhesión microbiana a solventes)
- MH**, Mueller-Hinton
- MIC**, *Minimum Inhibitory Concentration* (Concentración Mínima Inhibitoria)
- MRSA**, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina)
- NS**, nitrito sódico
- OIE**, *Office International des Epizooties, World Organisation for Animal Health* (Oficina Internacional de Epizootías, Organización Mundial de Sanidad Animal)
- OJEC**, *Official Journal of European Communities* (Diario Oficial de las Comunidades Europeas)
- OJEU**, *Official Journal of European Union* (Diario Oficial de la Unión Europea)
- OMS**, Organización Mundial de la Salud
- PCA**, *plate count agar* (agar para recuento en placa)
- PCR**, *polimerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa)
- RD**, Real Decreto
- SCENIHR**, *Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks* (Comité Científico de Riesgos Sanitarios Emergentes y Recientemente Identificados, Unión Europea)
- SCHER**, *Scientific Committee on Health and Environmental Risks* (Comité Científico de Riesgos Sanitarios y Medioambientales, Unión Europea)
- TSA**, *tryptone soya agar* (agar triptona de soja)
- TSB**, *tryptone soya broth* (caldo triptona de soja)
- μ**, ritmo máximo de crecimiento
- UE**, Unión Europea
- USDA**, *United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)
- VRE**, *vancomycin-resistant enterococci* (enterococos resistentes a la vancomicina)
- WHO**, *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud)

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES



INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.- ANTIMICROBIANOS USADOS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El término **antimicrobianos** es un concepto general y ampliamente utilizado que hace referencia al conjunto de agentes que actúan frente a los microorganismos (antibióticos, fungicidas y biocidas). En la Tabla 1 se muestran las definiciones proporcionadas por diferentes organismos internacionales en relación con los principales compuestos antimicrobianos empleados a lo largo de la cadena alimentaria. Asimismo, en la Figura 1 se representan las etapas de producción de alimentos en las que se utiliza cada uno de estos compuestos.

1.1.- BIOCIDAS

1.1.1. Definición e importancia

Según las citadas definiciones, el término **biocidas** hace referencia a sustancias activas y a preparaciones que contienen una o más sustancias activas, en la forma en que son suministradas al usuario, destinadas a destruir, contrarrestar, detener la acción de, o ejercer un control sobre cualquier organismo nocivo (amplio espectro) por medios físicos, químicos o biológicos. Los **aditivos alimentarios** son biocidas que se pueden añadir a los alimentos con la intención de inhibir el crecimiento de los microorganismos alterantes y prolongar su vida útil, así como para ejercer un control sobre los microorganismos patógenos responsables de infecciones e intoxicaciones alimentarias (Davidson y Zivanovic, 2003). El Reglamento (CE) N° 1333/2008 (y modificaciones posteriores) regula el uso de estos antimicrobianos en la Unión Europea (OJEU, 2008). En base a esta normativa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA), evalúa la seguridad de los aditivos alimentarios con anterioridad a su autorización. El **fosfato trisódico** (FTS; codificado como E-339 iii) y el **nitrito sódico** (NS; E-250) son aditivos comúnmente empleados en diversos productos cárnicos, en el primer caso (FTS) como regulador del pH, agente quelante, estabilizante y emulsionante y en el segundo (NS) para mejorar las propiedades sensoriales y como conservante (Cubero *et al.*, 2002). Además, ambos compuestos presentan la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano (efecto bacteriostático) e, incluso, inactivar microorganismos (acción bactericida), dependiendo de sus condiciones de uso (Capita *et al.*, 2002).

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Tabla 1. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (Capita González, 2013; EEA, 2010; IFT, 2006; OJEC, 1998; SCENIHR, 2009).

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

La prevalencia y los niveles de microorganismos patógenos en los alimentos crudos pueden y deben ser controlados aplicando un programa de control integrado a lo largo de toda la cadena alimentaria (*de la granja a la mesa*), incluyendo procedimientos de control preventivos basados en los principios del Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC). No obstante, de manera adicional o complementaria a los aspectos señalados, la descontaminación de los alimentos puede ser una herramienta útil a la hora de mejorar su calidad higiénica y sanitaria (Del Río *et al.*, 2007). Así, los tratamientos **descontaminantes** (p. ej. **fosfato trisódico**) se definen como aquellos procedimientos físicos, químicos o microbiológicos que se aplican a los alimentos frescos (principalmente carne y, en menor medida, productos vegetales), para reducir la contaminación microbiana superficial. El objetivo principal es reducir la prevalencia o los niveles de microorganismos patógenos, y de forma secundaria disminuir la contaminación por microorganismos alterantes.

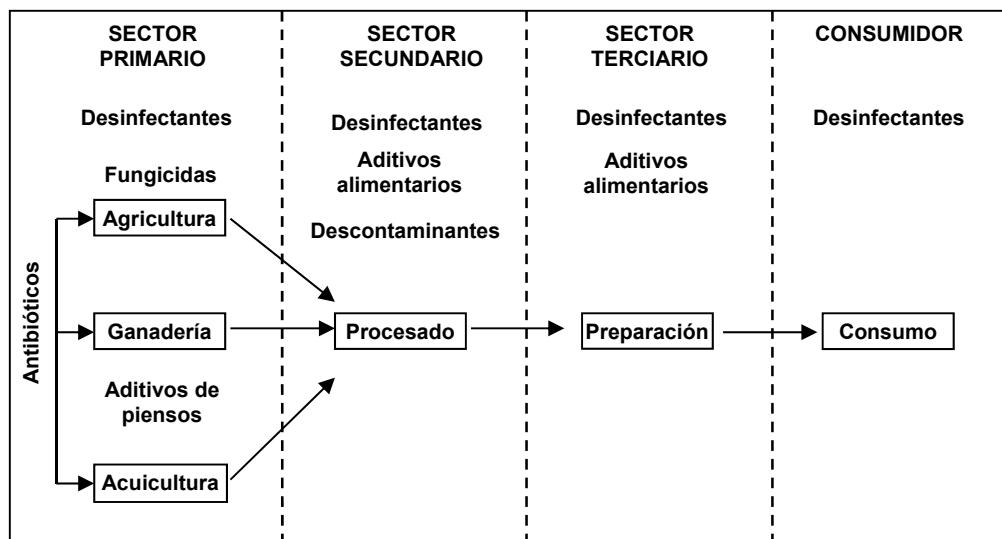


Figura 1. Principales antimicrobianos usados en las distintas etapas de la cadena alimentaria (Capita González, 2013).

En algunos países, como los EE.UU., Canadá, Australia y Nueva Zelanda, es una práctica común en los mataderos someter la carne a diferentes procedimientos de descontaminación. En la Unión Europea el tratamiento de la carne con sustancias diferentes al agua potable ha estado prohibido durante décadas (Directiva 71/118/EC). Sin embargo, el

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Reglamento (CE) N° 853/2004, de 29 de abril de 2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal (OJEU, 2004a), con efecto desde el uno de enero de 2006, proporciona una base legal para el uso de compuestos antimicrobianos con el objetivo de eliminar la contaminación superficial de los alimentos de origen animal. No obstante, la aprobación de estas sustancias está condicionada a una evaluación previa de todos los riesgos para la Salud Pública asociados a su uso, de acuerdo a un documento guía desarrollado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010).

En diciembre de 2010, el Departamento de Agricultura de los EE.UU. (USDA), presentó a la Comisión Europea una solicitud de autorización del tratamiento de la carne de vacuno con ácido láctico. La EFSA emitió el preceptivo informe (Opinión Científica) para este compuesto en base a su seguridad toxicológica, su eficacia antimicrobiana, su potencialidad para provocar susceptibilidad reducida a biocidas o resistencia a antibióticos y el posible riesgo medioambiental, concluyendo que este tratamiento es efectivo e inocuo, siempre que el ácido láctico cumpla con las especificaciones de aditivos alimentarios (Reglamento (CE) N° 1333/2008) y los criterios de pureza (Directiva 2008/84/EC) exigidos en la UE. Finalmente, en febrero de 2013 se autorizó el empleo de ácido láctico para el tratamiento de la carne de vacuno en el matadero bajo ciertas condiciones de utilización (Reglamento (UE) N° 101/2013; OJEU, 2013).

Los **desinfectantes** (p. ej. **hipoclorito sódico**) se emplean para reducir los niveles de contaminación microbiana en múltiples etapas de la cadena alimentaria (Davidson y Harrison, 2002). El Reglamento (UE) N° 528/2012 regula los diferentes aspectos de los desinfectantes en la Unión Europea (OJEU, 2012a).

La cantidad total de biocidas consumidos en la Unión Europea ha aumentado a un ritmo del 4-5% cada año en la última década (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Su valor de mercado ha pasado de 10 a 11 millones de euros en 2006 (SCENIHR, 2009). La creciente importancia cuantitativa de estos compuestos justifica la preocupación de las autoridades sanitarias en relación con su inocuidad para el consumidor. Recientemente algunos comités científicos de la Unión Europea han presentado informes en relación con la seguridad de los biocidas, especialmente sobre su potencialidad para provocar una disminución en la susceptibilidad a dichos compuestos (adaptación), así como protección cruzada frente a

otros biocidas y a antibióticos (EFSA, 2008a, b; European Commission, 2006; SCENIHR, 2009; SCHER-SCENIHR, 2008). La adaptación microbiana a los biocidas podría ocurrir cuando los microorganismos son expuestos a concentraciones subinhibitorias o subletales de los mismos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

1.1.2. Adaptación bacteriana a los biocidas: causas

En los últimos años se ha planteado la posibilidad de que los microorganismos puedan adquirir susceptibilidad reducida a los biocidas, especialmente cuando estos se emplean de forma inadecuada (Davidson y Harrison, 2002). Es un hecho sobradamente demostrado que la efectividad de los biocidas está muy relacionada con su concentración, habiéndose sugerido que la frecuencia de exposición de las bacterias a dosis subinhibitorias de estos compuestos está directamente relacionada con el incremento de su tolerancia frente a ellos (Russell, 2003). Así, las posibles implicaciones del uso incorrecto de los biocidas están suponiendo un motivo creciente de preocupación en el contexto de la Seguridad Alimentaria. Por otro lado, se ha constatado que las bacterias tienen dificultades para adquirir tolerancia a los biocidas debido a que estos compuestos actúan sobre diferentes *target* o lugares diana en la célula bacteriana (Braoudaki y Hilton, 2005), precisamente lo contrario a lo que ocurre con los antibióticos, que suelen tener un único mecanismo de actuación, lo que facilita el desarrollo de resistencias. Existe, por lo tanto, un cierto grado de controversia sobre la capacidad de las bacterias para adquirir resistencia frente a los biocidas, siendo, además, muy limitados los estudios realizados en relación con los compuestos de uso alimentario.

Las bacterias, incluyendo *Escherichia coli*, están sometidas a diferentes condiciones de estrés a lo largo de su vida. Esta exposición a condiciones adversas es especialmente marcada en el caso de las células bacterianas presentes en los alimentos y en las áreas de procesado de los mismos. Las bacterias responden a estas situaciones activando grupos de genes que se encuentran bajo el control de proteínas reguladoras. Las condiciones de estrés se traducen en una acumulación de estas proteínas reguladoras y en la consiguiente transcripción de numerosos genes que permiten a las células hacer frente a estas agresiones, confiriendo a las bacterias la capacidad para tolerar dichas situaciones de estrés y sobrevivir. Esta tolerancia al estrés inducida se asocia con una potenciación de la virulencia microbiana, así como con la capacidad de tolerar otros tipos de estrés (protección

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

cruzada), lo que supone un motivo adicional de preocupación. Las estrategias microbianas desarrolladas para resistir los efectos de los antimicrobianos incluyen la formación de biopelículas o *biofilms*, la reducción de la permeabilidad celular, la expresión incrementada de bombas de expulsión (Figura 2), la modificación o superproducción de los lugares diana o receptores y la adquisición de rutas metabólicas alternativas a las inhibidas por el antimicrobiano (IFT, 2006).

Como se ha indicado, a diferencia de los antibióticos, los biocidas tienen múltiples target o lugares diana en las células microbianas (Wessels y Ingmer, 2013), por lo que la tolerancia se debe habitualmente a mecanismos inespecíficos que permiten a la bacteria reducir la concentración intracelular del compuesto (mediante la reducción de la permeabilidad celular o la acción de bombas de expulsión). La modificación de los lugares diana ha sido descrita en raras ocasiones (p. ej. triclosán) (Ortega Morente *et al.*, 2013). No es raro que en el caso de los biocidas operen varios mecanismos de resistencia simultáneamente (EFSA, 2008b; SCENIHR, 2009).

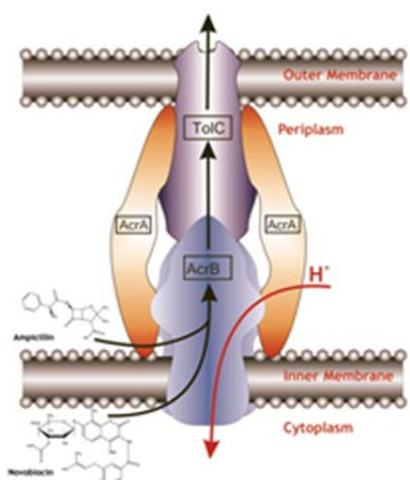


Figura 2. Estructura hipotética de la bomba de expulsión AcrB en *Escherichia coli* (Pos *et al.*, 2004).

1.1.3. Adaptación bacteriana a los biocidas: consecuencias

En trabajos previos se ha puesto de manifiesto que el empleo de biocidas puede, en determinadas condiciones, favorecer la expresión de mecanismos de resistencia a antibióticos, así como provocar un incremento en la capacidad de las bacterias para formar *biofilm* (Capita *et al.*, 2014; Molina-González *et al.*, 2014), hechos que suponen un importante motivo de preocupación en el contexto de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública.

Como se ha comentado con anterioridad, se ha sugerido que las bacterias pueden adaptarse a los biocidas cuando estos se emplean a concentraciones subinhibitorias. Un incremento de la tolerancia a los biocidas es un problema de gran magnitud, ya que es esperable que contribuya a favorecer la persistencia de microorganismos indeseables a lo largo de la cadena alimentaria. Por otro lado, se ha sugerido que la adaptación microbiana a un tipo de estrés puede implicar una reducción de la susceptibilidad a otros (diferentes) tipos de estrés. Es lo que se conoce como protección cruzada o adaptación cruzada. En este sentido, se han realizado numerosos estudios para inducir respuestas de adaptación cruzada (Chung *et al.*, 2006), habiéndose demostrado que la adaptación a un biocida puede conferir susceptibilidad reducida a otros biocidas diferentes (Braoudaki y Hilton, 2005; Randall *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2000). La expresión incrementada de bombas de expulsión inespecíficas y/o las modificaciones en la permeabilidad de las membranas constituyen los mecanismos potencialmente responsables de la adaptación cruzada entre biocidas. Estos fenómenos de adaptación cruzada son difícilmente predecibles pues, además de ser biocida-dependientes, están sujetos a una gran variabilidad entre cepas (Braoudaki y Hilton, 2005). Si un incremento en la tolerancia a un biocida es ya un motivo de preocupación, la adaptación cruzada supone un importante desafío para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública, ya que puede traducirse en un incremento marcado de la prevalencia y/o niveles de microorganismos patógenos a lo largo de la cadena de producción de alimentos.

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

En el presente trabajo de investigación se abordan dos aditivos alimentarios: el fosfato trisódico y el nitrito sódico. En la Unión Europea (UE) los aditivos están regulados por el Reglamento (CE) Nº 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios (OJEU, 2008 y modificaciones posteriores). En el Anexo II del citado Reglamento (aplicable desde junio de 2013, salvo excepciones) se recogen los aditivos que se pueden utilizar en la UE, a la vez que se indican las dosis máximas y los alimentos en los que se pueden adicionar. Asimismo, en el Anexo III se enumeran los aditivos que se pueden emplear en la fabricación de aditivos, enzimas, aromas y nutrientes. El Anexo III, por su parte, empezó a aplicarse el 2 de diciembre de 2011, salvo excepciones. Además, todos los aditivos que se utilicen en la elaboración de

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

alimentos tendrán que cumplir unos criterios, que se regulan en el Reglamento (UE) N° 231/2012 de la Comisión, de 9 de marzo de 2012, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los Anexos II y III del Reglamento (CE) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo (OJEU, 2012b y modificaciones posteriores). Este Reglamento es aplicable desde diciembre de 2012, con algunas excepciones. Los procedimientos de autorización (Reglamento (CE) N° 1331/2008 y Reglamento (UE) N° 234/2011) y reevaluación (Reglamento (UE) N° 257/2010) de los aditivos están también contemplados en la normativa de la UE.

El **fosfato trisódico** (FTS; Na_3PO_4) es un aditivo alimentario (E-339 iii) empleado en diferentes grupos de alimentos como agente regulador del pH, emulsionante y estabilizante, quelante y humectante. Las concentraciones de uso autorizadas oscilan entre 0,5 g/L (aguas de mesa preparadas) y 50 g/L (blanqueadores de bebidas para máquinas expendededoras), no estando fijado para algunos productos (p.ej. complementos alimenticios) el nivel máximo de uso (*quantum satis*). Los niveles autorizados para la mayoría de los grupos de alimentos oscilan entre 1 y 10 g/L (OJEU, 2011). Además de su empleo como aditivo, en los países donde los procedimientos de descontaminación de la carne están autorizados, el FTS, que en los EE.UU. está considerado como sustancia GRAS (*Generally Recognized As Safe*), se puede aplicar con finalidad antimicrobiana a la superficie de las canales o despiece de aves y mamíferos a concentraciones de entre el 8% y el 12% (FDA, 2012).

El efecto bactericida del fosfato trisódico (FTS) resulta de la combinación de varios factores. En primer lugar, el elevado pH de las soluciones que forma desorganiza las moléculas de ácidos grasos de la membrana celular, permitiendo la fuga de fluidos intracelulares. En segundo lugar, su considerable fuerza iónica puede provocar autolisis bacteriana. Su capacidad para remover las películas de grasa y su efecto surfactante o detergente contribuye también a la acción antimicrobiana del FTS cuando se usa para la descontaminación de canales de aves y mamíferos (Capita *et al.*, 2002).

El **Nitrito sódico** (NS; NaNO_2) es un aditivo alimentario (E-250) ampliamente usado en productos cárnicos para mejorar las propiedades organolépticas (color y sabor) de los productos curados (tanto crudos como cocidos), evitar el enranciamiento y, sobre todo, con finalidad antimicrobiana, para prevenir la intoxicación botulínica. Los riesgos potenciales de este compuesto (posibilidad de anoxia y formación de nitrosaminas, compuestos

potencialmente cancerígenos) hacen que deban controlarse de forma estricta sus niveles en los productos señalados, donde se autoriza una cantidad máxima a añadir durante la elaboración de 100-180 mg/kg (dependiendo del tipo de producto), siendo la dosis residual máxima permitida de 50-175 mg/kg (OJEU, 2008).

La actividad antimicrobiana del nitrito sódico depende de su conversión a óxido nítrico y a ácido nitroso (Buchanan *et al.*, 1997). A un pH bajo, el nitrito es protonado, formándose ácido nitroso (HNO_2), que es inestable y se descompone espontáneamente para producir óxido nítrico (NO) y dióxido de nitrógeno (NO_2). Los óxidos de nitrógeno causan alteración y/o inactivación del ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas y lípidos de membrana. Por otro lado, el ácido nitroso puede disminuir severamente el contenido de adenosín trifosfato (ATP) intracelular de los microorganismos. Así, el ácido nitroso puede atravesar por difusión pasiva las cubiertas celulares de la célula bacteriana, y, como consecuencia del pH neutro intracelular, disociarse en el interior de la célula generando protones, que causarán una importante acidificación intracelular. Como mecanismo de defensa, la célula expulsará los protones al exterior, si bien este mecanismo implica la participación de bombas de expulsión que requieren ATP, lo que conduce a una pérdida de energía que compromete el crecimiento e incluso la supervivencia bacteriana (Mortensen *et al.*, 2008).

Además de los aditivos indicados, en este estudio se ha ensayado un tercer compuesto, el **hipoclorito sódico** (HIP; NaClO), desinfectante de amplio uso en la Industria Alimentaria. La lejía puede definirse como “las soluciones de hipoclorito alcalino, tal y como se producen por la industria, incluyan o no los aditivos necesarios para su puesta en el mercado, siendo su contenido en cloro activo no inferior a 35 gramos por litro ni superior a 100 gramos por litro” (BOE, 1983, 1993). En la práctica totalidad de los casos, para la desinfección de superficies se manejan concentraciones máximas de 5000 ppm (o lo que es lo mismo, 5 g/L ó 5 mg/mL) de hipoclorito sódico. En el presente trabajo se han utilizado soluciones acuosas de hipoclorito sódico, sin otros componentes, para confeccionar lejía de uso alimentario.

El **hipoclorito sódico** (HIP) exhibe un balance dinámico como se representa en la siguiente reacción (Estrela *et al.*, 2002): $\text{NaClO} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{NaOH} + \text{HClO} \leftrightarrow \text{Na}^+ + \text{OH}^- + \text{H}^+ + \text{ClO}^-$.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La actividad antimicrobiana del hipoclorito sódico se basa en el elevado pH de las soluciones que forma (acción de los iones hidroxilo). Estos altos valores de pH afectan a la integridad de la membrana citoplasmática, provocando inhibición enzimática irreversible, alteraciones en el metabolismo celular y destrucción de fosfolípidos como consecuencia de una peroxidación lipídica. La cloraminación de los aminoácidos (Figura 3) tiene como consecuencia la formación de cloraminas, que interfieren con el metabolismo celular normal. Las reacciones de oxidación promueven la inhibición enzimática irreversible de las bacterias al remplazar el hidrógeno con cloro. Esta inactivación enzimática puede observarse tras la reacción del cloro con los grupos amino (NH_2^-) y tras la oxidación irreversible de los grupos sulfhidrilo (-SH) de las enzimas bacterianas (cisteína). Así, el HIP presenta una actividad antimicrobiana actuando sobre enzimas esenciales para la célula, promoviendo su inactivación irreversible por acción de los iones hidroxilo y por la reacción de cloraminación. Además, el HIP neutraliza los aminoácidos formando agua y sal (reacción de neutralización). Este biocida puede provocar la disolución de la superficie bacteriana al actuar como un solvente orgánico y degradar los ácidos grasos, transformándolos en sales de ácidos grasos y glicerol, que reduce la tensión superficial (reacción de saponificación).

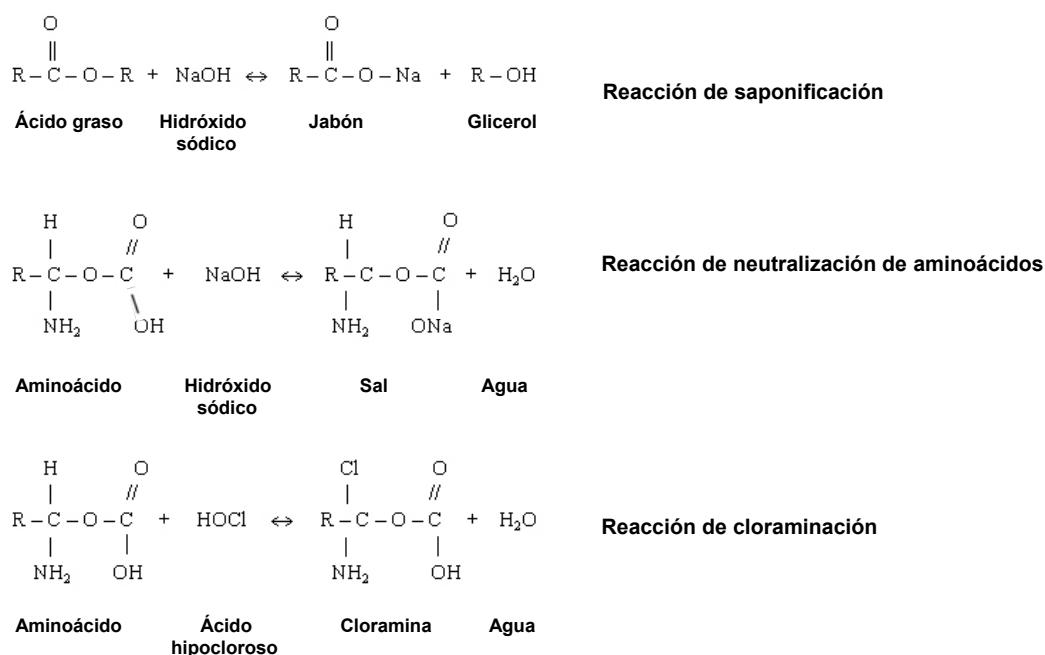


Figura 3. Reacciones químicas que ocurren entre la materia orgánica y el hipoclorito sódico (adaptada de Estrela et al., 2002).

1.2.- ANTIBIÓTICOS

1.2.1. Definición y mecanismos de acción

Los antibióticos son compuestos producidos por microorganismos (bacterias, mohos, actinomicetos) que inhiben el crecimiento (agentes bacteriostáticos) o destruyen (bactericidas) las bacterias sensibles (toxicidad selectiva). En sentido amplio, se incluyen también bajo la denominación de “antibióticos” los compuestos antibacterianos semisintéticos (p. ej. meticilina) o sintéticos (p. ej. quinolonas o sulfamidas).

La mayoría de los compuestos antimicrobianos usados para el tratamiento de las infecciones bacterianas se clasifican según su principal mecanismo de acción. Hay cuatro mecanismos de acción principales: 1) inhibición de la síntesis de la pared celular, 2) inhibición de la síntesis proteica, 3) inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos e 4) inhibición de una ruta metabólica (Tabla 2) (McManus, 1997; Tenover, 2006; Wright, 2010).

1) INTERFERENCIA EN LA SÍNTESIS DE LA PARED CELULAR. Dentro de este grupo de compuestos se incluyen, por ejemplo, los antibióticos beta-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactamos) y los glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina). Los antibióticos del grupo de los beta-lactámicos inhiben la síntesis de la pared celular por interferencia con las enzimas requeridas para la síntesis de la capa de peptidoglicano. Por su parte, la vancomicina y la teicoplanina se unen al extremo terminal de las unidades precursoras de la cadena de peptidoglicano, impidiendo el ensamblaje del polímero y la síntesis de una pared celular estable. En último término siempre se origina lisis celular.

2) INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA. Este mecanismo de acción es usado por los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol, lincosamidas, estreptograminas y oxazolidinonas. El blanco de estos antibióticos son los ribosomas. La unión al ribosoma detiene la transducción, inhibiéndose así la síntesis proteica. La interferencia puede producirse con la subunidad ribosómica 30S (aminoglucósidos y tetraciclinas) o con la subunidad 50S (macrólidos, cloranfenicol, lincosamidas, estreptograminas y oxazolidinonas).

3) INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS. Este grupo de antibióticos inhiben alguno de los componentes esenciales que participan en la síntesis de los ácidos

nucleicos. Así, por ejemplo, las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las topoisomerasas II y IV, encargadas de controlar el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN. La rifampicina, por su parte, inhibe la ARN (ácido ribonucleico) polimerasa, impidiendo la formación de nuevo ARN.

- 4) **INHIBICIÓN DE UNA RUTA METABÓLICA.** La combinación, habitualmente usada en la práctica clínica, de trimetoprim y sulfametoxazol bloquea dos etapas en la ruta metabólica que conduce a la síntesis de ácido fólico, hecho que en último término se traduce en la inhibición de la síntesis de ADN.

La modificación de la membrana celular puede considerarse un quinto, aunque raramente descrito, mecanismo de acción de los antibióticos. Así, se ha indicado que las polimixinas ejercen su acción antimicrobiana modificando la organización estructural de la membrana, aumentando su permeabilidad, hecho que provoca la pérdida de contenido intracelular. En la Tabla 2 y en la Figura 4 se resumen los mecanismos de acción de los principales grupos de antibióticos.

1.2.2. *Mecanismos de resistencia a antibióticos*

La resistencia a antibióticos puede definirse como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir y multiplicarse en presencia de un compuesto antimicrobiano que debería inhibir o inactivar ese tipo de microorganismo (James *et al.*, 2012).

Las estrategias que utilizan los microorganismos para evadir la acción de los antibióticos incluyen la formación de *biofilm*, la inducción de cambios en la permeabilidad de la superficie celular, la expresión incrementada de bombas de expulsión, la inactivación enzimática del compuesto antes de que alcance el lugar diana, la modificación o superproducción del lugar diana o la adquisición de rutas metabólicas alternativas a la/s inhibida/s por el antimicrobiano (Capita y Alonso-Calleja, 2013) (Tabla 2, Figura 4).

Tabla 2. Principales antibióticos y mecanismos de acción antimicrobiana (adaptada de Sosa et al., 2009; Tenover, 2006).

Grupo de antimicrobianos	Modo general de acción	Compuestos	Especro de actividad	Lugar diana	Principales mecanismos de resistencia
β-lactámicos	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Penicilinas (penicilina, ampicilina, oxicilina), cefalosporinas (cefazolina, cefotína, ceftriaxona, cefepima), carbapenem (imipenem)	Bacterias aerobias y anaerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Proteinas de anclaje de penicilinas	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Reducción de la permeabilidad celular Expresión incrementada de bombas de expulsión
Glucopéptidos	Inhibidores de la síntesis de la pared celular	Vancomicina, teicoplanina	Bacterias Gram-positivas	Unidades de peptidoglicano (dipeptido D-alanil-D-alanina terminal del peptidoglicano)	Modificación del lugar diana
Macrólidos	Inhibidores de la síntesis proteica	Eritromicina, azitromicina	Bacterias aerobias y anaerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Subunidad ribosómica 50S	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Expresión incrementada de bombas de expulsión
Tetraciclinas	Inhibidores de la síntesis proteica	Tetraciclina, doxiciclina	Bacterias aerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Subunidad ribosómica 30S	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Expresión incrementada de bombas de expulsión
Quinolonas y Fluoroquinolonas	Inhibidores de la síntesis de ADN	Ácido nalidixico, ciprofloxacina, enrofloxacin	Bacterias aerobias Gram-positivas y Gram-negativas, algunas bacterias anaerobias Gram-negativas	Topoisomerasa II (ADN gerasa), topoisomera IV	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Reducción de la permeabilidad celular Expresión incrementada de bombas de expulsión
Fenicos	Inhibidores de la síntesis proteica	Cloranfenicol	Algunas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	Subunidad ribosómica 50S	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Reducción de la permeabilidad celular Expresión incrementada de bombas de expulsión
Trimetoprim-sulfametoazol	Inhibidores de la síntesis de ADN	Co-trimoxazol	Bacterias aerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Enzimas implicadas en la síntesis de ácido fólico	Superproducción del lugar diana Modificación del lugar diana Adquisición de rutas metabólicas alternativas
Estreptograminas	Inhibidores de la síntesis proteica	Dalfopristina, quinupristina	Bacterias aerobias y anaerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Subunidad ribosómica 50S	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Expresión incrementada de bombas de expulsión
Aminoglucósidos	Inhibidores de la síntesis proteica	Gentamicina, kanamicina, estreptomicina	Bacterias aerobias Gram-positivas y Gram-negativas	Subunidad ribosómica 30S	Inactivación enzimática Modificación del lugar diana Expresión incrementada de bombas de expulsión

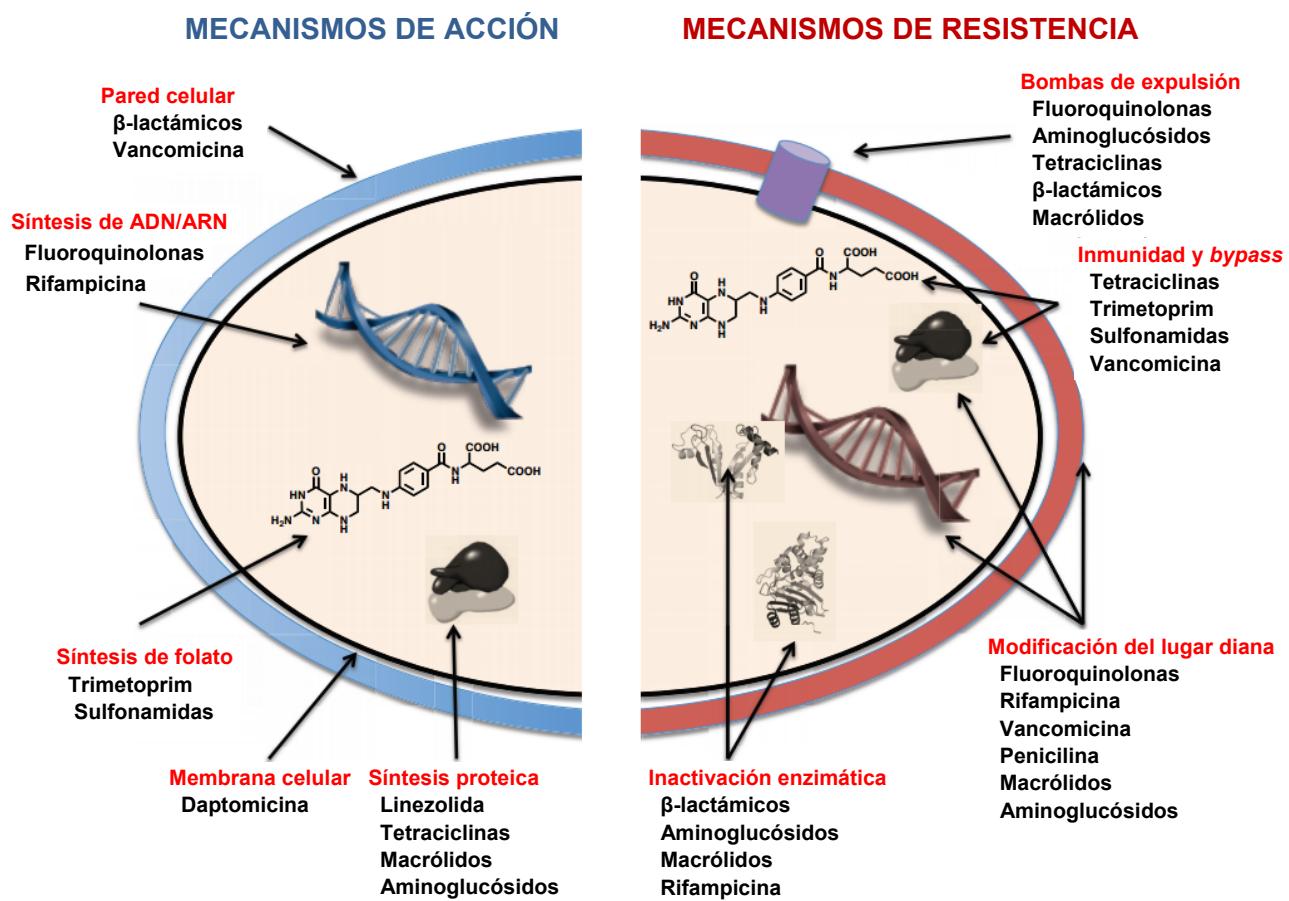


Figura 4. Mecanismos de acción y mecanismos de resistencia asociados a los principales antibióticos (adaptada de Wright, 2010).

A diferencia de los antibióticos, los biocidas presentan múltiples lugares diana en la bacteria, por lo que la emergencia de susceptibilidad reducida es mediada a menudo por mecanismos inespecíficos que provocan un descenso en la concentración intracelular de biocidas (p. ej. cambios en la permeabilidad celular o síntesis de bombas de expulsión), mientras que la modificación de un lugar diana o de una ruta metabólica son mecanismos poco probables en el caso de este tipo de antimicrobianos. La modificación del lugar diana se ha descrito en raras ocasiones como mecanismo de resistencia a biocidas (p. ej. resistencia bacteriana al triclosán cuando se emplea a bajas concentraciones) y no parece ser un mecanismo habitual, si bien hay falta de información al respecto (Gómez-Escalada *et al.*, 2005; SCENIHR, 2009). Generalmente, en el caso de los biocidas, actúan simultáneamente varios mecanismos de resistencia (EFSA, 2008b).

1) BIOFILMS. La mayoría de las bacterias presentes en la naturaleza se encuentran formando parte de *biofilms*. Se trata de comunidades de microorganismos incluidos en una matriz polimérica extracelular de origen microbiano que se forman en las superficies, tanto abióticas como orgánicas (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Las bacterias que forman parte de los *biofilms* expresan propiedades diferentes a las de las células planctónicas, como por ejemplo una resistencia incrementada a biocidas y a antibióticos (Capita *et al.*, 2003; Cerf *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2007; Lunestad *et al.*, 2007; Shi y Zhu, 2009; Smith y Hunter, 2008; Stickler y Jones, 2008; Williams y Stickler, 2008) a través de diferentes mecanismos (Tabla 3).

Tabla 3. Mecanismos asociados con el incremento de la resistencia a biocidas y antibióticos de las bacterias de los *biofilms* (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

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

2) CAMBIOS EN LA PERMEABILIDAD CELULAR. El mecanismo más común de resistencia a antibióticos está en relación con la estructura y composición de las membranas celulares, que pueden actuar como barreras, bien de forma intrínseca o a través de mecanismos de resistencia adquiridos. De esa forma, limitan la cantidad de antimicrobiano que entra en la célula, decreciendo su concentración intracelular. En diferentes publicaciones se ha puesto de manifiesto una reducción en la eficacia de los antimicrobianos como consecuencia de cambios en las proteínas, composición de ácidos grasos, fosfolípidos o lipopolisacáridos de las membranas bacterianas (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Así, por ejemplo, la resistencia de *E. coli* a los antibióticos β -lactámicos puede ocurrir como consecuencia de modificaciones en las porinas de las membranas externas. Por su parte, la resistencia de *Staphylococcus epidermidis* a los glucopéptidos puede tener lugar como consecuencia de la superproducción de los lugares de unión de

estos antibióticos a la pared de peptidoglicano (IFT, 2006). Recientemente, se ha demostrado que los cambios en la fluidez de las membranas celulares pueden jugar un importante papel en la adaptación de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* a los descontaminantes de la carne de ave (Alonso-Hernando *et al.*, 2010).

- 3) BOMBAS DE EXPULSIÓN.** Las bombas de expulsión son transportadores proteicos que expulsan los antimicrobianos que han penetrado en la célula bacteriana, reduciendo así su concentración intracelular por debajo de los niveles efectivos. Este mecanismo de resistencia ha sido descrito para numerosos antimicrobianos (Alanis, 2005; Tabla 2). Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un único compuesto o bien ser capaces de expulsar un rango de sustancias no relacionadas, por ejemplo aditivos y antibióticos (Potenski *et al.*, 2003).
- 4) INACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.** La inactivación enzimática se produce cuando la bacteria genera una o más enzimas que modifican o degradan el antimicrobiano, haciéndolo inactivo. Estas enzimas son específicas para a un antimicrobiano o clase de antimicrobianos particular. Se trata de un mecanismo de resistencia común frente a los antibióticos beta-lactámicos, a través de la producción bacteriana de beta-lactamasas, que hidrolizan el anillo beta-lactámico. Algunos autores (Cloete, 2003; Demple, 1996; Kümmerle *et al.*, 1996; Valkova *et al.*, 2001) han observado también este mecanismo de resistencia en el caso de diferentes biocidas (p. ej. algunas sales, parabenos o aldehídos) (SCENIHR, 2009).
- 5) MODIFICACIÓN O SUPERPRODUCCIÓN DE LOS LUGARES DIANA.** En ocasiones, el receptor intracelular de la bacteria sufre una modificación merced a una mutación del ARN ribosómico u otros elementos, teniendo como resultado la pérdida del *target* o lugar diana y consecuentemente la falta de efectividad de antimicrobiano. Algunos ejemplos de este mecanismo consisten en la modificación de las proteínas de anclaje de las penicilinas, observada en algunos tipos de resistencia a estos antibióticos, modificaciones en los ribosomas que provocan resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas, o modificaciones en la enzima ADN-girasa, que se traduce en resistencia a las fluoroquinolonas (Alanis, 2005).

Por otro lado, la disminución de la susceptibilidad de *Staphylococcus* spp. a los aminoglucósidos puede estar en relación con la superproducción de los lugares de unión a estos antibióticos (dipéptido D-alanil-D-alanina terminal de la cadena de peptidoglicano) de la pared celular (Sanyal y Greenwood, 1993).

6) ADQUISICIÓN DE RUTAS METABÓLICAS ALTERNATIVAS. Algunos antibióticos actúan sobre enzimas que participan en determinadas rutas metabólicas. Las bacterias resistentes son capaces de desarrollar una vía metabólica nueva para eludir la acción del antimicrobiano. Las sulfonamidas y el trimetoprim interfieren con la biosíntesis bacteriana del ácido fólico, que es una vitamina esencial para estos microorganismos. Las sulfonamidas son análogos estructurales del *para*-aminobenzoato (PABA), necesario para la síntesis de dihidropteroato sintetasa, enzima que participa en la producción de 7, 8-dihidropteroato (una etapa clave en la síntesis de folato). De esta forma, las sulfamidas producen una inhibición competitiva de la síntesis de ácido fólico. El trimetoprim, por su parte, inhibe de forma selectiva la dihidrofolato reductasa, evitando así la transformación de dihidrofolato en tetrahidrofolato (un derivado del ácido fólico). En última instancia, el resultado en ambos casos es la imposibilidad para llevar a cabo la síntesis de ADN. La resistencia de las bacterias a estos antibióticos se basa en la adquisición de la capacidad para sintetizar dihidropteroato sintetasa y dihidrofolato reductasa modificadas, con una afinidad reducida por las sulfonamidas y el trimetoprim, respectivamente (Schmitz *et al.*, 2001).

Finalmente, señalar que muchas bacterias han adquirido resistencia a diferentes clases de antibióticos no relacionados (bacterias multi-resistentes). El principal mecanismo de esta multi-resistencia es la presencia de bombas de expulsión inespecíficas, capaces de excretar un amplio rango de compuestos tóxicos para la bacteria, incluyendo antibióticos y biocidas.

1.2.3. Resistencia intrínseca

La resistencia intrínseca es la capacidad innata de un microorganismo para resistir la actividad de un compuesto antimicrobiano particular por poseer unos genes determinados en su cromosoma. Un ejemplo es la resistencia natural de las bacterias Gram-negativas a la vancomicina. Algunas especies de bacterias poseen resistencia intrínseca a una o más

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

clases de compuestos antimicrobianos. En ese caso todas las cepas de esa especie presentan una resistencia similar a todos los miembros de dicha clase de antimicrobianos (Tenover, 2006).

Este tipo de resistencia se denomina también insensibilidad, pues se presenta en organismos que nunca han sido susceptibles al compuesto. Dicha insensibilidad natural puede deberse a: 1) ausencia de lugares diana para el antimicrobiano, 2) inaccesibilidad del compuesto al interior de la célula bacteriana, 3) expulsión del compuesto por transportadores proteicos (bombas de expulsión) codificados por genes presentes en el cromosoma o 4) producción de enzimas que inactivan el antimicrobiano (Giguère *et al.*, 2006). Hay que señalar, además, que algunas bacterias pueden usar estrategias consistentes en la expresión o inhibición temporal de ciertos genes para favorecer su supervivencia en presencia de un factor disgenésico (lo que se conoce como sistemas de respuesta al estrés).

El conocimiento de la resistencia intrínseca en las bacterias patógenas es imprescindible para evitar tratamientos inapropiados que, además de ser ineffectivos, contribuyen a incrementar el riesgo de generación de resistencia a antibióticos.

1.2.4. Resistencia adquirida

La resistencia adquirida se produce cuando las bacterias originalmente susceptibles alcanzan un mayor o menor grado de resistencia a un agente antimicrobiano. Este tipo de resistencia puede ser debida a diferentes mecanismos, como la síntesis de enzimas que inactivan el compuesto (p. ej. β -lactamasas que confieren resistencia frente a los antibióticos β -lactámicos), la modificación mutacional del *target* o lugar diana (p.ej. modificaciones en la ADN topoisomerasa, que confiere resistencia a quinolonas), la impermeabilidad de la superficie celular (p. ej. pérdida de las proteínas porinas de la membrana externa que confiere resistencia al carbapenem) o la expulsión del compuesto el medio extracelular (p. ej. bombas de expulsión que confieren resistencia a penicilina). La mayoría de los microorganismos resistentes a los antibióticos han emergido como resultado de modificaciones genéticas, conseguidas mediante mutaciones espontáneas ventajosas o por la adquisición de material genético por transferencia horizontal desde otras células (Capita González, 2013).

MUTACIONES. Las mutaciones ocurren espontáneamente al azar y se producen con una frecuencia baja, en aproximadamente una de cada 10^7 a 10^{10} células bacterianas. La extremadamente elevada tasa de replicación de las bacterias implica que las resistencias se estén generando de forma continua. Se ha sugerido que los antimicrobianos no se limitan a favorecer la selección de bacterias resistentes, sino que en determinadas condiciones podrían incrementar la tasa de mutación bacteriana, aumentando así las probabilidades de generación de resistencias (Baquero *et al.*, 2002).

La adquisición de resistencia a un antibiótico es beneficiosa para la bacteria cuando se encuentra en presencia del compuesto, pero implica para ella un “coste biológico”, que se traduce en una disminución de su velocidad de crecimiento, respecto a las bacterias sensibles, en ausencia del antibiótico. Sin embargo, en ocasiones se producen, de forma aleatoria, “mutaciones compensatorias” que permiten a la bacteria resistente incrementar su ritmo de crecimiento, de forma que, en ausencia del antibiótico, la bacteria resistente no estaría desfavorecida respecto a la bacteria sensible. Estos mecanismos compensatorios permiten a las bacterias resistentes persistir incluso en ausencia de presión selectiva (Kempf y Zeitouni, 2009).

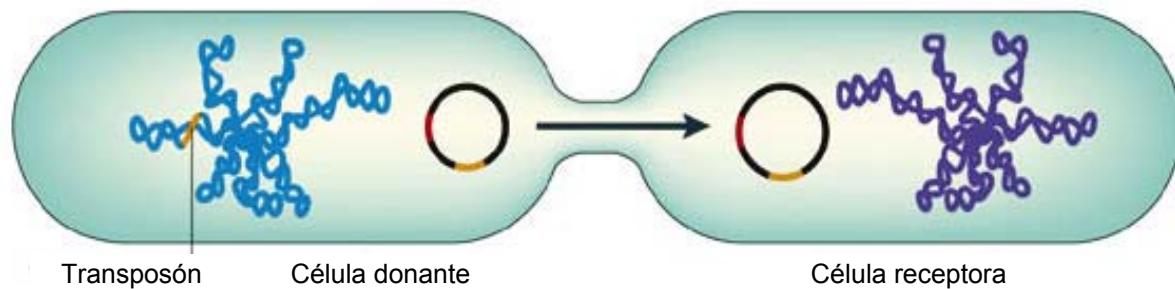
TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE GENES DE RESISTENCIA. Las bacterias son muy eficientes para propagar la resistencia a antibióticos debido a su capacidad para multiplicarse con rapidez, transfiriendo los genes de resistencia a su progenie durante la multiplicación celular, lo que se conoce como transmisión o evolución vertical. Además, los genes pueden pasar a otras células bacterianas mediante determinadas plataformas genéticas (transferencia horizontal mediada por mecanismos de conjugación, transducción o transformación) (Figura 5).

Las bacterias utilizan sistemas para captar y acumular genes de resistencia a antibióticos (integrones) y para movilizarlos y transferirlos a otras bacterias (plásmidos y transposones). Existen además otros sistemas de movilización que favorecen la diseminación de genes de resistencia, como son las islas genómicas, las secuencias de inserción comunes o la movilización mediada por fagos. La estrategia más eficiente y habitual de transferencia genética es el paso de plásmidos (moléculas de ADN extracromosómico que replican de forma independiente al cromosoma) o transposones conjugativos (secuencias de ADN con gran capacidad de movimiento que pueden moverse

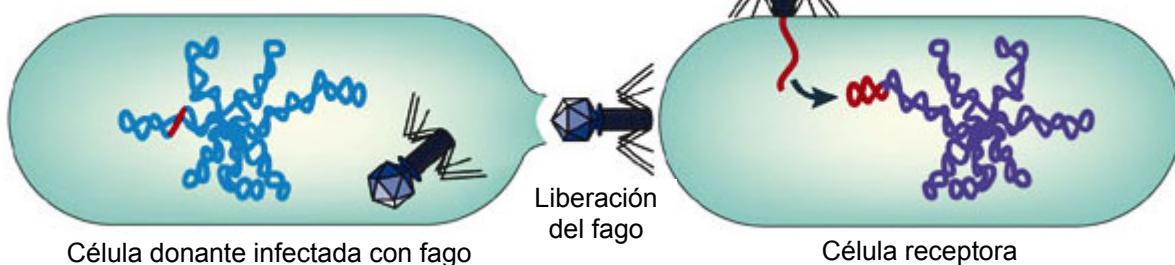
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

entre diferentes partes del genoma bacteriano) a través de unas estructuras proteicas tubulares denominadas “*pili*” que conectan temporalmente las bacterias donante y receptora. Los plásmidos pueden transferirse tanto de forma vertical como horizontal, estimándose que intervienen en la mayoría de las resistencias adquiridas (Alanis, 2005).

CONJUGACIÓN



TRANSDUCCIÓN



TRANSFORMACIÓN

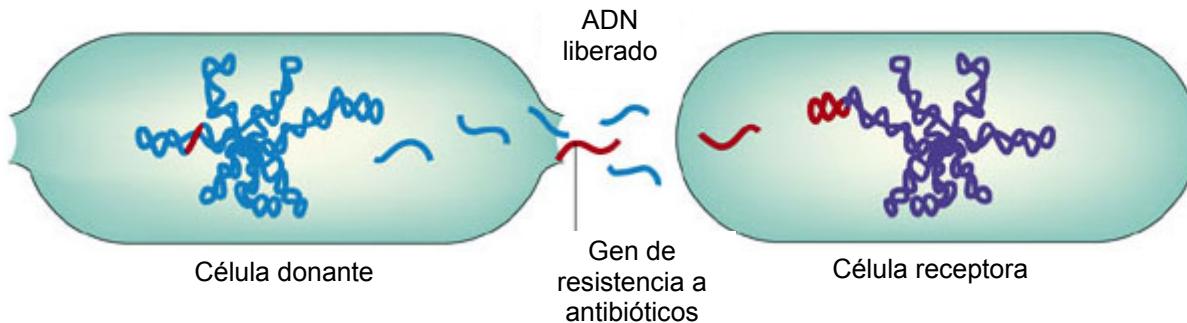


Figura 5. Mecanismos de transferencia horizontal de genes entre bacterias (adaptada de Furuya y Lowy, 2006).

La transducción es otro mecanismo de transferencia horizontal en el que un bacteriófago (virus) actúa de intermediario entre una célula y otra. Finalmente, la transformación ocurre cuando una bacteria adquiere e incorpora de forma estable en su genoma fragmentos de ADN liberados al ambiente tras la lisis de otra bacteria (Rolain, 2013).

La transferencia horizontal de genes de resistencia puede producirse entre cepas del mismo o de diferentes géneros de bacterias presentes en un mismo ecosistema, hecho que tiene gran repercusión en el ámbito de la Salud Pública y la Sanidad Animal, ya que permite el paso de los determinantes de resistencia desde bacterias no patógenas hasta bacterias patógenas. La probabilidad de intercambio horizontal de genes de resistencia varía ampliamente entre grupos bacterianos, siendo elevada en el caso de las cepas del género *Enterococcus* y de la Familia *Enterobacteriaceae*. En este sentido hay que señalar que el hábitat de estos microorganismos (es decir, el intestino o las aguas residuales) es un escenario habitual de intercambio de genes de resistencia entre bacterias (SCENIHR, 2009). Los eficientes mecanismos de transferencia horizontal de genes desarrollados por ambos grupos microbianos a lo largo de los años, junto con el hecho de que engloben cepas tanto comensales como patógenas y de que sean representantes de los dos grandes grupos de bacterias que conocemos, Gram-positivas y Gram-negativas, respectivamente, hacen que *Enterococcus* y *Escherichia coli*, los dos grupos de bacterias abordados en este Trabajo, sean considerados como “centinelas de la resistencia a antibióticos” en los estudios de vigilancia y monitorización.

La transferencia horizontal de genes de resistencia en el Sistema Alimentario supone un peligro tanto directo como indirecto para el consumidor. El peligro directo está relacionado con la presencia en los alimentos de microorganismos patógenos resistentes capaces de provocar infección por ingestión o manipulación (EFSA, 2008a). El peligro indirecto se debe a la posibilidad de transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones o integrones con genes de resistencia a antibióticos) desde bacterias no patógenas (comensales, probóticas o tecnológicas) hasta bacterias patógenas, transferencia que podría tener lugar en cualquier punto a lo largo de la cadena alimentaria (Lester *et al.*, 2006). Si bien la contribución relativa de cada etapa a este peligro indirecto no ha sido hasta el momento completamente dilucidada, los investigadores enfatizan la

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

importancia del tracto intestinal de seres humanos y animales en la transferencia horizontal de los elementos genéticos involucrados en la resistencia a antibióticos (Li *et al.*, 2010; Rolain, 2013). Así, incluso se ha sugerido que una baja proporción de cepas resistentes en el intestino humano debería ser un objetivo de Salud Pública, de la misma manera que lo es el mantenimiento de una tensión arterial normal o de niveles adecuados de colesterol sérico (Capita González, 2013).

1.2.5. Causas de la resistencia a antibióticos

El desarrollo de resistencia a antibióticos es esencialmente un proceso de selección darwiniana (Rosenblatt-Farrell, 2009). Cuando sobre las poblaciones microbianas actúa un factor de estrés (como puede ser la presencia de un compuesto antimicrobiano), únicamente se inactivarán las bacterias susceptibles. Por presión selectiva, las bacterias resistentes van a sobrevivir y multiplicarse, originando una progenie también resistente. Así, al cabo de un tiempo, la población original habrá sido sustituida por una población de microorganismos resistentes. Cuando los antimicrobianos se usan de forma incorrecta (tiempo, dosis o potencia insuficientes) aumentan las probabilidades de que las bacterias sobrevivan y se multipliquen (WHO, 2002).

La epidemiología de la resistencia a antibióticos tiene tres componentes clave: los animales productores de alimentos, los animales domésticos y las poblaciones humanas (Figura 6), si bien en los últimos años se está dando cada vez más importancia al papel que podrían ejercer los animales silvestres en la generación, y especialmente en la diseminación, de resistencia a antibióticos. La ingesta de antibióticos (tanto en poblaciones animales como en seres humanos) es un factor crítico para la selección de resistencias. Además, la industria alimentaria puede desempeñar un papel clave en la emergencia y diseminación de resistencia a antibióticos, por ejemplo a través del uso de biocidas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

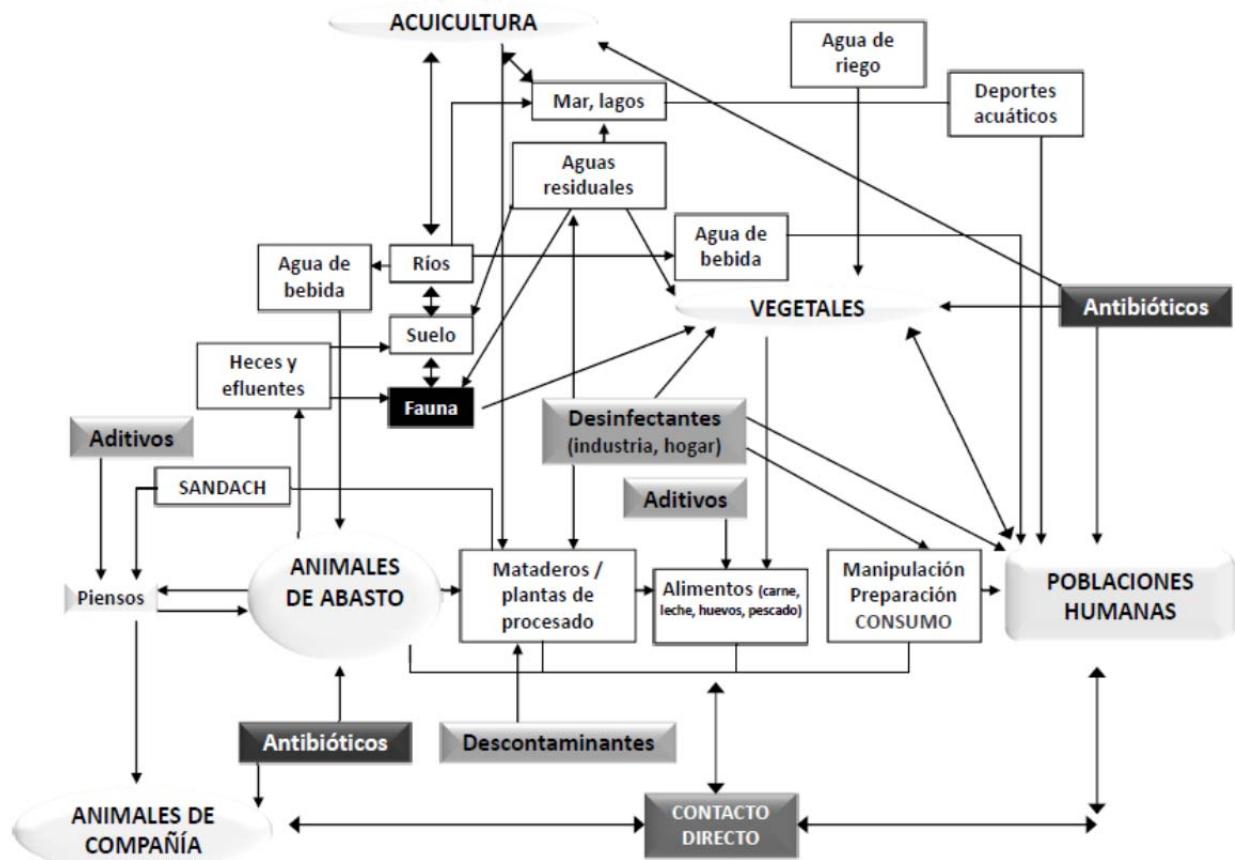


Figura 6. Epidemiología de la resistencia bacteriana a los antibióticos (adaptada de Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Los microorganismos resistentes, tanto patógenos como alterantes, pueden transmitirse a los seres humanos por contacto directo o por el consumo de alimentos contaminados. Los alimentos son la vía más importante, desde el punto de vista cuantitativo, de transmisión de bacterias resistentes a antibióticos y de genes de resistencia de los animales al hombre, especialmente cuando no se respetan unas adecuadas prácticas higiénicas a lo largo de la cadena alimentaria (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000). La transferencia de bacterias con resistencia a antibióticos desde los animales al hombre por contacto directo se ha demostrado en el caso de *Enterococcus* resistente a vancomicina y a estreptograminas, así como en *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (European Parliament, 2006; Weese *et al.*, 2006). Además, las bacterias resistentes pueden transferir sus genes de resistencia horizontalmente a otras bacterias en diferentes ecosistemas, como se ha indicado con anterioridad, hecho que complica grandemente la epidemiología de la resistencia a antibióticos.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Existen algunas situaciones particulares que favorecen la emergencia a resistencia antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Así, la **resistencia cruzada** se produce cuando un compuesto antimicrobiano selecciona (por presión selectiva) un gen que expresa mecanismos de resistencia comunes a diferentes compuestos. La **protección cruzada** tiene lugar cuando la adaptación a un antimicrobiano modifica la respuesta fisiológica de la bacteria (por ejemplo disminuyendo su ritmo de crecimiento), lo que da como resultado una disminución temporal en la susceptibilidad a varios antimicrobianos no relacionados. La **co-resistencia** acontece cuando un antimicrobiano selecciona un gen que codifica para resistencia a dicho compuesto, y este gen está físicamente unido a otro gen que expresa mecanismos de resistencia a otros antimicrobianos. Ambos genes están incluidos en elementos genéticos mayores (plásmidos, transposones, integrones) y son transferidos y expresados de forma conjunta.

En ocasiones, el empleo de un antimicrobiano puede seleccionar clones que son resistentes a un rango de antimicrobianos diferentes, como consecuencia de las características específicas de las cepas (por ejemplo estructura de la pared celular). Estas **variantes clonales** son consideradas como responsables de los cambios en la prevalencia de resistencia a antibióticos en los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, por ejemplo *Salmonella Typhimurium* DT 104 (Doublet *et al.*, 2008). Finalmente, cabe mencionar la **respuesta SOS**, que consiste en la activación de un conjunto de genes cuya función es reparar el ADN ante cualquier daño. Esta respuesta regula la activación de los integrones, que son estructuras genéticas complejas capaces de captar, acumular y reubicar/reorganizar genes de resistencia, haciendo que éstos comiencen a expresarse de forma eficiente y que la bacteria se haga resistente a diferentes compuestos simultáneamente (Guerin *et al.*, 2009).

En el contexto planteado, está clara la necesidad del desarrollo de nuevos antibióticos. Sin embargo, paradójicamente, en los últimos años se han incorporado al arsenal terapéutico muy pocas moléculas con actividades nuevas o nuevas familias de antibióticos. Las grandes multinacionales farmacéuticas dedican menos del 2% de sus recursos de investigación al desarrollo de nuevos antibacterianos, principalmente, aunque no exclusivamente, por resultar menos rentables que otros fármacos, como los empleados para tratar enfermedades crónicas (Capita y Alonso-Calleja, 2013; ECDC/EMEA, 2009). Por

ejemplo, en los EE.UU. la aprobación de nuevos antibióticos (nuevas entidades moleculares) por la FDA (*Food and Drug Administration*) ha caído en picado a lo largo de los últimos 30 años, pasando de 16 compuestos en el periodo 1983-1987 a únicamente dos entre 2008 y 2012 (Figura 7).

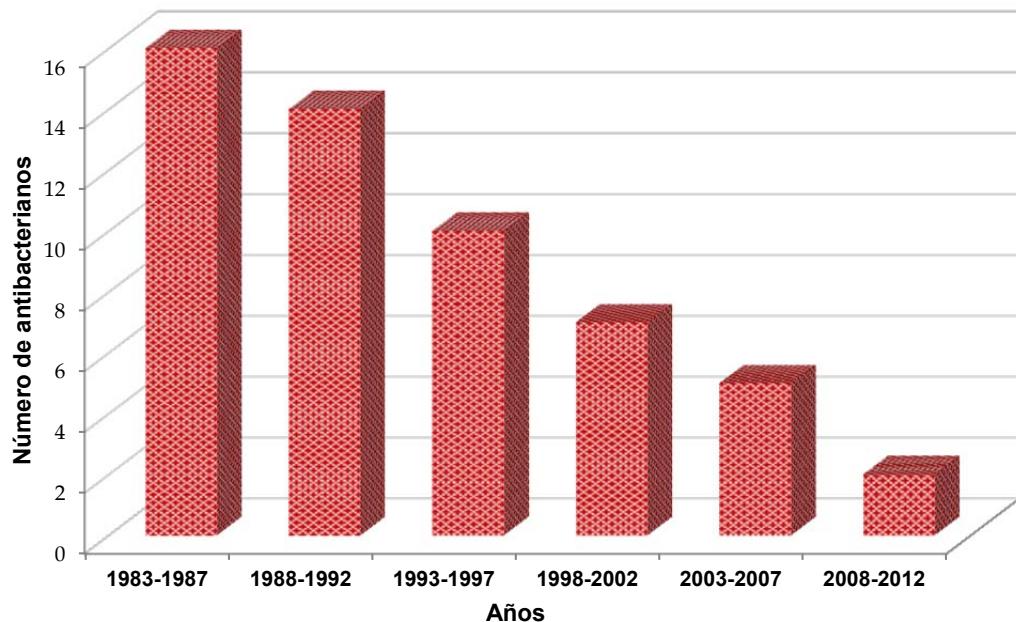


Figura 7. Número de antibióticos aprobados por la FDA en los últimos 30 años (Spellberg, 2012).

1.2.6. Consecuencias de la resistencia a antibióticos

Las infecciones provocadas por bacterias resistentes responden con dificultad a los tratamientos farmacológicos, hecho que se traduce en un incremento del coste sanitario a la vez que tiene importantes repercusiones por lo que a morbilidad y mortalidad se refiere (Rice, 2009). Así, estas infecciones suponen un coste anual importante a los sistemas de salud, oscilando las estimaciones entre 900 millones de euros en la UE (ECDC/EMEA, 2009) y 20.000 millones de dólares en los EE.UU. (CDC, 2013).

Si bien es difícil cuantificar con precisión el impacto de la resistencia a antibióticos en términos de morbilidad y mortalidad, puesto que la resistencia constituye un problema adicional a la infección inicial, es incuestionable el hecho de que las infecciones por cepas

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

resistentes están asociadas con una mayor duración de la enfermedad y con mayores probabilidades de hospitalización, de infecciones en otras localizaciones, recidivas, cronicidad y consecuentes infecciones oportunistas (Rice, 2009).

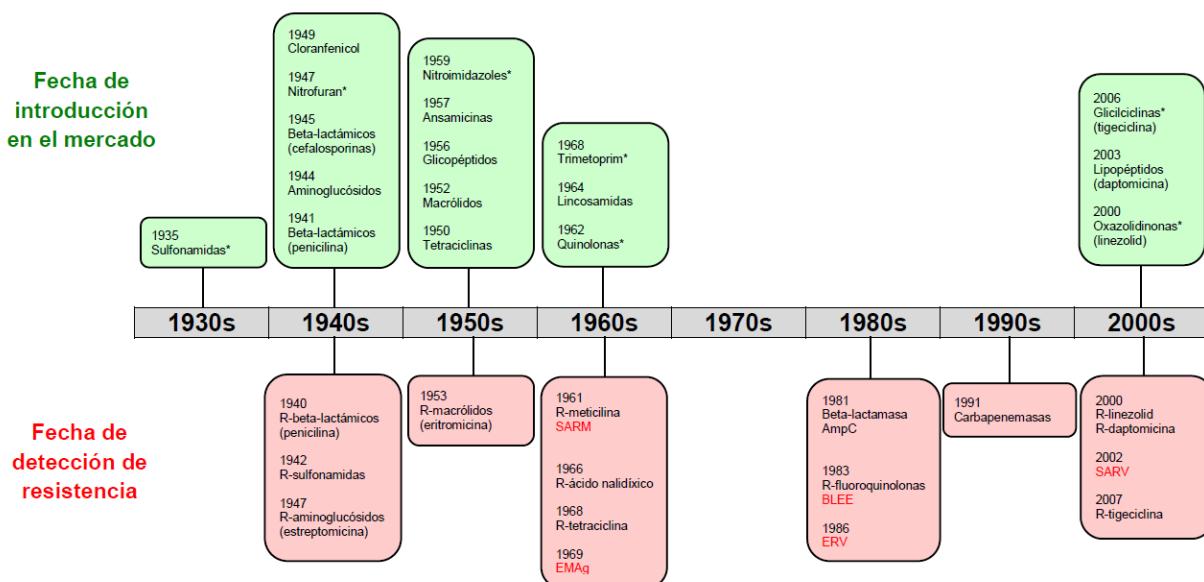
Asimismo, la tasa de letalidad duplica a la de las infecciones provocadas por cepas sensibles. En este sentido se ha estimado que las infecciones por bacterias con resistencias múltiples (principalmente *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. y *Pseudomonas aeruginosa*) provocan anualmente en la Unión Europea, Islandia y Noruega aproximadamente 400.000 casos de enfermedad, que están asociados con más de 2,5 millones de días de ingresos hospitalarios y causan más de 25.000 fallecimientos. Como comparación, señalar que cada año fallecen en torno a 48.000 personas en accidentes de tráfico en la misma área geográfica (ECDC, 2012; ECDC/EMEA, 2009).

Como se ha indicado con anterioridad, la dificultad de tratamiento de las infecciones provocadas por cepas resistentes a antibióticos incrementa las probabilidades de fallecimiento. Así, por ejemplo, en el caso de las septicemias provocadas por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA), la mortalidad duplica o triplica a la de las infecciones provocadas por cepas sensibles a la meticilina (Cosgrove et al., 2003). Asimismo, se han observado complicaciones e incremento de mortalidad en las infecciones provocadas por cepas de *Salmonella* y *Campylobacter* resistentes a antibióticos, así como en las causadas por enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE) (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Por otro lado, recientemente se ha descrito la relación entre resistencia a antibióticos y virulencia. Los genes de virulencia (por ejemplo aquéllos asociados con la producción de enterotoxinas) y los genes de resistencia a antibióticos pueden estar físicamente unidos en los mismos elementos genéticos móviles, transfiriéndose y expresándose de forma conjunta (Carlson et al., 2007; Doyle y Erickson, 2006). En otras ocasiones un mismo gen está relacionado tanto con la virulencia como con la resistencia a antibióticos (EFSA, 2008a). En cualquier caso, todo incremento de la virulencia en bacterias patógenas supone un peligro adicional, pudiendo afectar negativamente al resultado del tratamiento.

1.2.7. Tendencias de la resistencia a antibióticos

Las primeras descripciones de resistencia a los antibióticos se produjeron poco después del descubrimiento de la penicilina, en 1928, por parte de Sir Alexander Fleming (1881-1955). De hecho, ya en su Discurso de Recepción del Premio Nobel en 1945, Fleming señaló que la exposición de *Staphylococcus aureus* a dosis subletales de penicilina en el laboratorio provoca la selección de células resistentes, sugiriendo que lo mismo podría ocurrir en el organismo. De hecho, pocos años después del empleo de la penicilina como agente terapéutico, más del 50% de las cepas de *S. aureus* de origen clínico dejaron de ser susceptibles al antibiótico (Alanis, 2005; Capita González, 2013). Esta situación se ha repetido sucesivamente y así, la puesta en el mercado de un antibiótico ha ido seguida de la aparición de bacterias resistentes al mismo (Figura 8).



SARM, *S. aureus* resistente a meticilina; EMAg, enzimas modificantes de aminoglucósidos; BLEE, beta-lactamasas de espectro extendido; ERV, enterococos resistentes a vancomicina; SARV, *S. aureus* resistente a vancomicina.

Figura 8. Fechas de puesta en el mercado de los principales antibióticos (se incluyen también los antimicrobianos de naturaleza sintética, marcados con asterisco) y fechas de aparición de resistencias (R) a los mismos (adaptada de Torres Manrique, 2012).

La prevalencia de resistencia a antibióticos ha aumentado a un ritmo muy acusado en los últimos años, tal y como ponen de manifiesto los diferentes sistemas de vigilancia epidemiológica. En las Figuras 9-13 se muestran los porcentajes de cepas de *Escherichia*

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

coli y *Enterococcus* spp. resistentes a algunos antibióticos de importancia clínica en los años 2009 y 2013 en la Unión Europea. De la observación de las figuras señaladas se deduce que cuatro años han sido suficientes para producir incrementos notables en la prevalencia de la resistencia a antibióticos de estos grupos bacterianos en la Unión Europea.

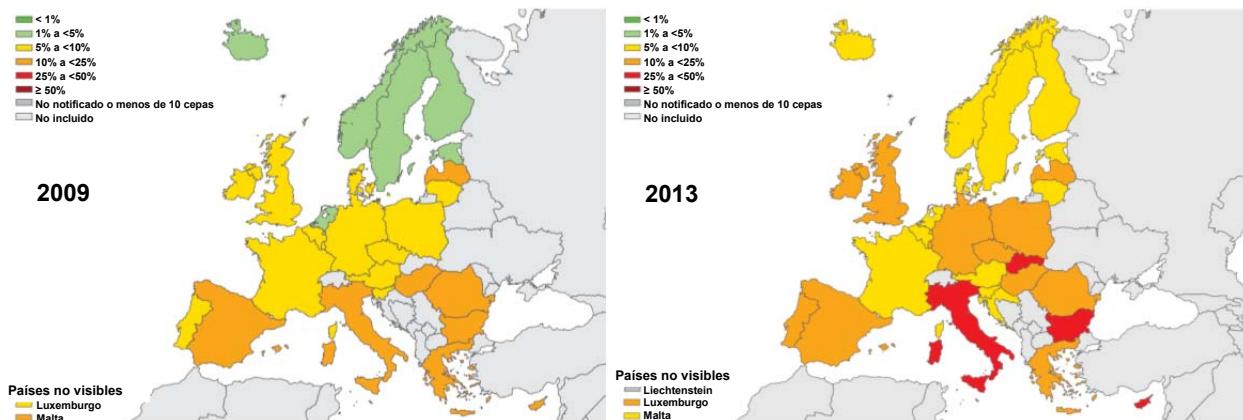


Figura 9. Proporción de cepas de *Escherichia coli* de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a cefalosporinas de tercera generación en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).

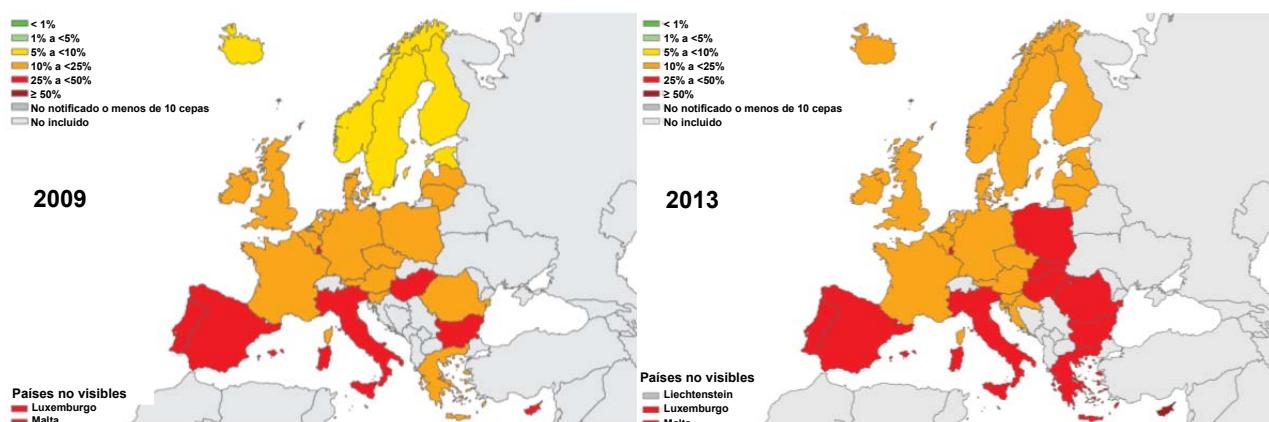


Figura 10. Proporción de cepas de *Escherichia coli* de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a fluoroquinolonas en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).

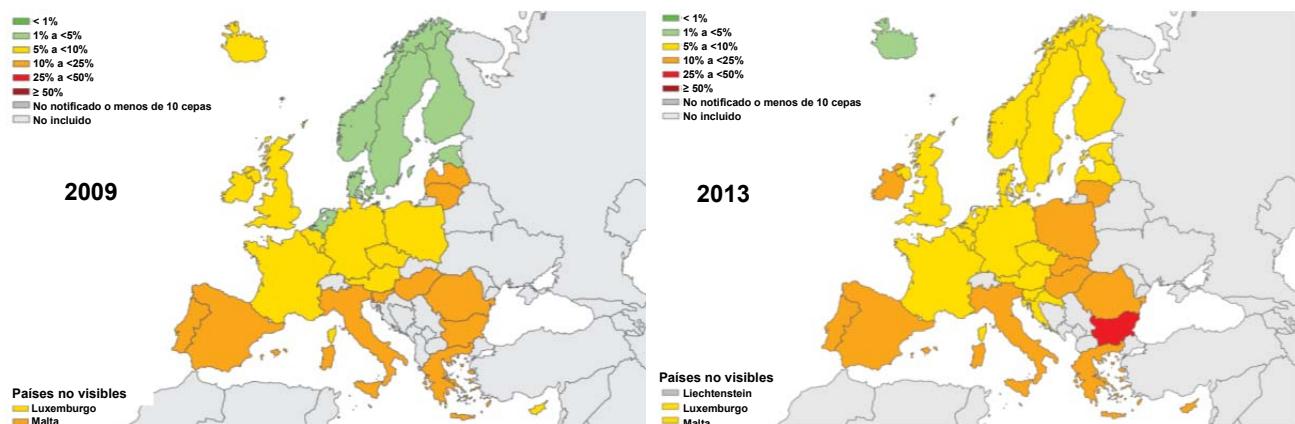


Figura 11. Proporción de cepas de *Escherichia coli* de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a aminoglucósidos en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).

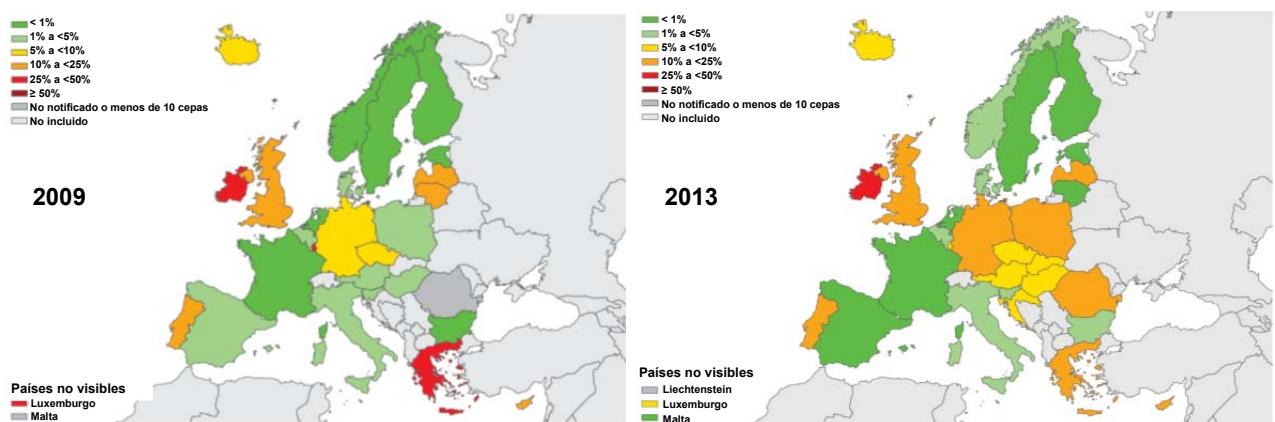


Figura 12. Proporción de cepas de *Enterococcus faecium* de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) resistentes a vancomicina en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

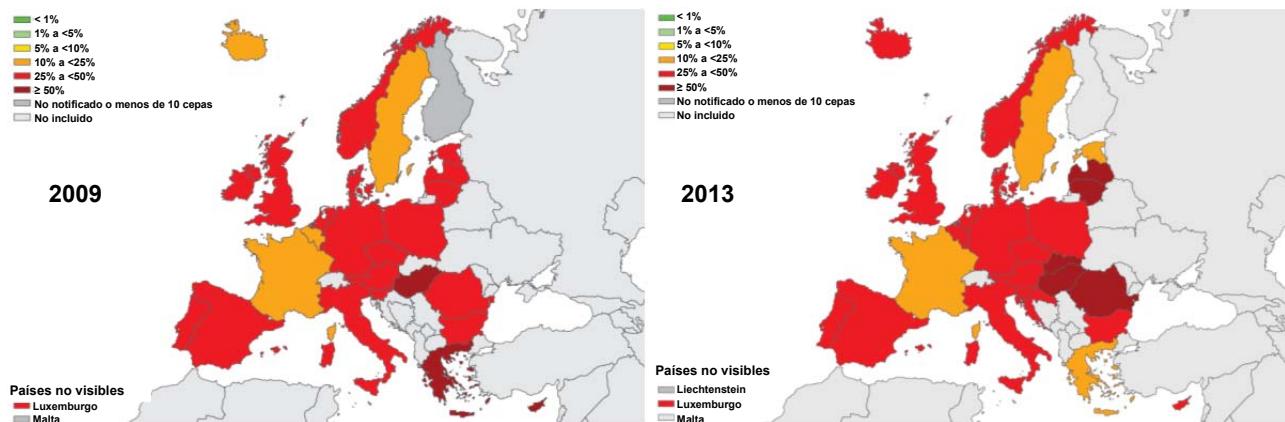


Figura 13. Proporción de cepas de *Enterococcus faecalis* de origen clínico (responsables de infecciones humanas invasivas) con resistencia de alto nivel a aminoglucósidos en 2009 (izquierda) y 2013 (derecha) en la Unión Europea (ECDC, 2015).

Las estadísticas de los EE.UU. reflejan también un incremento de la resistencia a antibióticos a lo largo de las últimas décadas, tanto en bacterias responsables de infecciones nosocomiales como en las asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos (CDC, 2013).

Un motivo especial de preocupación lo constituye el marcado incremento que en los últimos años ha experimentado la prevalencia de cepas multirresistentes y, sobre todo, de microorganismos panresistentes (con resistencia a todos los antibióticos disponibles), que suponen uno de los principales desafíos sanitarios del Siglo XXI (European Parliament, 2006; WHO, 2009). En este contexto, la Organización Mundial de la Salud ha elaborado un proyecto de plan de acción mundial para combatir la resistencia a antimicrobianos que fue presentado en su 68^a Asamblea Mundial de la Salud, celebrada en mayo de 2015.

2.- INTERÉS DEL ESTUDIO DE *Escherichia coli* Y *Enterococcus* spp. EN EL ESCENARIO DE LA ADQUISICIÓN DE SUSCEPTIBILIDAD REDUCIDA A LOS ANTIMICROBIANOS

Escherichia coli y *Enterococcus* spp. son contaminantes comunes en la Industria Alimentaria (Pagedar *et al.*, 2012). Estas bacterias forman parte de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal de animales y seres humanos, y el conjunto de procesos que sufre la materia prima desde la producción primaria hasta la planta de procesado de alimentos ofrece numerosos puntos de entrada de los microorganismos en la cadena alimentaria.

Por lo que respecta a *E. coli*, la mayoría de las cepas son apatógenas y consideradas como meros indicadores de una higiene deficiente y malas condiciones sanitarias (contaminación fecal). Sin embargo, entre el 10% y el 15% de las cepas de *E. coli* pertenecen a serotipos patógenos oportunistas (Barnes y Gross, 1997). Así, en el año 2013 se produjeron en la Unión Europea 5.196 brotes de enfermedad transmitida por alimentos, que afectaron a 43.183 personas y provocaron 5.946 hospitalizaciones y 11 fallecimientos (EFSA-ECDC, 2015a). *Escherichia coli* fue identificada como el agente etiológico de 75 brotes (1,44% del total), que estuvieron asociados con 635 casos de enfermedad y 106 hospitalizaciones. Esta bacteria es también un motivo de preocupación en el sistema sanitario, donde se sitúa entre los microorganismos implicados con mayor frecuencia en infecciones nosocomiales (Hamadi *et al.*, 2008). Asimismo, se trata de la bacteria Gram-negativa más frecuentemente asociada con infecciones extraintestinales, incluyendo infecciones superficiales (heridas), del tracto urinario, neumonía, meningitis o septicemia.

En relación con *Enterococcus*, diferentes especies, principalmente *E. faecalis* y, en segunda instancia, *E. faecium*, han emergido en las últimas décadas como causa frecuente de infecciones hospitalarias, principalmente septicemias, endocarditis, infecciones del tracto urinario, infecciones abdominales e infecciones cutáneas (Gilmore *et al.*, 2014). Otras especies implicadas ocasionalmente en infecciones humanas son *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. munda*, *E. dispar* y *E. raffinosus* (Gilmore *et al.*, 2014).

Dentro del género *Enterococcus* destacan las cepas resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE), que pueden transmitirse al hombre por ingestión o

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

manipulación de los alimentos contaminados (ECDC/EFSA/EMEA/SCENIHR, 2009; European Parliament, 2006; Peters *et al.*, 2003; Weese *et al.*, 2006). Las cepas de VRE suponen un desafío en la práctica clínica, ya que este glucopéptido se emplea habitualmente como última opción en el tratamiento de las infecciones provocadas por cepas de enterococos con resistencias múltiples. Entre 1990 y 1997, la prevalencia de resistencia a la vancomicina en cepas aisladas de infecciones hospitalarias oscilaba entre el 1% y el 15%, aproximadamente. Desde el año 2000 se ha observado un marcado incremento de la resistencia a este antibiótico, que actualmente afecta a más del 25% de los aislamientos de enterococos de origen clínico (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Por otro lado, la habilidad de *E. coli* y *Enterococcus* spp. para adquirir, almacenar y distribuir genes de resistencia a antibióticos es bien conocida, y se basa en los eficientes mecanismos de transferencia horizontal que han desarrollado estos microorganismos a lo largo de los años (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Por ello, estos grupos bacterianos actúan como reservorio de genes de resistencia, lo que, además de ser un motivo de preocupación en el contexto de la Salud Pública (existe una alta probabilidad de transferencia a otras especies bacterianas, incluso no relacionadas), permite la utilización de ambos grupos como microorganismos centinela o indicadores de resistencia a antibióticos (EFSA-ECDC, 2015b; SCENIHR, 2009).

Finalmente, por lo que respecta concretamente a *E. coli*, señalar que se trata de una bacteria empleada habitualmente como modelo de experimentación en los estudios de laboratorio (Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández, 2002), por lo que su empleo está aconsejado a la hora de comparar los resultados obtenidos en diferentes investigaciones. Todo ello justifica el empleo de *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp., representantes de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente, en el presente Trabajo de Investigación.

3.- CARNE Y PREPARADOS CÁRNICOS

3.1.- PRINCIPALES DEFINICIONES

A continuación se incluyen algunas definiciones de interés en relación con la carne y productos cárnicos, así como la normativa de procedencia.

- **Canal:** cuerpo de un animal una vez sacrificado y faenado (Reglamento (CE) Nº 853/2004; OJEU, 2004a).
- **Carne fresca:** carne que no se ha sometido a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la envasada al vacío o en atmósfera controlada (Reglamento (CE) Nº 853/2004; OJEU, 2004a).
- **Despojos:** carne fresca que no sea de la canal, incluidas las vísceras y la sangre (Reglamento (CE) Nº 853/2004; OJEU, 2004a).
- **Carne picada:** carne deshuesada que ha sido sometida a una operación de picado en trozos y que contiene menos de 1 % de sal (Reglamento (CE) Nº 853/2004; OJEU, 2004a).
- **Derivados cárnicos:** productos alimenticios preparados total o parcialmente con carnes o menudencias de los animales citadas en el punto 1.1 del anexo I del Reglamento (CE) 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 alimentos de origen animal) y sometidos a operaciones específicas antes de su puesta al consumo. Serán preparados o productos cárnicos según lo establecido en la normativa de aplicación (RD 474/2014; BOE, 2014).
- **Preparados de carne:** carne fresca, incluida la troceada, a la que se han añadido productos alimenticios, condimentos o aditivos, o que se ha sometido a transformaciones que no alteran la estructura interna de la fibra muscular ni, por lo tanto, eliminan las características de la carne fresca. Es un producto con cierto grado de elaboración pero que, aún así, mantiene un aspecto similar a la carne fresca (Reglamento (CE) Nº 853/2004; OJEU, 2004a).

Dentro de ellos podemos distinguir:

- **Los preparados cárnicos frescos:** aquellos elaborados con carne de una o

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

varias de las especies animales autorizadas, con o sin grasa, picadas, adicionadas con sal, condimentos, especias, otros productos alimenticios y aditivos, no sometidos a tratamiento de desecación, cocción o salazón, embutidos o no (RD 1376/2003; BOE, 2003), por ejemplo salchichas o hamburguesas.

- **Los preparados cárnicos crudos-adobados:** aquellos elaborados con piezas cárnica enteras o trozos identificables, según la clasificación comercial tradicional de carnicería, o por trozos de carne que no reúnan dichos requisitos de identificación, pertenecientes a las especies animales autorizadas, adicionados o no de otros productos alimenticios, sometidos a la acción de la sal, especias, condimentos y/o aditivos que les confieren un aspecto y sabor característicos, recubiertos o no de pimentón u otros productos, sin sufrir un proceso de curación posterior (RD 1376/2003; BOE, 2003), por ejemplo lomo adobado.
- **Productos cárnicos:** los productos elaborados a partir de carne o con carne mediante un tratamiento que permita comprobar la desaparición de las características de la carne fresca en la parte central de la superficie de corte. Se encuentran aquí incluidos los embutidos de sangre, entre los que se consideran las morcillas y la butifarra negra, y los productos cárnicos con un contenido mínimo de carne (RD 1376/2003; BOE, 2003).

3.2.- PRODUCCIÓN DE CARNE

La producción de carne en el mundo ha experimentado un crecimiento moderado en los últimos años, siendo este incremento más significativo en África, Asia y América que en Europa, donde el crecimiento es más sostenido (Tabla 4, Figura 14).

Tabla 4. Producción de carne en el mundo (FAOSTAT, 2015).

PRODUCCIÓN MUNDIAL (MILLONES DE TONELADAS)	AÑO					
	2008	2009	2010	2011	2012	2013
CARNE DE AVES DE CORRAL	96,2	95,1	99,2	103,0	106,1	108,6
CARNE DE POLLO	80,8	83,4	87,3	90,7	93,4	96,1
CARNE DE PORCINO	102,9	105,0	107,5	108,0	111,3	113,0
CARNE DE VACUNO	62,5	62,5	63,0	62,7	63,0	63,9
CARNE DE OVINO-CAPRINO	13,3	13,3	14,7	13,2	13,5	13,9
CARNE TOTAL	280,9	285,7	294,9	297,4	304,8	310,3

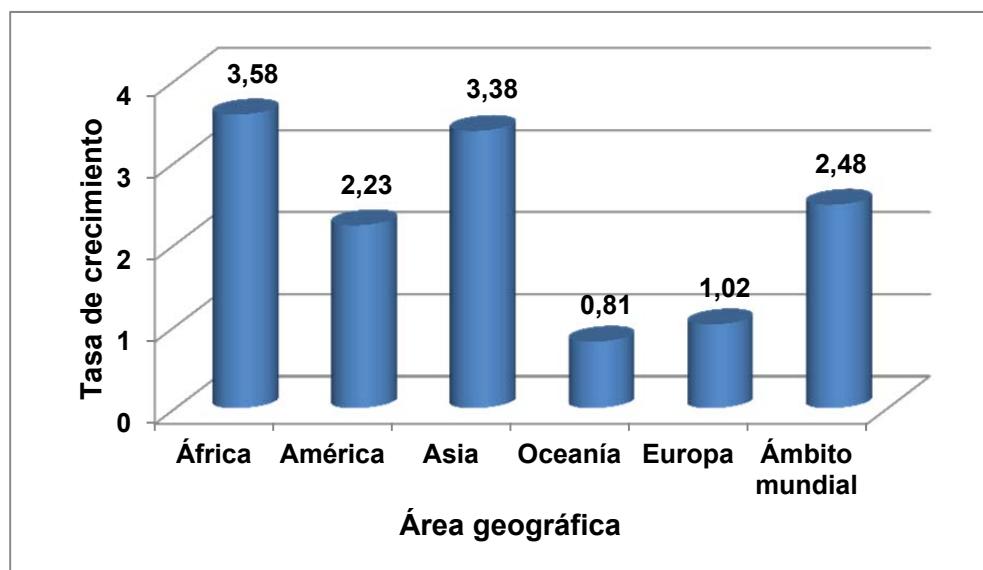


Figura 14. Tasa de crecimiento (%) de la producción media de carne en el periodo 2000-2013 (FAOSTAT, 2015).

Los principales productores de carne del mundo son, por este orden, China, EE.UU., Brasil y Alemania. Por lo que respecta a las especies, la carne de cerdo, con 113 millones de toneladas, es la que ocupa el primer lugar, siendo los principales productores China (50% de la producción mundial), EE.UU. (10%), Alemania (5,3%) y España (3,4%). La Unión Europea, considerada en conjunto, es el segundo productor mundial de este tipo de carne, con un 24% del total. El segundo puesto por especies corresponde a la carne de pollo, con 96,1 millones de toneladas, siendo los principales productores EE.UU., China, Brasil y la Federación Rusa (datos del año 2013; FAOSTAT, 2015).

En Europa, la producción de carne ha aumentado de manera regular en los últimos años, hasta alcanzar la cifra de 58 millones de toneladas en el año 2013 (Tabla 5). El primer lugar lo ocupa la carne de cerdo, con más de 27 millones de toneladas, seguido de la carne de pollo con 16 millones de toneladas. La producción de carne de pollo crece cada año mientras la de porcino se ha estancado y la producción de carne de vacuno y ovino-caprino desciende ligeramente. En la Unión Europea el incremento de la producción de carne no ha sido regular, observándose en los años 2012 y 2013 una ligera disminución (Tabla 6).

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Tabla 5. Producción de carne en Europa (FAOSTAT, 2015).

PRODUCCIÓN EN EUROPA (MILLONES DE TONELADAS)	AÑO					
	2008	2009	2010	2011	2012	2013
CARNE DE AVES DE CORRAL	14,3	15,4	16,0	16,8	17,7	18,1
CARNE DE POLLO	12,0	13,1	13,7	14,2	15,4	15,9
CARNE DE PORCINO	26,5	26,1	27,1	27,5	27,2	27,1
CARNE DE VACUNO	11,0	11,0	11,0	10,8	10,4	10,1
CARNE DE OVINO-CAPRINO	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2
CARNE TOTAL	54,4	54,9	56,8	57,6	57,9	58,0

Tabla 6. Producción de carne en la Unión Europea (FAOSTAT, 2015).

PRODUCCIÓN EN LA UNIÓN EUROPEA (MILLONES DE TONELADAS)	AÑO					
	2008	2009	2010	2011	2012	2013
CARNE DE AVES DE CORRAL	11,1	11,7	11,9	12,2	12,6	12,8
CARNE DE POLLO	8,7	9,4	9,6	9,9	10,3	10,5
CARNE DE PORCINO	22,8	22,4	23,1	23,2	22,8	22,4
CARNE DE VACUNO	8,1	8,0	8,1	8,1	7,7	7,4
CARNE DE OVINO-CAPRINO	1,4	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2
CARNE TOTAL	43,9	43,9	45,0	45,4	45,0	44,4

La producción de ganado porcino es la primera actividad cárnica española (Tabla 7), y representa el 63% de la producción total de carne. Con ese volumen de producción, España se consolida en estos últimos años como el cuarto mayor productor de carne de porcino del mundo. En Europa, es el segundo en producción, representando el 16% del total de la UE, por delante de Francia (9%) y Polonia (8%).

En segundo lugar en cuanto a producción en España se encuentra la carne de ave (el 97,5% se corresponde con carne de pollo). Dentro de la Unión Europea, España es uno de los principales productores de carne de pollo (11,32% del total de la UE) junto al Reino Unido, Francia y Polonia, aunque la producción en nuestro país ha descendido ligeramente en los últimos años, mientras que en el Reino Unido y Polonia crece con fuerza el sector.

La carne de vacuno ocuparía el tercer lugar en cuanto a volumen de producción, con el 16% de la producción nacional de carnes, si bien en esta especie España está más

alejada de los puestos de cabeza de la producción mundial, liderada por los EE.UU. y Brasil. España representa el 8% de la producción europea de carne de vacuno, por detrás de Francia (20%), Alemania (15%), Italia (13%) y el Reino Unido (12%).

Algo parecido ocurre con la carne de ovino, cuya producción sufre una tendencia descendente desde hace varios años. Aún así, España es el segundo productor europeo de carne de ovino y caprino, con casi un 13,6 % del total, por detrás del Reino Unido (31%) y por delante de Francia (13,2%) y Grecia (12,2%) (datos del año 2013; FAOSTAT, 2015).

Tabla 7. Producción de carne en España (FAOSTAT, 2015).

PRODUCCIÓN EN ESPAÑA (MILLONES DE TONELADAS)	AÑO					
	2008	2009	2010	2011	2012	2013
CARNE DE AVES DE CORRAL	1,10	1,20	1,14	1,23	1,22	1,20
CARNE DE POLLO	1,08	1,17	1,11	1,20	1,19	1,17
CARNE DE PORCINO	3,48	3,29	3,37	3,46	3,46	3,43
CARNE DE VACUNO	0,65	0,59	0,61	0,60	0,59	0,58
CARNE DE OVINO-CAPRINO	0,16	0,13	0,14	0,14	0,13	0,12
CARNE TOTAL	5,39	5,21	5,26	5,43	5,40	5,33

En cuanto a la producción de elaborados cárnicos, hay que indicar que España, con 1,3 millones de toneladas anuales, se sitúa en cuarto lugar en la Unión Europea, por detrás de Alemania, Italia y Francia (ANICE, 2015).

La industria encargada del procesado y conservación de la carne es un sector importante en España y está formada por mataderos, salas de despiece e industrias de elaborados. El número total de establecimientos del sector es de 4.654, lo que representa aproximadamente el 14% del total de la industria alimentaria y un 22,74% en inversión en activos. El tejido industrial está constituido básicamente por pequeñas y medianas empresas (MAGRAMA, 2015a, b).

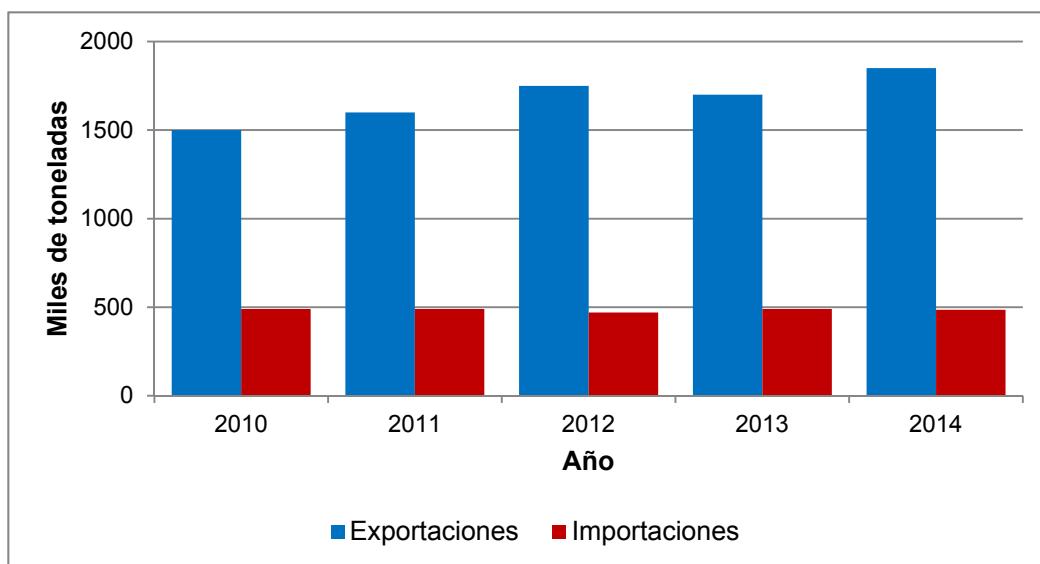


Figura 15. Comercio exterior del sector cárnico en España (MAGRAMA, 2015c, d).

Un dato muy relevante es que, en el primer semestre de 2015, la industria cárnica exportó, a mercados de todo el mundo, 1,71 millones de toneladas de productos cárnicos de todo tipo, por valor de 4.350 millones de euros, con una balanza comercial muy positiva y una tasa de cobertura del 399% (en 2010 la tasa de cobertura fue del 229%, en 2011 se elevó hasta un 283%, en 2012 fue del 345% y en 2013 del 356%) (Figura 15) (MAGRAMA, 2015a).

Pese a estos avances importantes, se necesita completar la eficacia exportadora con instrumentos nuevos que se correspondan con el potencial del sector, para aumentar la competitividad como país, ya que en los mercados internacionales no solo se enfrentan las empresas contra sus competidores, sino que juegan un destacado papel los modelos de gestión de cada país en el apoyo a sus operadores (ANICE, 2015).

3.3.- CONSUMO DE CARNE

El consumo medio de carne en el **ámbito mundial** en el año 2012 fue de 42,9 kg/persona y año, cifra que se corresponde con la estimada en 2013 y la prevista para 2014. En los países desarrollados, el consumo medio per cápita en 2012 fue de 76,2 kg y en los países en desarrollo de 33,5 kg, previéndose una tendencia al incremento durante las próximas décadas (FAO, 2014a, b).

El informe “*World Livestock 2011: Livestock in food security*” (FAO, 2011) estima un aumento del consumo de carne hasta llegar a duplicarse en 2050. En la mayor parte de los países desarrollados se ha alcanzado el nivel de saturación, por lo que el aumento en el consumo de carnes y derivados cárnicos va a producirse principalmente en los países en vías de desarrollo, en alguno de los cuales el consumo no alcanza los 10 kg/persona y año en el momento actual. La carne de ave se presenta como el sector que sustenta el crecimiento del consumo de carne (FAO 2014c).

En la Tabla 8 se muestra la evolución que, desde el año 1992 hasta el año 2014, ha experimentado el consumo de carne estimado como proporción de energía que aporta en la dieta en distintas áreas del mundo. Se aprecia la pobre contribución de la carne a la energía de la dieta en África y Asia; se observa también el importante aumento en el porcentaje de energía diaria aportado por la carne que se ha producido en los países emergentes, mientras que en los países desarrollados se ha mantenido estable.

Tabla 8. Proporción (%) de la carne y despojos en el suministro de energía de la dieta (FAO, 2014a).

ÁREA GEOGRÁFICA	AÑO		
	1992	2002	2014
PAISES EN VÍAS DE DESARROLLO	5,4	6,7	17,6
ÁFRICA	3,4	3,4	3,5
ASIA	5,3	6,8	7,9
LATINOAMÉRICA Y CARIBE	8,3	10,2	16,1
PAÍSES DESARROLLADOS	11,3	10,8	10,8
OCEANÍA	10,8	10,8	10,0
ARGENTINA	18,0	17,0	18,0
AUSTRALIA	16,3	16,1	15,3
ESPAÑA	12,3	14,4	13,3
ESTADOS UNIDOS	11,9	11,9	12,2
MUNDO	7,0	7,7	16,9

Se incluyen datos de carne y despojos de bovino, ovino, caprino, cerdo, aves y otras carnes.

El **preparado cárneo** más conocido y de consumo más generalizado en el mundo es la hamburguesa, alimento estrella de los restaurantes de “comida rápida”, lugar en el que se produce el mayor consumo de este tipo de preparado. Cuando las grandes cadenas de

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

restaurantes “*fast food*”, desde los EE.UU., se extendieron a lo largo del planeta, ofreciendo un producto sin sorpresas, regular, rápido y barato, la hamburguesa se convirtió en un fenómeno económico y sociológico global. Además de adaptarse a las peculiaridades de cada país, en los últimos años ha sido capaz de colarse en la alta cocina y los restaurantes tradicionales, que la han incorporado a su carta.

América es el continente en el que más “comida rápida” se consume (47% del consumo global), seguida por Asia - Pacífico (36%), mientras que Europa ostenta apenas el 17% del consumo de este tipo de producto (Lago Moneo *et al.*, 2011).

El mayor consumo de hamburguesas actualmente se concentra en los EE.UU., con el 35% del consumo mundial, seguido de Japón y China. Los países emergentes están ejerciendo gran presión sobre el consumo global de este tipo de alimento. En Europa, son Alemania, Francia y el Reino Unido los principales consumidores, mientras España tan sólo participa con un 0,69 % del consumo mundial (Lago Moneo *et al.*, 2011)

El consumo per cápita de carne y productos cárnicos en la **Unión Europea** en 2013 alcanzó los 64,7 kg/persona y año, el nivel más bajo de los últimos 11 años. Sin embargo, las previsiones de la UE apuntan a un crecimiento a lo largo de la próxima década hasta llegar a los 66,1 kg/persona y año en 2023. Este crecimiento previsto estará sustentado por la carne de cerdo y pollo, por su menor precio, mientras que el consumo de carne de vacuno, ovino y caprino seguirá reduciéndose (European Commission, 2013).

Dentro de las **carnes frescas**, la de cerdo ocupa el primer puesto en el *ranking* de consumo en la Unión Europea, siendo los mayores consumidores Austria, Dinamarca y España, seguida de la carne de ave, cuyos mayores consumidores son el Reino Unido, Irlanda, Portugal, España y Francia. El tercer y cuarto puesto corresponden a la carne de vacuno y de ovino-caprino, respectivamente.

El consumo de carnes y derivados cárnicos en **España** ha sufrido una desaceleración a partir del año 2000. Concretamente a partir de 2013 se ha producido un descenso del consumo global de carne fresca en España, siendo esta disminución especialmente marcada en el caso de la carne de rumiantes (Figuras 16 y 17) (MAGRAMA, 2015d, e y f).

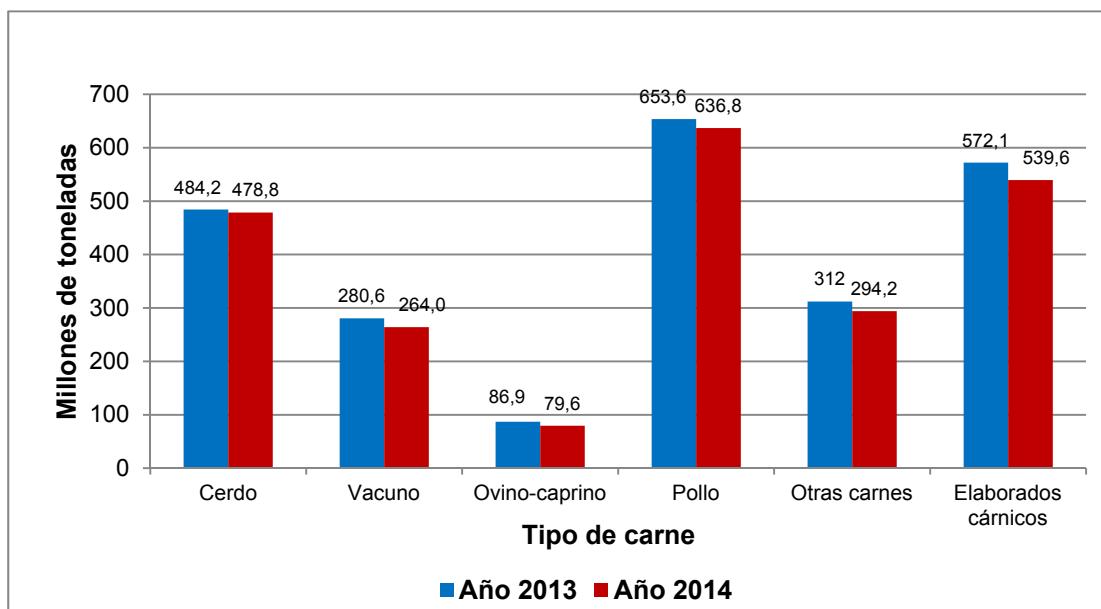


Figura 16. Comparativa consumo de carnes en 2013 y 2014 (MAGRAMA, 2015e, f, g).

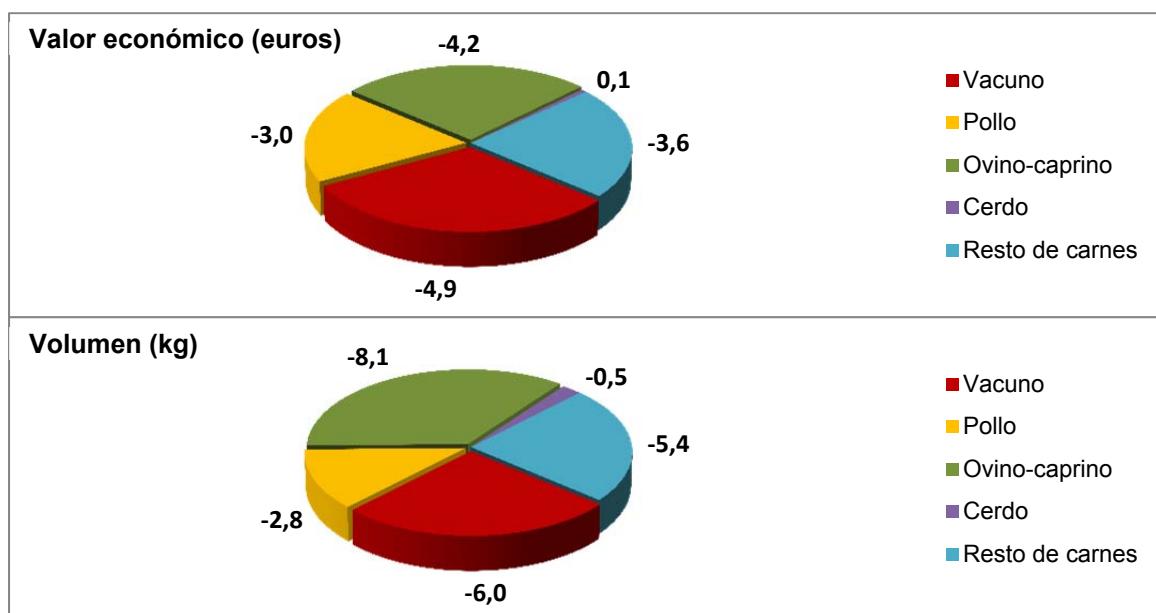


Figura 17. Variación (%) del consumo de carne 2014 respecto a 2013 (MAGRAMA, 2015f).

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

A pesar del descenso señalado, el consumo de carne en España ocupa un lugar destacado, suponiendo el 16% del gasto de los hogares. En términos absolutos, el consumo medio per cápita se sitúa en 55,67 kg/año.

Se observan variaciones importantes entre regiones relacionadas con la tradición, el poder adquisitivo y otros factores. La Rioja, Castilla y León y Aragón son las CC.AA. que registran mayores consumos de carne, mientras que Canarias, Andalucía y Murcia son las que presentan menores niveles de consumo (Figura 18).

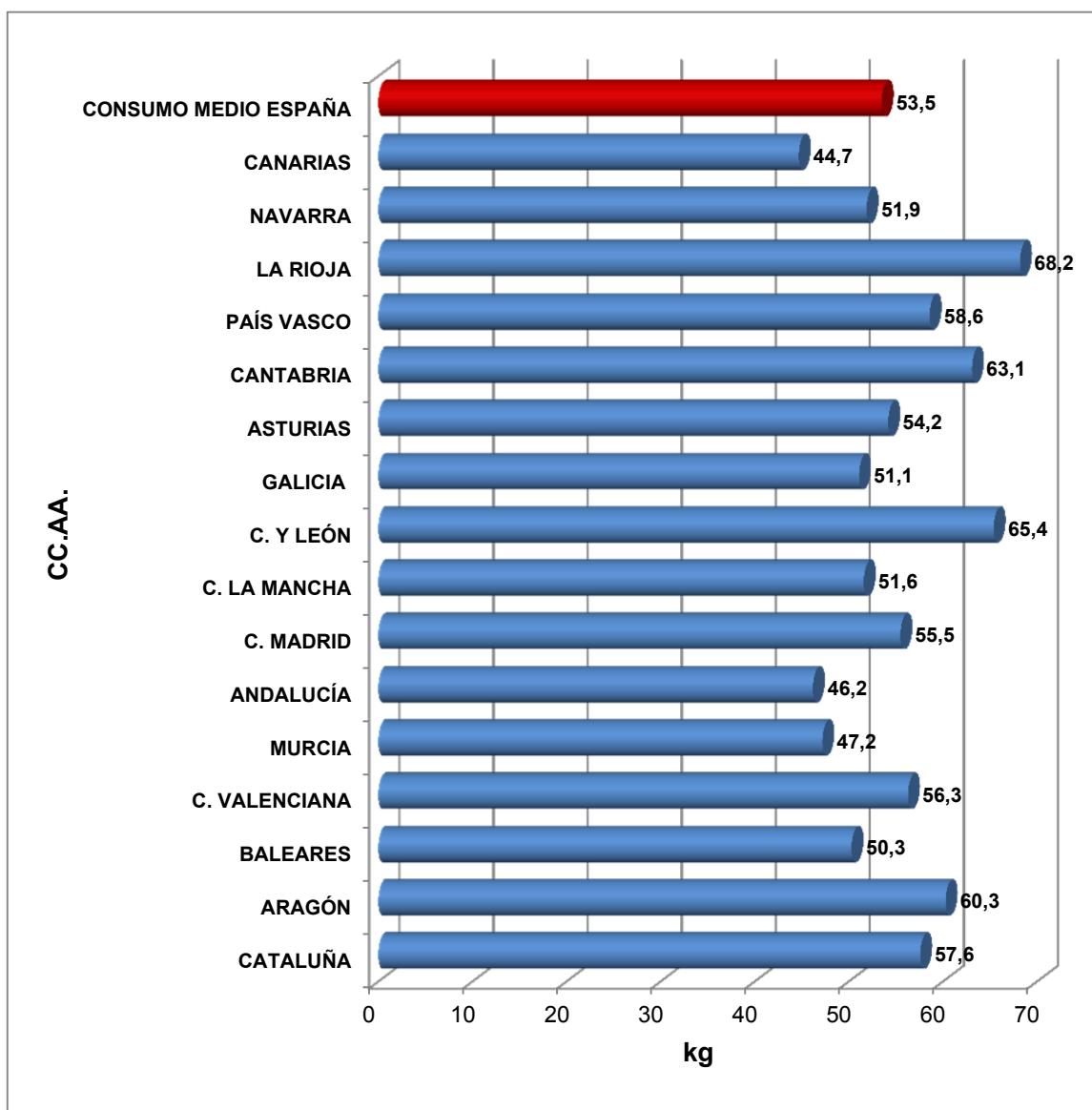


Figura 18. Consumo anual per cápita de carne en el hogar por CC.AA. (MAGRAMA, 2015e).

En el panel del consumo alimentario de España, dentro del sector de las carnes sólo aparecen contemplados los siguientes preparados cárnicos: salchichas frescas, cerdo adobado y salchichas congeladas, siendo, el consumo de estas últimas, anecdótico. En el periodo de enero 2014 a enero 2015 el consumo de estos preparados cárnicos frescos supuso un 4% del consumo total de carnes frescas en España, mientras en Castilla y León superó en 2 puntos la media nacional, alcanzando el 6% (Tabla 9). En las fuentes consultadas no se han encontrado datos sobre el consumo, en los hogares, de otros preparados de carne.

Tabla 9. Consumo de carne y productos cárnicos entre enero de 2014 y enero de 2015 (MAGRAMA, 2015g).

PRODUCTO	ESPAÑA		CASTILLA Y LEÓN	
	CANTIDAD (miles de kg)	CANTIDAD per cápita	CANTIDAD (miles de kg)	CANTIDAD per cápita
Carne total	2.497.995,09	55,67	163.181,35	65,56
Carne certificada	228.400,18	5,09	18.552,94	7,43
Carne fresca	1.849.391,63	41,21	128.686,30	51,69
salchichas frescas	28.421,33	0,65	2.425,92	0,67
vacuno	287.624,67	6,40	22.654,59	9,10
pollo	693.158,76	15,44	40.945,44	16,46
conejo	67.720,73	1,51	4.979,75	1,98
ovino-caprino	87.461,91	1,96	9.244,10	3,71
cerdo	530.438,94	11,82	38.618,18	15,52
cerdo adobado	45.461,20	1,02	5.611,57	2,25
cerdo ibérico	14.258,66	0,34	914,70	0,38
despojos	42.919,04	0,95	4.338,96	1,74
despojos cerdo	19.686,36	0,44	2.228,28	0,91
despojos vacuno	10.450,94	0,23	1.433,64	0,58
despojos pollo	7.868,36	0,18	367,38	0,16
otras carnes frescas	140.067,62	3,11	7.905,31	3,17
carne congelada	69.216,54	1,56	3.260,26	1,31
carne congelada de pollo	44.836,47	1,00	2.127,82	0,86
carne congelada de cerdo	10.093,89	0,23	424,13	0,18
carne congelada de vacuno	5.293,13	0,13	226,24	0,10
resto de carne congelada	8.993,07	0,80	482,06	0,19
salchichas congeladas	253,62	0,00	1,63	0,00
carne transformada	579.386,94	12,91	31.234,76	12,54

3.4.- PRINCIPAL NORMATIVA APLICABLE EN CARNE Y PREPARADOS CÁRNICOS

3.4.1. Normativa europea de aplicación directa

Reglamento (CE) Nº 178/2002, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (OJEU, 2002).

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 (OJEU, 2004b).

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 (OJEU, 2004a).

Reglamento (CE) Nº 854/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano (OJEU, 2004c).

Reglamento (CE) Nº 2073/2005, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (OJEU, 2005a).

- **Reglamento (CE) Nº 1441/2007** de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) Nº 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (OJEU, 2007).

Reglamento (CE) Nº 2074/2005, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 5 de diciembre de 2005, por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) Nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) Nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y (CE) Nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, se introducen excepciones a lo dispuesto en el Reglamento (CE) Nº

852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos (CE) N° 853/2004 y (CE) N° 854/2004 (OJEU, 2005b).

Reglamento (CE) N° 2075/2005 de la Comisión de 5 de diciembre de 2005 por el que se establecen normas específicas para los controles oficiales de la presencia de *Triquinella* en la carne (OJEU, 2005c).

- **Reglamento (UE) N° 216/2014**, de la Comisión, de 7 de marzo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) N° 2075/2005 (OJEU, 2014a).
- **Reglamento de ejecución (UE) N° 1114/2014**, de la Comisión, de 21 de octubre de 2014, que modifica el Reglamento (CE) N° 2075/2005 (OJEU, 2014b).

Reglamento de ejecución (UE) N° 1375/2015, de la Comisión, de 10 de agosto de 2015, por el que se establecen las normas específicas para los controles oficiales de la presencia de *Triquinella* en carne (OJEU, 2015).

3.4.2. Normativa estatal

Orden, de 14 de Enero de 1986, por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al mercado interior (BOE, 1986).

- Modificado por Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios (BOE, 2010).

Real Decreto 2551/1994, de 29 de Diciembre de 1994, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal y sanitarias aplicables a los intercambios e importaciones de productos no sometidos, con respecto a estas condiciones, a las normas específicas establecidas en el capítulo I del anexo A del Real Decreto 49/1993, de 15 de enero, y, por lo que se refiere a los patógenos, en el Real Decreto 1316/1992, de 30 de octubre (BOE, 1995).

Real Decreto 1376/2003, de 7 de Noviembre de 2003, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor (BOE, 2003).

Real Decreto 1976/2004, de 1 de Octubre de 2004, por el que se establecen las normas zoosanitarias aplicables a la producción, transformación, distribución e introducción de los productos de origen animal destinados al consumo humano (BOE, 2004).

Real Decreto 640/2006, de 26 de Mayo de 2006, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios (BOE, 2006).

Real Decreto 1338/2011, de 3 de octubre, por el que se establecen distintas medidas singulares de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios (BOE, 2011).

Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos (BOE, 2014).

4.- CARNE DE CAZA

Desde que nos separamos del último ancestro común con los chimpancés, los seres humanos hemos evolucionado de modo singular. Algunas hipótesis propuestas por los antropólogos apuntan a que los cambios en la disponibilidad alimentaria y el rendimiento en la búsqueda de los recursos a lo largo del tiempo ejercieron una influencia determinante en nuestra evolución (Leonard, 2003). Así, el consumo de carne por los primeros homínidos contribuyó a conformar la evolución del cerebro, del comportamiento y de la capacidad creadora de útiles (Blumenschine y Cavallo, 1992).

Por lo tanto, nuestra dieta constituye una diferenciación más que nos separa de los otros primates. No hay población humana hoy en el mundo que no siga un régimen más rico en calorías y sustancias nutritivas que el de nuestros parientes más próximos, los simios antropomorfos (Leonard, 2003; Leonard *et al.*, 2007). Tal y como ha sido señalado, “*Expresado en un contexto evolutivo, somos lo que comemos*” (Leonard, 2003).

La caza ayudó, durante cientos de miles de años, a la supervivencia y evolución la humanidad. En el transcurso de esta evolución, el hombre consiguió domesticar algunas especies animales y, por lo tanto, la caza dejó de ser una fuente necesaria de carne, si bien esta actividad se ha mantenido hasta nuestros días.

Hablar de caza en la actualidad, en el mundo desarrollado, no es sólo hablar de ocio, deporte que aprovecha los recursos naturales o turismo, es también hablar de una nueva actividad productiva, la ganadería cinegética con dos fines posibles, la producción de carne de caza siguiendo circuitos convencionales y la repoblación de terrenos cinegéticos (Fajardo *et al.*, 2009).

La caza silvestre comprende a los ungulados y lagomorfos silvestres, así como a otros mamíferos silvestres que se cazan para el consumo humano, incluidos los mamíferos que viven en territorios cerrados, en condiciones de libertad similares a las de los animales de caza silvestre, y a las aves silvestres cazadas para el consumo humano (Reglamento (CE) N° 853/2004; OJEU, 2004a).

La caza se puede dividir en *caza menor silvestre*, que incluye las aves de caza silvestres y los lagomorfos que viven en libertad y *caza mayor silvestre* que engloba a los

mamíferos terrestres salvajes que viven en libertad y que no entran en la definición de caza menor silvestre (Reglamento (CE) Nº 853/2004; OJEU, 2004a).

Por otra parte, el Código Alimentario Español (CAE, 2006) define carne de caza como “cualquier parte comestible, incluidos los despojos de una pieza de caza autorizada para el consumo humano”.

4.1.- CALIDAD DE LA CARNE DE CAZA

4.1.1. *Composición nutricional de la carne de caza*

La composición nutricional de la carne de caza es variable, y está determinada por factores como la especie, la edad, el sexo y el tipo de alimentación de los animales. Es por ello que resulta difícil valorar de manera general los aspectos nutritivos de este tipo de carne, pero es posible indicar algunas características comunes y otras peculiaridades interesantes que la diferencian de las carnes y los productos procedentes de los animales de abasto.

Las carnes, como grupo en general, tienen un alto contenido en agua, carecen de fibra e hidratos de carbono y son una buena fuente, con niveles medios superiores al 20%, de proteínas de alto valor biológico. Su contenido energético depende, principalmente, de la cantidad de grasa, que es muy variable. Puesto que los animales silvestres que viven en condiciones de libertad presentan, en general, una mayor actividad física que los animales criados en condiciones de estabulación, podemos indicar que aquellos son más magros y por tanto su porcentaje de proteína es mayor y el de grasa es inferior al de los animales de abasto. Hay también diferencias en las características de la grasa, destacando en los animales silvestres un mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 y valores ligeramente inferiores de grasa saturada, así como la presencia de antioxidantes naturales acumulados a partir de los alimentos que consumen (AECOSAN, 2015; Fajardo *et al.*, 2009; García, 2011; Ruiz *et al.*, 2015).

Como el resto de las carnes, la carne de caza es una buena fuente de minerales, destacando su elevado contenido en hierro hemo, fósforo, magnesio y potasio, superior al de la carne de animales de abasto. La carne de caza aporta cantidades sustanciales de vitaminas, especialmente del grupo B (B_1 , B_2 , B_6 , Niacina y B_{12}). El contenido en colesterol

es similar al del resto de carnes (AECOSAN, 2015; Fajardo *et al.*, 2009; García, 2011; Ruiz *et al.*, 2015).

Respecto a los caracteres organolépticos, la carne de caza silvestre no es un producto homogéneo, existiendo una gran variabilidad relacionada con las condiciones específicas de vida de los animales, lo que hace que cada pieza sea casi exclusiva. Como características peculiares de la carne de caza puede destacarse que, en general, tiene un sabor más intenso, un color más oscuro, un olor más fuerte, una menor terneza y un mayor grado de fibrosidad que la carne procedente de los animales de abasto, por lo que requiere un periodo de maduración más largo. Además, estas características condicionan el tipo de tratamiento culinario requerido (Fajardo *et al.*, 2009; García, 2011; Ruiz *et al.*, 2015).

4.1.2. Calidad higiénico-sanitaria de la carne de caza

Las peculiaridades en la obtención de carne de animales silvestres procedente de la actividad cinegética implican un elevado riesgo de contaminación y proliferación microbiana. Varias son las razones de ello. En primer lugar, el elevado pH alcanzado tras el *rigor mortis*, raramente inferior a 6, como resultado del agotamiento de las reservas de glucógeno muscular por el estrés sufrido y el ejercicio realizado durante la cacería, que tiene como consecuencia una baja producción de ácido láctico en el animal *post-mortem* (Ruiz *et al.*, 2015). Además, se produce, generalmente, un retraso importante en el eviscerado, desollado, refrigeración y transporte de las canales. Finalmente, hay que señalar que las condiciones en las que suelen llevarse a cabo estos procesos no son, en ocasiones, las más adecuadas. Estas peculiaridades conducen a una mayor contaminación microbiana inicial y un desarrollo más rápido de esos microorganismos durante el almacenamiento (Gill, 2007).

El impacto de la bala durante la captura es una vía de entrada de microorganismos. Además, el proyectil provoca la rotura de órganos internos; en el caso de que los órganos afectados sean los del aparato gastrointestinal, la rotura puede suponer la contaminación inmediata de la canal (Ruiz *et al.*, 2015). La rápida muerte del animal abatido imposibilita, en ocasiones, un desangrado correcto, hecho que proporciona un factor de riesgo higiénico-sanitario adicional (Ruiz *et al.*, 2015).

Por lo tanto, la carne de caza presenta una carga microbiana inicial alta y unas condiciones favorables para el desarrollo de la misma. Para minimizar el riesgo sanitario y

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

prolongar la vida útil de la carne de caza se deben extremar las precauciones durante el faenado parcial que se efectúa *in situ* y trasladar, lo más rápidamente posible, las piezas obtenidas a salas de tratamiento o centros de recogida donde se completará el faenado. La legislación vigente recoge las normas higiénicas mínimas para la obtención, tratamiento e inspección de la carne de caza y las condiciones técnico-sanitarias que deben cumplir los establecimientos dedicados a la manipulación de la misma (Reglamento (CE) Nº 853/2004). Asimismo, en el Codex Alimentarius CAC/RCP 58-2005, “el código de prácticas de higiene para la carne” incluye específicamente la caza silvestre (Codex Alimentarius, 2005). Hay que destacar la importancia de la inspección *post-mortem* de canales y órganos de los animales silvestres, que debe efectuarse con rigor para evitar la transmisión de determinadas zoonosis, como la triquinelosis por jabalíes.

La carne de caza también puede estar contaminada con el plomo de los proyectiles utilizados para abatir las piezas (AESAN, 2012). Finalmente, como aspectos positivos de este tipo de carne cabe destacar que carece de residuos de anabolizantes, antibióticos y otros fármacos (Hoffman y Wiklund, 2006).

4.2.- CONSUMO Y COMERCIALIZACIÓN DE LA CARNE DE CAZA

En la mayor parte de los países la carne ocupa un lugar destacado en la dieta por razones diversas, entre las que se incluyen el valor nutricional, las características sensoriales, la posición social que otorga, la tradición y la disponibilidad (AECOSAN, 2015). La contribución de los animales silvestres a la producción y al consumo total mundial de carne es muy pequeña y aún menor es su importancia en el comercio internacional de la carne. Se puede decir que el consumo de carne de caza ocupa un nicho muy reducido dentro del grupo de las carnes y está centrado en un sector específico de la población.

Los datos disponibles son escasos, poco contrastados y en ocasiones contradictorios. Con frecuencia los datos sobre producción, consumo y comercio de carne de animales salvajes se incluyen bajo en el grupo de «otras carnes» junto con la carne de los animales domésticos menores, o con las vísceras, o con las «carnes» de roedores, reptiles, caracoles, mamíferos marinos, etc. En la Figura 19 se muestra la importancia relativa de los distintos tipos de carne y en la Figura 20 la cantidad de carne de caza producida en distintas áreas geográficas.

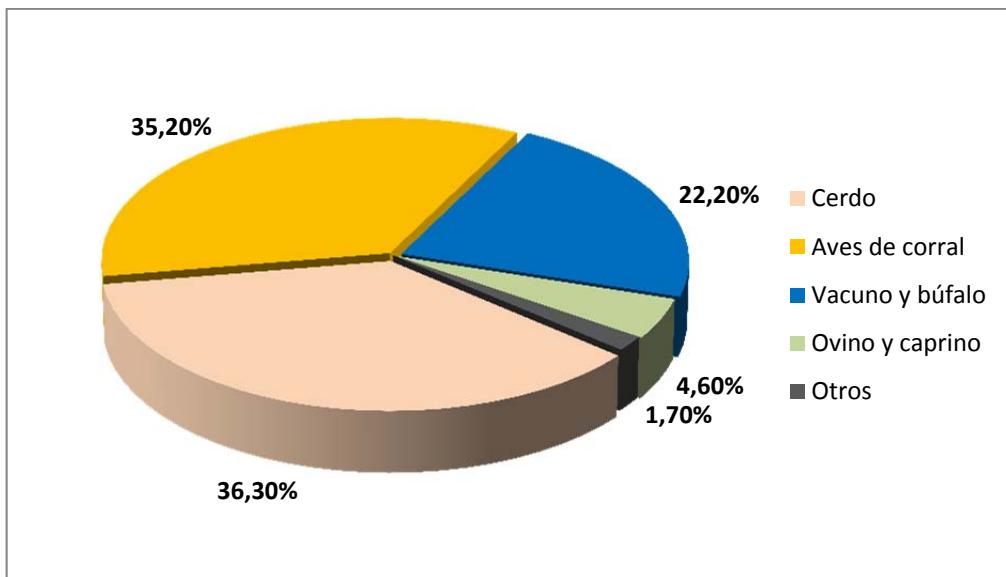


Figura 19. Producción mundial de carne en el año 2012 (FAO, 2014a, b).

En la mayor parte de los casos los datos relativos a la carne de caza son estimados y en el caso de algunos países, como Canadá, uno de los grandes consumidores de carne de animales silvestres, no hay datos registrados en la base de datos FAOSTAT.

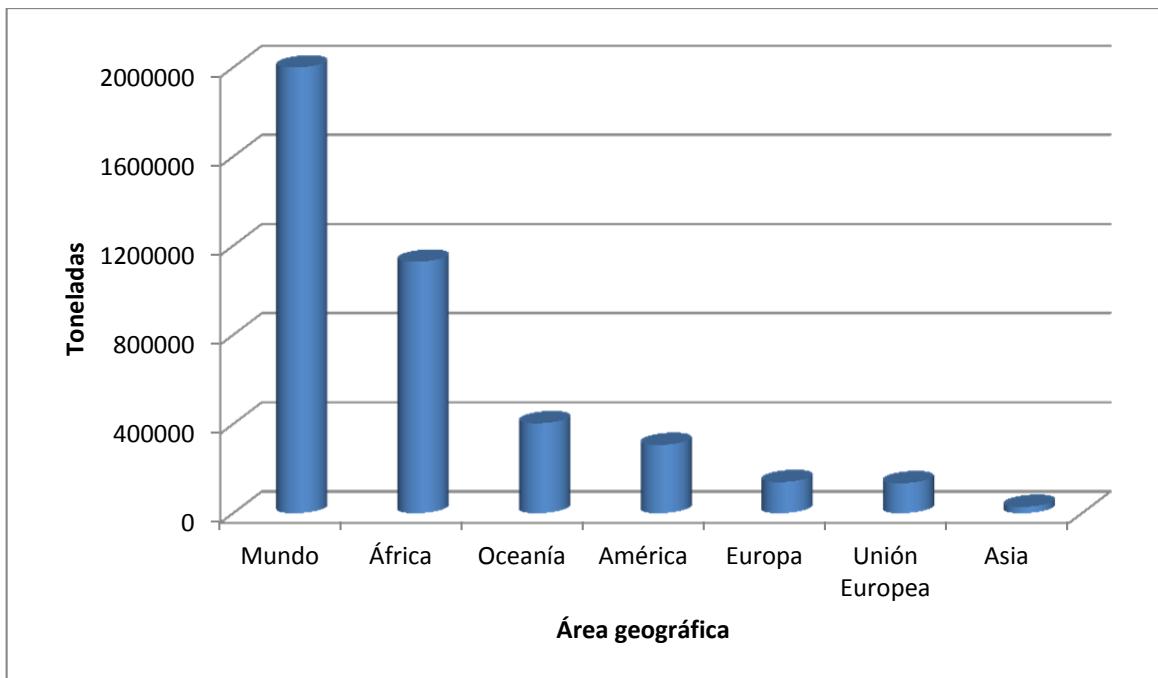


Figura 20. Producción mundial de carne de caza (FAOSTAT, 2015).

Aunque según se muestra en la Figura 20 África es el continente con mayor producción de carne de caza, su comercialización no tiene peso fuera del territorio donde es obtenida. Los principales productores y exportadores de carne de caza fuera de Europa son Nueva Zelanda, EE.UU., Argentina y Chile. Dentro de la Unión Europea, tanto el consumo como la producción de carne de caza es muy heterogéneo, siendo los principales consumidores e importadores Alemania, Francia, Italia, Bélgica, los Países Bajos y los Países Escandinavos (FAOSTAT, 2015).

4.2.1. El sector de la carne de caza en España

El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente reconoce que la caza es uno de los principales motores del desarrollo rural que, si es gestionada de modo sostenible, puede contribuir a la conservación del medio ambiente. Desde el punto de vista económico, la caza aprovecha determinados recursos naturales que generan ingresos tanto directos como indirectos, que revierten también en la conservación del territorio y, a su vez, incrementan la renta de los habitantes de ese entorno.

La actividad cinegética en España ha crecido considerablemente desde la década de 1970, convirtiéndose en una importante actividad cultural, social y económica. En la actualidad, la superficie de terrenos cinegéticos representa el 80% de la superficie total del país, con más de con más de 40,5 millones de ha (MAGRAMA, 2014). En algunas CC.AA., como Castilla y León, ese porcentaje es superior al 90% y la caza es un sector con muchas posibilidades de desarrollo.

Según fuentes de la Asociación Interprofesional de Carne de Caza (ASICCAZA, 2015), el sector de la caza en España genera más de 5.000 millones de euros anuales y 10.000 empleos en los 32.000 cotos donde se cría caza mayor (ciervo y jabalí principalmente) de manera extensiva y con alimentación natural.

Los porcentajes de capturas por especie, según los datos recogidos en el Anuario de Estadística Forestal en el año 2011 (valores similares a años anteriores) se muestran en la Tabla 10 y la Figura 21. Dentro de la caza mayor, el jabalí y el ciervo son las especies más capturadas (85% de las capturas), seguidos, a mucha distancia, por el corzo. Dentro de la caza menor de mamíferos los conejos representan el 83% y en el subsector aves el zorzal es la especie más capturada, seguida de la perdiz roja y la paloma.

Tabla 10. Capturas, pesos y valores por especie en 2011 (MAGRAMA, 2014).

Especie	Número de capturas	Peso total (kg)	Valor (euros)
Caza mayor			
Ciervo (<i>Cervus elaphus</i>)	148.195	11.855.600	25.963.764
Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	31.155	623.100	2.492.400
Gamo (<i>Dama dama</i>)	17.456	960.080	1.729.890
Jabalí (<i>Sus scrofa</i>)	209.357	12.561.420	15.994.875
Otros	20.936	594.820	492.660
Total caza mayor	427.099	26.595.020	46.673.588
Caza menor de mamíferos			
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	5.848.642	5.848.642	8.772.963
Liebre (<i>Lepus spp.</i>)	1.011.489	2.022.978	3.034.467
Zorro (<i>Vulpes vulpes</i>)	191.198	1.147.188	
Otros	42		
Total caza menor de mamíferos	7.051.371	9.018.808	11.807.430
Caza menor de aves			
Acuáticas (incluye anátidas)	170.304	85.152	1.362.432
Avefría (<i>Vanellus vanellus</i>)	12.139		
Becada (<i>Scolopax rusticola</i>)	113.029	33.909	254.315
Codorniz (<i>Coturnix coturnix</i>)	1.540.365	184.844	2.310.548
Córvidos	405.710	446.281	
Estornino (<i>Sturnus spp.</i>)	300.723	27.065	150.362
Faisán (<i>Phasianus colchicus</i>)	112.395	134.874	252.889
Paloma (<i>Columba spp.</i>)	1.877.211	1.126.327	2.815.817
Perdiz roja (<i>Alectoris rufa</i>)	3.100.550	1.240.220	4.650.825
Tórtola común (<i>Streptopelia turtur</i>)	805.643	161.129	805.643
Zorral (<i>Turdus spp.</i>)	4.288.734	428.873	2.144.367
Otros	237.602		
Total caza menor de aves	12.964.405	3.868.673	14.747.197
TOTAL	20.442.875	39.482.501	73.228.215

Analizando las capturas cinegéticas, la caza menor es la que representa un mayor número de capturas, especialmente las aves, aunque el peso total y el valor económico de la caza mayor es muy superior.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

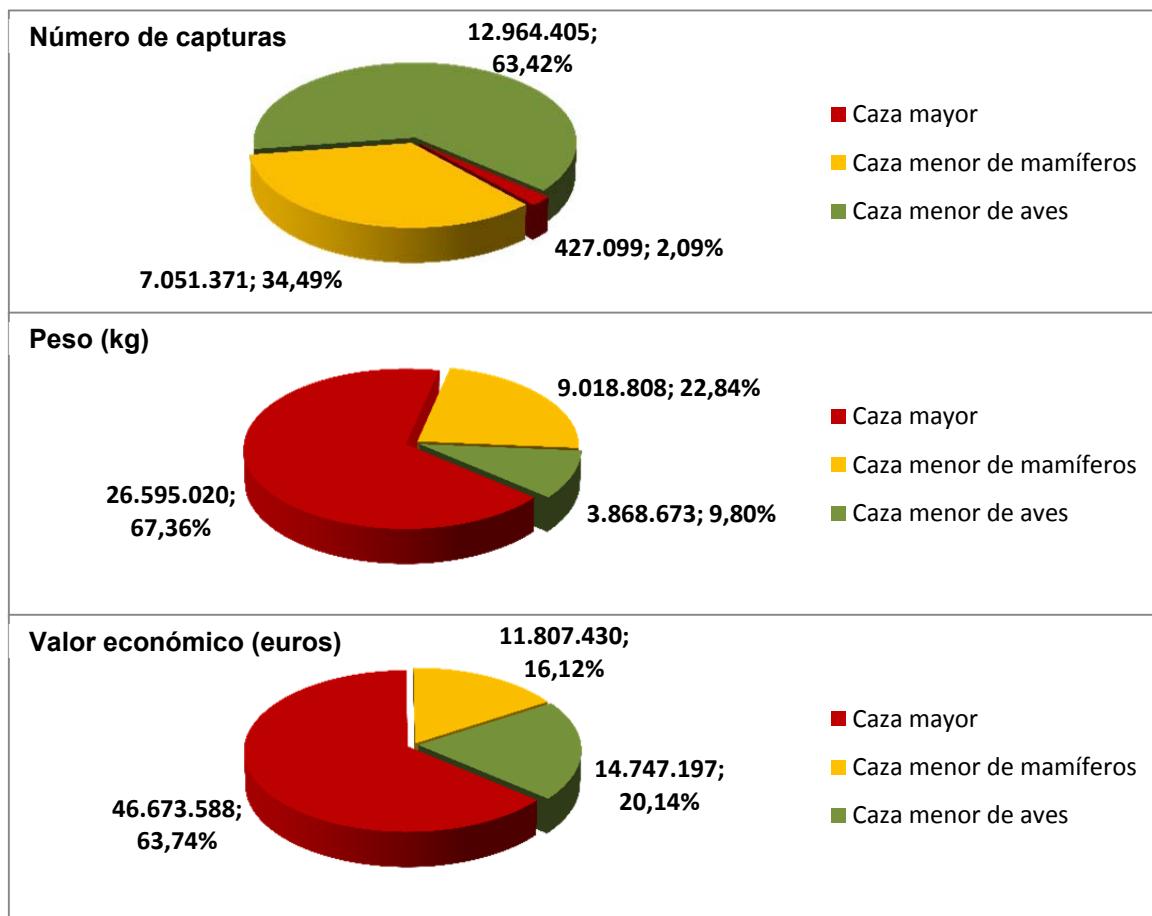


Figura 21. Comparativa de las capturas de caza mayor y menor, según número, peso y valor, en el año 2011 (MAGRAMA, 2014).

Respecto al consumo de carne de caza en España, no hay datos muy concretos. Según refiere ASICCAZA (2015), la carne de caza menor (conejo, liebre, perdiz y codorniz) es consumida principalmente por los cazadores y su entorno y sólo una pequeña parte se destina al comercio y restauración en locales. Cabe destacar que puede permitirse el suministro directo por parte de los cazadores de pequeñas cantidades de caza silvestre o de carne de caza silvestre al consumidor final o a establecimientos locales de venta al por menor que suministran directamente al consumidor final, estableciendo los requisitos necesarios el RD 640/2006 (BOE, 2006).

En cuanto a la caza mayor, principalmente jabalí y ciervo, se comercializa básicamente en el mercado intracomunitario (90%), donde países como Alemania, Francia, Bélgica o Italia tienen una fuerte tradición de consumo de este tipo de carne, considerada de alta gama.

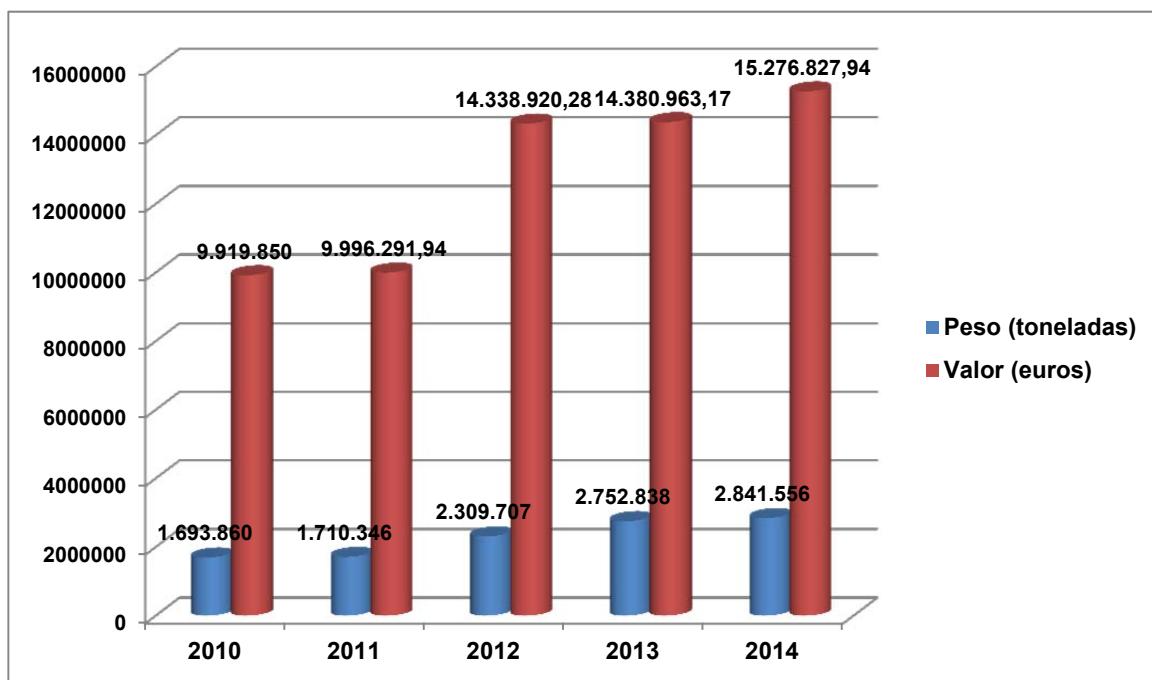
Por lo que respecta a las exportaciones de carne de caza hacia países de la Unión Europea, el principal país receptor es Alemania, seguido por Francia, Bélgica, Países Bajos y Austria (Tabla 11). Se observa una evolución positiva a lo largo de los últimos años, habiéndose producido un gran aumento en el año 2012 con respecto a 2011 y moderándose a partir de ese año el incremento de las exportaciones (Figura 22).

Tabla 11. Países receptores de carne de caza procedente de España (cantidad exportada en kg y valor en euros) (Cámara de Comercio de España, 2015).

PAÍS	AÑO 2013		AÑO 2014 ¹	
	PESO (kg)	VALOR (euros)	PESO (kg)	VALOR (euros)
ALEMANIA	1.110.967	5.925.243,10	1.048.948	5.439.975,37
ANDORRA	18.774	62.781,27	10.312	57.238,57
AUSTRIA	263.981	1.425.128,41	211.537	1.243.814,71
BÉLGICA	161.451	1.141.361,36	197.606	1.325.906,99
BULGARIA	5.198	15.294,52	38.214	236.182,69
CHIPRE	497	3.598,49		
DINAMARCA	40.700	327.938,91	130.396	920.937,27
FINLANDIA			21.034	73.678,76
FRANCIA	624.317	3.058.416,76	471.153	2.644.293,54
GIBRALTAR ²	193	1.427,13	352	2.695,53
GRECIA	4.360	20.993,83	8.121	36.440,46
ITALIA	98.204	471.671,85	201.928	718.225,30
NORUEGA			7.734	109.190,21
PAISES BAJOS	168.205	998.603,61	214.292	1.317.237,08
PORTUGAL	154.800	515.865,02	166.952	662.820,61
REINO UNIDO	101.189	412.599,50	90.637	355.516,56
RUMANIA	2	39,42		
SUECIA			12.941	66.976,86
SUIZA			9.399	65.697,43
Total	2.752.838	14.380.963,17	2.841.556	15.276.827,94

¹, datos no definitivos

², colonia del Reino Unido



Los datos de 2014 no son definitivos.

Figura 22. Evolución del comercio intracomunitario de carne de caza (Cámara de Comercio de España, 2015).

Por otro lado, las exportaciones a terceros países son anecdóticas, habiéndose registrado únicamente la exportación puntual a Cabo Verde, Japón y China (Cámara de Comercio de España, 2015).

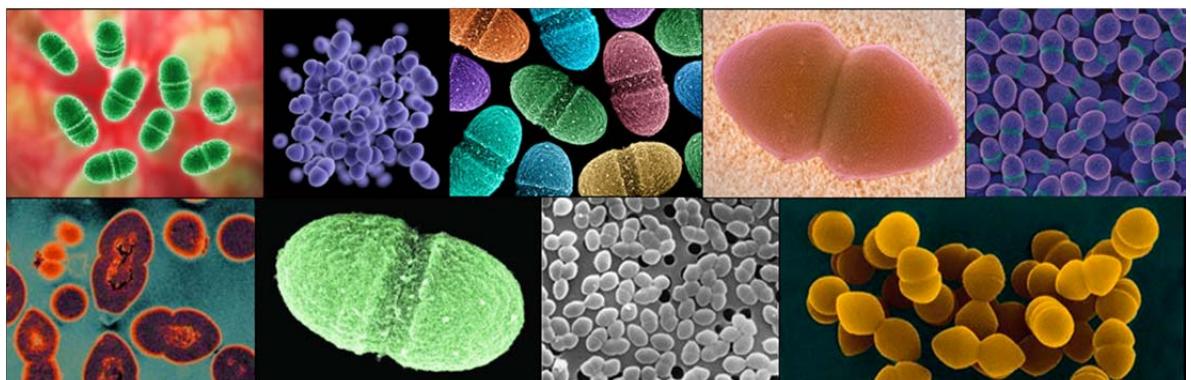
En España, la producción de carne de caza se encuentra principalmente localizada en los cotos de caza de Extremadura, Castilla-La Mancha y Andalucía, donde ha surgido un amplio tejido industrial con salas de despiece encargadas de la recogida, procesado y distribución de este producto, seguidos de los existentes en Madrid, Valencia y Castilla y León (ASICCAZA, 2015). Hay que señalar que existen centros cárnicos autorizados para el almacenamiento, elaboración y expedición de carne de caza y productos derivados.

4.2.2. Perspectivas de futuro

Si bien el sector de comercialización y consumo de carne de caza, comparado con el de otras carnes, puede considerarse residual, cabe destacar su potencialidad y posibilidades de expansión en nuestro país, donde año tras año se ha visto incrementado el número de capturas, como ha sido señalado con anterioridad.

Además, más allá del consumo de carne de caza fresca o congelada, se está desarrollando una industria de productos elaborados que aún no ha tocado techo. Actualmente se están comercializando “productos de calidad” obtenidos a partir de la carne de caza, principalmente, aunque no exclusivamente, de caza mayor. Se espera en los próximos años un aumento de la producción y comercialización de elaborados cárnicos tales como platos preparados a base de carne de caza, ahumados, conservas, patés, embutidos y cecinas (ASICCAZA, 2015; Fajardo *et al.*, 2009). Por otra parte, el comercio exterior está creciendo y ofrece interesantes posibilidades de expansión al sector.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.- ADAPTACIÓN Y ADAPTACIÓN CRUZADA DE *Escherichia coli* A DIFERENTES BIOCIDAS DE USO ALIMENTARIO

Los biocidas son compuestos usados habitualmente en la industria alimentaria como desinfectantes (p. ej. hipoclorito sódico), aditivos (p. ej. nitrito sódico o fosfato trisódico) o descontaminantes de carne de mamíferos y aves (p. ej. fosfato trisódico) para eliminar o reducir los niveles de los microorganismos patógenos y alterantes (Capita y Alonso-Calleja, 2013). El uso frecuente de los biocidas en el Sistema Alimentario es un motivo de preocupación dado el potencial de los microorganismos para desarrollar una susceptibilidad reducida a estos compuestos como mecanismo de adaptación a las condiciones ambientales. Existe cada vez mayor evidencia de que la eficacia de los biocidas puede ser cuestionable en algunas circunstancias y hay una preocupación creciente por el uso inadecuado de estos compuestos, que podría permitir la exposición de las bacterias a concentraciones subletales de los mismos (Davidson y Harrison, 2002).

Un aumento de la tolerancia a los biocidas es un problema importante de Salud Pública, ya que podría contribuir al aumento de la persistencia de los microorganismos patógenos en la cadena alimentaria. Además, la respuesta microbiana de adaptación a un determinado factor de estrés puede provocar tolerancia a otros factores de estrés diferentes (tolerancia cruzada o adaptación cruzada). Se han realizado numerosos estudios de protección cruzada inducida por el estrés (Chung *et al.*, 2006), y la evidencia sugiere que una disminución en la susceptibilidad a un biocida puede conferir tolerancia cruzada a otros biocidas (Braoudaki y Hilton, 2004; Randall *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2000). Las estrategias microbianas para contrarrestar los efectos de los agentes antimicrobianos incluyen la formación de *biofilm*, la expulsión o la inactivación enzimática del compuesto antes de que alcance el lugar diana, cambios en la permeabilidad de la superficie celular, modificación o superproducción del lugar diana, y adquisición de vías metabólicas alternativas a las inhibidas por el antimicrobiano (IFT, 2006).

Como mecanismo de adaptación a condiciones ambientales adversas, las bacterias pueden utilizar bombas de expulsión para eliminar y evitar la acumulación de compuestos químicos en su interior. Las bombas de expulsión suponen un importante mecanismo de

resistencia. Se trata de proteínas transportadoras que eliminan activamente los antimicrobianos que penetran en la célula, reduciendo su concentración intracelular hasta niveles inferiores a los efectivos. Este mecanismo de adaptación ha sido descrito para varios compuestos antimicrobianos (Alanis, 2005). Las bombas de expulsión pueden ser específicas para un único compuesto o ejercer su acción frente a un abanico de compuestos similares o diferentes, por ejemplo, aditivos y antibióticos (Potenski *et al.*, 2003). La mayoría de los genes que codifican para la síntesis de transportadores inespecíficos están localizados en el cromosoma, si bien se han descrito algunos ubicados en plásmidos (Alonso *et al.*, 2001). Se ha sugerido que las bombas de expulsión que actúan frente a una gama de sustancias pueden haber sido seleccionadas por las bacterias para evitar los efectos deletéreos de las sustancias tóxicas presentes en su entorno natural. Sin embargo, se ha observado que la presión selectiva a la que es sometida la bacteria cuando se aplica un compuesto antimicrobiano provoca la aparición de mutantes con producción aumentada de estos determinantes, hecho que refuerza la idea de su importante papel en la adquisición de resistencia a estos compuestos (Alonso *et al.*, 2001).

En el caso de *Escherichia coli*, la energía obtenida con la oxidación de los sustratos se conserva en forma de diferencia de potencial electroquímico o gradiente electroquímico a través de la membrana celular. El potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) junto con la diferencia en la concentración de protones entre el espacio intra y extracelular (ΔpH) compone la fuerza protón-motriz (Δp), que habitualmente se mantiene en un valor de -150 a -200 mV (Kashket, 1985). La fuerza protón-motriz es aprovechada por la bacteria para impulsar el transporte de nutrientes, la síntesis de ATP y otras reacciones endergónicas en la membrana celular.

Los compuestos que impiden la fosforilación oxidativa, como el carbonil cianuro m-clorofenilhidrazone (CCCP), son capaces de transportar protones a través de las membranas biológicas, que habitualmente poseen una baja conductancia de protones (Gage y Neidhardt, 1993). Al transportar protones a favor del gradiente electroquímico estos agentes colapsan la fuerza protón-motriz (Δp), con los consiguientes efectos negativos para la célula bacteriana. Así, el pH del citoplasma, que típicamente se mantiene en valores de 7-8, se aproxima a los valores de pH externo, el transporte de nutrientes se ve limitado y el ritmo de síntesis de ATP ligada a la fuerza protón-motriz desciende sustancialmente (Gage y Neidhardt, 1993). Puesto que las bombas de expulsión obtienen su energía gracias a la

fuerza protón-motriz, el CCCP, que reduce el gradiente de protones, ha sido ampliamente utilizado para detectar la presencia de bombas de expulsión (Cho *et al.*, 2001). De hecho, la observación del crecimiento bacteriano en presencia de CCCP bajo condiciones específicas se ha considerado tradicionalmente como un procedimiento útil para examinar la adaptación bacteriana a las agresiones ambientales.

La superficie de las células microbianas es una pieza fundamental para su supervivencia, puesto que las bacterias interaccionan con el medio ambiente a través de sus cubiertas. Así, una de las formas más comunes de resistencia a los antimicrobianos está en relación con la estructura y composición de las membranas bacterianas, que pueden actuar como barreras impermeables, bien de forma intrínseca o como respuesta a mecanismos de resistencia adquiridos. Estas barreras limitan la cantidad de un antimicrobiano que puede entrar en la célula, disminuyendo así la concentración intracelular del compuesto y aumentando la resistencia de la bacteria al mismo. Se han publicado diferentes estudios que hacen referencia a una reducción en la susceptibilidad bacteriana a los biocidas consecuente a cambios en las proteínas (Winder *et al.*, 2000), composición de ácidos grasos (Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2008; Moorman *et al.*, 2008), fosfolípidos (Boeris *et al.*, 2007) o lipopolisacáridos (Stickler, 2004) de las membranas celulares. Recientemente, se ha puesto de manifiesto que los cambios en la fluidez de las membranas pueden jugar un papel muy importante en la adaptación de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* a los descontaminantes de la carne de ave (Alonso-Hernando *et al.*, 2010).

En el caso de las bacterias Gram-negativas, se ha constatado que las modificaciones en los lípidos de las cubiertas celulares, principalmente lipopolisacáridos, ayudan a prevenir la penetración de compuestos extraños en el citoplasma. Dichos cambios suelen causar modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie celular (To *et al.*, 2002). Por ello, las modificaciones de este parámetro se asocian con un incremento inespecífico de la tolerancia a los biocidas y la estimación de la hidrofobicidad superficial es una determinación frecuente en los estudios de adaptación bacteriana a los antimicrobianos (Romanova *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que las bacterias, incluida *E. coli*, son capaces de adaptarse a los biocidas después de la exposición prolongada a concentraciones subletales de los mismos (Chung *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta el momento no se han realizado estudios para comparar los efectos de la exposición repetida a concentraciones subinhibitorias de tres

biocidas de uso en la Industria Alimentaria (fósforo trisódico, nitrito sódico e hipoclorito de sodio) sobre la adaptación de *E. coli* a tales compuestos. Por otra parte, mientras que los mecanismos de resistencia a los antibióticos han sido ampliamente estudiados (Wright, 2010), poco se sabe acerca de los mecanismos que conducen a la falta de susceptibilidad a otros antimicrobianos diferentes a los antibióticos.

E. coli enteroinvasiva (*enteroinvasive Escherichia coli*, EIEC), incluyendo *E. coli* ATCC 12806, se ha asociado con enfermedades transmitidas por los alimentos en todo el mundo (Andrade *et al.*, 2002). La cepa *E. coli* ATCC 12806 se ha utilizado para probar la eficacia antimicrobiana de diversos agentes físicos (Linton *et al.*, 2001) y químicos (Alonso-Hernando *et al.*, 2013). Por otra parte, recientemente se ha estudiado el efecto de varios biocidas sobre la capacidad para formar *biofilms*, la resistencia a antibióticos y la ultraestructura de *E. coli* ATCC 12806 (Capita *et al.*, 2014). Sin embargo, se carece de información sobre el efecto de concentraciones subletales de los biocidas en la tolerancia, la actividad de las bombas de expulsión y las características de la superficie celular de esta cepa.

2.- RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y VIRULENCIA EN ENTEROCOCOS PROCEDENTES DE CARNE DE CAZA

Los enterococos son bacterias Gram-positivas cuyo hábitat es el tracto gastrointestinal de los seres humanos y de la mayoría de los animales (Aarestrup *et al.*, 2000) y son a menudo usados como indicadores de contaminación fecal de agua y alimentos (Koluman *et al.*, 2009). Si bien las cepas del género *Enterococcus* se consideran, generalmente, como microorganismos de bajo potencial patógeno, en los últimos años han emergido como una causa importante de infecciones, tanto nosocomiales como comunitarias, dada la elevada capacidad de estos microorganismos para adquirir factores de virulencia (Silva *et al.*, 2011a).

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos agentes antimicrobianos, a la vez que tienen una gran capacidad para adquirir genes de resistencia a antibióticos de forma horizontal a través de elementos genéticos móviles (como plásmidos o transposones), por intercambio de material cromosómico o por mutaciones esporádicas ventajosas. Esta capacidad de los enterococos para acumular genes de resistencia a antibióticos supone un importante desafío en la práctica clínica (Hegstad *et al.*, 2010).

El problema de la resistencia a antibióticos en los enterococos no queda restringido al entorno clínico, sino que afecta también a otros ámbitos, como el ambiental o el alimentario. Así, el hecho de que los enterococos hayan desarrollado mecanismos altamente eficientes para la adquisición y distribución de genes de resistencia a antibióticos implica un intercambio frecuente de genes, incluso entre especies no relacionadas, en el hábitat de estos microorganismos (p. ej. el tracto gastrointestinal o las aguas residuales). En este sentido, los enterococos, que han sido reconocidos como reservorios de genes de resistencia (Aarestrup *et al.*, 2000), se consideran microorganismos centinela o indicadores de resistencia a antibióticos y pueden ser usados para monitorizar la evolución de este problema de Salud Pública en diferentes ambientes (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

A lo largo de la última década, ha surgido una preocupación creciente sobre el marcado incremento que ha experimentado la resistencia a antibióticos en bacterias comensales, incluyendo *Enterococcus* spp., en las poblaciones de animales silvestres (Santos *et al.*, 2013). Los animales silvestres tienen un importante papel en el escenario de la resistencia a antibióticos por varias razones. En primer lugar se consideran microorganismos centinela del impacto que puede tener en el ambiente la actividad humana. Así, diferentes actividades (p. ej. explotaciones ganaderas, clínicas de medicina humana o veterinaria, vertederos o plantas de tratamientos de aguas residuales) pueden causar interacciones con la fauna silvestre y relacionarse de manera directa con los perfiles de resistencia a los antibióticos de las bacterias intestinales de los animales salvajes en una determinada área geográfica (Santos *et al.*, 2013). En segundo lugar, los animales silvestres pueden ser un reservorio de bacterias resistentes a antibióticos y de genes de resistencia, que pueden diseminar a larga distancia en el medio ambiente. Finalmente, las poblaciones de animales silvestres son una fuente de bacterias resistentes a antibióticos que pueden infectar a seres humanos, animales de abasto o animales domésticos (Allen *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013). En este escenario, el contacto con animales de especies cinegéticas o con su carne implica un riesgo potencial de transferencia de bacterias resistentes y supone un mecanismo biológico que podría contribuir al incremento de la resistencia a antibióticos en las poblaciones humanas (Allen *et al.*, 2010). El principal problema, en este contexto, es la posibilidad de supervivencia bacteriana como consecuencia de un insuficiente cocinado de la carne o el riesgo de contaminación cruzada a otros alimentos.

En diferentes países se han realizado estudios sobre la presencia de genes de resistencia a antibióticos y genes de virulencia en animales y carne de caza (Literak *et al.*, 2010; Poeta *et al.*, 2007; Radhouani *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2011a, b; Vargas *et al.*, 2013). Sin embargo, estas investigaciones han sido muy limitadas en España (Navarro-Gonzalez *et al.*, 2013) y, hasta donde llega nuestro conocimiento, no se ha realizado ningún trabajo de este tipo en el noroeste de España.

3.- PREVALENCIA, RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS, VIRULENCIA Y CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE ENTEROCOCOS RESISTENTES A LA VANCOMICINA EN PREPARADOS CÁRNICOS

Los enterococos se han visto implicados en una gran diversidad de enfermedades, incluyendo infecciones del tracto urinario, infecciones abdominales y pélvicas, infecciones cutáneas, bacteriemia o endocarditis (Kasimoglu-Dogru *et al.*, 2010). *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las especies aisladas con más frecuencia de las infecciones humanas, si bien ocasionalmente se han descrito casos clínicos provocados por otras especies, como *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* o *E. casseliflavus/E. flavesiens* (Çetinkaya *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2007).

Un problema añadido a la infección humana por *Enterococcus* spp. es su resistencia, intrínseca o adquirida, a un amplio espectro de antibióticos (Aslam *et al.*, 2012). En los últimos años se ha generado una especial preocupación en relación con los enterococos con resistencia a la vancomicina, puesto que este glucopéptido se usa con frecuencia como último recurso en el tratamiento de las infecciones provocadas por cepas de enterococos multi-resistentes (Borhani *et al.*, 2014). Una posible explicación para la emergencia y diseminación de cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*; VRE) en Europa ha sido el empleo en animales de abasto del promotor de crecimiento avoparcina, un glucopéptido que podría inducir resistencia cruzada a la vancomicina (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Precisamente, esta posible asociación entre la resistencia a vancomicina en las poblaciones microbianas de origen humano y el uso de avoparcina en producción animal ha sido la causa de la prohibición de este antibiótico como promotor del crecimiento en la Unión Europea en abril de 1997 (López *et al.*, 2009).

La vancomicina actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular de las bacterias Gram-positivas al unirse a los precursores del peptidoglicano y bloquear así la etapa de transglicosilación y, consiguientemente, la etapa de transpeptidación. Ambas son etapas clave para la síntesis de la pared celular. La base molecular de la resistencia a la vancomicina en el caso de enterococos es la formación de receptores con afinidad reducida a los glucopéptidos, hecho que se traduce en una disminución de la capacidad de la vancomicina para inhibir la síntesis de la pared celular (Sujatha y Praharaj, 2012).

Algunos enterococos presentan un mecanismo intrínseco de resistencia a la vancomicina mediado por genes *vanC*, que confieren un bajo nivel de resistencia que no es transferible; estos genes son inherentes a las especies *E. gallinarum* (*vanC-1*), *E. casseliflavus* (*vanC-2*) y *E. flavesiens* (*vanC-3*) (Lozano *et al.*, 2015). Además, existen mecanismos de resistencia adquirida debido a la presencia de otros genes *van*, de los cuales *vanA* y *vanB* son los más frecuentes y de mayor importancia clínica. Estos genes han sido identificados en cepas responsables de casos individuales de enfermedad y de brotes de origen nosocomial (López *et al.*, 2012; Nebreda *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008). Además, las cepas portadoras de los genes *vanA* o *vanB* han sido detectadas en animales de abasto y en alimentos de origen animal tanto en España como fuera de nuestras fronteras (Hammerum, 2012; López *et al.*, 2009; Torres *et al.*, 2003). Las cepas VRE con mecanismos de resistencia adquirida a la vancomicina suponen un importante problema de Salud Pública, debido a la posibilidad de transferencia horizontal de estos determinantes a otras bacterias patógenas (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Se ha sugerido que los enterococos resistentes a la vancomicina podrían transmitirse de los animales al hombre a través de la cadena alimentaria, y en varios estudios se ha documentado la presencia de VRE en los alimentos (Aslam *et al.*, 2012; Robredo *et al.*, 2000a). Si bien hay escasa evidencia de que las infecciones humanas por estos microorganismos estén asociadas al consumo o manipulación de alimentos contaminados, es indudable que la presencia de VRE en los alimentos supone un importante riesgo indirecto, derivado de la posible transferencia horizontal de genes de resistencia desde los enterococos resistentes a la vancomicina hasta otras bacterias, incluso aquellas de elevado potencial patogénico, a lo largo de la cadena alimentaria, contribuyendo así a la persistencia

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

y diseminación de la resistencia a antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Petternel *et al.*, 2014).

Se han descrito en *Enterococcus* spp. numerosos factores de virulencia responsables de infecciones humanas. Estos factores de virulencia incluyen sustancias de agregación y adhesión, citolisinas, gelatinasa, proteínas de superficie extracelulares o feromonas (Aslam *et al.*, 2012). La presencia de genes de virulencia y de resistencia en enterococos aislados de carne supone un riesgo de Salud Pública ante la posibilidad de ingestión de las bacterias como consecuencia de un insuficiente cocinado o de episodios de contaminación cruzada (Aslam *et al.*, 2012).

La investigación de la presencia de genes de resistencia en alimentos de origen animal puede contribuir a la mejor comprensión y control de la resistencia a antibióticos. Se han realizado en diferentes países investigaciones sobre la presencia de VRE en carne (Borgen *et al.*, 2001; Busani *et al.*, 2004; Çetinkaya *et al.*, 2013; Kasimoglu-Dogru *et al.*, 2010; Lemcke y Bülte, 2000; Messi *et al.*, 2006; Petternel *et al.*, 2014). Sin embargo, hasta el momento este tipo de estudios son muy escasos en España (López *et al.*, 2009; Robredo *et al.*, 2000a).

En el **Anexo I**, al final de la presente Memoria, se adjuntan copias de las publicaciones internacionales (*Journal Citation Reports*) generadas a partir de esta Tesis Doctoral.

4.- OBJETIVOS

1. Determinar si la exposición de *Escherichia coli* ATCC 12806 a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico, nitrito sódico o hipoclorito sódico provoca la adaptación de la cepa y si esta adaptación se asocia con protección cruzada a otros biocidas.
2. Conocer el papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular en la adaptación de *Escherichia coli* ATCC 12806 al fosfato trisódico, nitrito sódico e hipoclorito sódico.
3. Conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.
4. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.
5. Conocer la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE) en preparados de carne de ave, cerdo y vacuno del noroeste de España.
6. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en aislamientos de VRE de preparados cárnicos en el noroeste de España y conocer la capacidad de las cepas para formar *biofilm*.
7. Estudiar la diversidad genética de las cepas de VRE aisladas mediante su ribotipado y determinar la capacidad discriminatoria de la técnica.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

OBJETIVO 1. Determinar si la exposición de *Escherichia coli* ATCC 12806 a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico, nitrito sódico o hipoclorito sódico provoca la adaptación de la cepa y si esta adaptación se asocia con protección cruzada a otros biocidas.

1.1. CEPA DE *Escherichia coli* Y CONDICIONES DE CULTIVO

Se utilizó una cepa de colección (*Escherichia coli* ATCC 12806). La cepa se mantuvo a -30 °C en caldo triptona de soja (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) suplementado con 20% (vol/vol) de glicerol. Antes de cada experimento, las células congeladas se subcultivaron dos veces en TSB (Oxoid) a 37 °C. Los cultivos de trabajo se mantuvieron a 4±1 °C en placas de agar triptona de soja (TSA, Oxoid) y se renovaron mensualmente.

1.2. BIOCIDAS

Se ensayaron tres compuestos: fosfato trisódico (FTS, Merck, Darmstadt, Alemania), nitrito sódico (NS, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) e hipoclorito sódico (HIP, Sigma-Aldrich). Las soluciones se prepararon asépticamente antes de cada experimento en agua destilada estéril.

1.3. DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES MÍNIMAS INHIBITORIAS

Los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se establecieron utilizando el método de microdilución en caldo definido por el *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2013). Se tomaron cinco colonias del microorganismo de las placas de TSA (Oxoid), se inocularon en tubos con 10 mL de caldo Mueller-Hinton (MH, Oxoid) y se incubaron a 37 °C. Experimentos previos mostraron que después de 24 horas de incubación, estos cultivos bacterianos contenían aproximadamente 10^8 ufc/mL (datos no mostrados). Para el experimento, se utilizaron placas de poliestireno de microtítulo de 100 pocillos (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finlandia). Los pocillos se llenaron con 20 µL de la solución descontaminante (se utilizó un rango de concentraciones) y 180 µL de las diluciones apropiadas (en caldo MH) de los inóculos con el fin de obtener una concentración final en el pocillo de 5×10^5 ufc/mL. La concentración del inóculo se confirmó por siembra en placa.

Las placas de microtítulo se incubaron a 37 °C en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves). Se incluyeron controles positivos (200 µL de inóculo de 5×10^5 ufc/mL) y negativos (180 µL de caldo MH + 20 µL de compuesto químico) en cada experimento. Los experimentos se repitieron cinco veces en diferentes días.

La Concentración Mínima Inhibitoria (*Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) se definió como la concentración más baja de biocida necesaria para impedir el crecimiento después de 48 horas de incubación. Se realizó una curva de calibración con el fin de establecer un punto de corte para el crecimiento bacteriano. El crecimiento de la cepa se determinó de dos formas para este propósito: mediante la medición de las densidades ópticas (DO) utilizando un filtro de banda ancha (420-580 nm; DO₄₂₀₋₅₈₀) en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves) y mediante la enumeración de las células viables mediante siembra, por duplicado, en agar para recuento en placa (PCA, Oxoid), utilizando 0,1% (peso/vol) de agua de peptona (PW, Oxoid) para realizar las diluciones decimales y realizando el recuento de colonias tras 48 h de incubación a 37 °C. Se incluyeron pocillos con el caldo de cultivo no inoculado como control de contaminación. Se realizaron cinco repeticiones en diferentes días. Se investigó el grado de correlación entre las densidades ópticas y los recuentos microbianos mediante técnicas de regresión lineal.

1.4. EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES CRECIENTES DE BIOCIDAS

La prueba se realizó utilizando el procedimiento descrito para la determinación de la MIC. La concentración de partida del biocida fue MIC/2. Cuando se observó crecimiento, se transfirieron, en condiciones asépticas, 20 µL de la suspensión al siguiente pocillo, que contenía 160 µL de caldo MH y 20 µL de solución biocida. Después de la transferencia, cada pocillo contenía una concentración de biocida 1,5 veces mayor que el pocillo anterior. Este procedimiento se continuó hasta que no se observó ningún crecimiento después de 72 horas de incubación a 37 °C. La suspensión del último pocillo con crecimiento detectado se sembró en placas de TSA (Oxoid) con biocida (se añadió a TSA la mitad de la concentración máxima de biocida que permitió el crecimiento microbiano en los pocillos), que se almacenaron (4 ± 1 °C) después de la incubación a 37 °C durante 48 horas.

1.5. ESTABILIDAD DE LA ADAPTACIÓN

La estabilidad de la tolerancia adquirida se determinó para cada compuesto mediante subcultivos repetidos de *E. coli* en caldo no selectivo (TSB, Oxoid) sin biocidas. Este procedimiento se repitió cada 24 h durante 7 días. Después de 7 días, se determinó la capacidad de las cepas adaptadas para crecer en presencia de la concentración máxima de biocida que permitía el crecimiento microbiano después de la adaptación.

1.6. CURVAS DE CRECIMIENTO

Los experimentos de crecimiento se llevaron a cabo en placas de microtítulo. Los pocillos se llenaron con 180 µL del inóculo (concentración final de 10^5 ufc/mL) y 20 µL de las soluciones descontaminantes en las concentraciones adecuadas con el fin de dar una concentración final en el pocillo de MIC/2.

Para monitorizar el crecimiento microbiano se realizaron mediciones a intervalos de una hora entre la hora 0 (antes de la incubación) y la hora 120. El crecimiento se determinó midiendo la DO₄₂₀₋₅₈₀ en un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves). Las placas de microtítulo se agitaron durante un minuto antes de la medición de la turbidez. El experimento se repitió tres veces en días distintos.

El modelo utilizado para ajustar las curvas de crecimiento a los datos obtenidos fue la ecuación de Gompertz modificada (Garthright, 1991): $DO_t = A + B * \exp(-\exp(2,71828183 * \mu * (L-t) / B + 1))$, donde t = el tiempo en horas que ha transcurrido desde la inoculación, DO_t = Densidad Óptica (determinada a 420-580 nm) en el tiempo t, L = la duración del periodo de latencia (horas), μ = el ritmo máximo de crecimiento alcanzado ($\Delta DO/h$), B = el aumento de DO₄₂₀₋₅₈₀ desde la inoculación hasta la fase estacionaria (E), y A = la asymptota superior de la curva (concentración de bacterias en la fase estacionaria, E) - B. Los valores de L, μ y E se obtuvieron para cada cepa y réplica ajustando los datos obtenidos a una curva sigmoidal usando un algoritmo Marquardt que calcula los valores de esos parámetros en base al error mínimo de la suma de cuadrados. La bondad de ajuste se evaluó calculando el coeficiente de determinación (R^2).

1.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron técnicas de análisis de varianza para comparar los valores de los parámetros de crecimiento cinético (L , μ y E). La separación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft Inc, Tulsa, Oklahoma, EE.UU.). Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P<0,05$).

OBJETIVO 2. Conocer el papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular en la adaptación de *E. coli* ATCC 12806 al fosfato trisódico, nitrito sódico e hipoclorito sódico.

2.1 INHIBICIÓN DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN CON CCCP

Para determinar la actividad de las bombas de expulsión, se utilizó el inhibidor carbonil cianuro m-clorofenilhidrazone (CCCP; concentración final 50 μM ; Sigma-Aldrich). Se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli* en ausencia y en presencia de CCCP para todas las condiciones ensayadas (células adaptadas y no adaptadas, en ausencia o presencia de concentraciones subinhibitorias de biocidas). Con el objetivo de asegurar que el CCCP a las concentraciones usadas no tenía un efecto inhibidor sobre las células microbianas, se estudió el crecimiento de las células adaptadas y no adaptadas en presencia del inhibidor de las bombas de expulsión.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR

La hidrofobicidad de la superficie de las células microbianas se determinó mediante la prueba de adhesión microbiana a solventes (*microbial adhesion to solvents*, MATS) basado en la afinidad a los solventes no polares (Rosenberg *et al.*, 1980; To *et al.*, 2002). Para llevar a cabo el experimento, se recogieron por centrifugación (5.000 x g; 10 min) células de *E. coli* ATCC 12806 en fase de crecimiento exponencial. Las células se lavaron dos veces en tampón fosfato salino (pH=7,0) y se resuspendieron en una solución de cloruro sódico (150 mM NaCl) a una concentración de aproximadamente 10^8 ufc/mL. Alícuotas de 2,4 mL de esta suspensión se mezclaron, por agitación, con 0,4 mL del solvente apolar durante 60 segundos y posteriormente se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 15

minutos, lo que permitió la completa separación entre las dos fases (acuosa y orgánica). Transcurrido este tiempo se obtuvo una alícuota (1 mL) de la fase acuosa y se determinó la densidad óptica a 400 nm (DO_{400} ; Bioscreen C MBR, Oy Growth Curves). El porcentaje de células presentes en el solvente se calculó utilizando la siguiente ecuación: porcentaje de afinidad al xileno = $100 \times (1 - (A/A_0))$, donde A_0 es la absorbancia de la suspensión original en solución salina (antes del mezclado con el solvente) y A es la absorbancia de la fase acuosa tras el mezclado y reposo. Cada experimento se repitió tres veces con cultivos preparados de forma independiente en tres días diferentes. Se establecieron tres categorías de la hidrofobicidad de acuerdo al siguiente esquema: débil (<21%), moderada (21-50%) y fuerte (>50%) (Norouzi *et al.*, 2010).

2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizaron técnicas de análisis de varianza para comparar los parámetros de crecimiento cinético (L , μ y E) y el porcentaje de afinidad al xileno. La separación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Duncan. El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft). Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P<0,05$).

OBJETIVO 3. Conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

3.1. MUESTRAS Y CEPAS

En este trabajo se utilizaron 55 muestras de carne de caza silvestre: corzo (*Capreolus capreolus*, 35 muestras), jabalí (*Sus scrofa*, 14 muestras), conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*, dos muestras), faisán (*Phasianus colchicus*, dos muestras) y la paloma silvestre (*Columba palumbus*, dos muestras). Las muestras procedían de animales que habían sido cazados en las comunidades autónomas de Castilla y León y Galicia.

Las muestras, que se tomaron de las extremidades posteriores de los animales una vez desollados, se obtuvieron mediante la escisión, con ayuda de una plantilla y un bisturí estériles, de un fragmento de 5 cm^2 de superficie y aproximadamente 3 mm de espesor de la superficie de la carne. La selección de zona exacta de las extremidades utilizada para la

MATERIAL Y MÉTODOS

toma de muestras se realizó de forma aleatoria. Cada muestra se introdujo en una bolsa de homogeneización estéril junto con 45 mL de agua de peptona 0,1% (peso/volumen) (Oxoid) y se homogeneizó (Masticador IUL, Barcelona, España) durante dos minutos. A partir de este homogeneizado se realizaron diluciones decimales utilizando el mismo diluyente y se procedió a la siembra por duplicado en placas de agar kanamicina esculina azida (KEA, Oxoid) utilizando la técnica de siembra en profundidad (1 mL). Las placas se incubaron a 42º C durante durante 24 horas.

A partir de cada muestra se aislaron entre dos y 5 colonias con morfología típica de *Enterococcus*, que fueron caracterizadas en base a las pruebas de tinción por el método Gram, actividad catalasa, crecimiento a 10º C y a 45º C y crecimiento en presencia de 6,5% de NaCl. Los cocos Gram positivos capaces de crecer en las condiciones señaladas se identificaron con ayuda del sistema miniaturizado API 20 Strep (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Francia) siguiendo las especificaciones del fabricante. Para la interpretación de los resultados se utilizó el software de identificación apiweb™ V8.0 (bioMérieux). La identificación a nivel de especie se confirmó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*, PCR) utilizando los cebadores (F, directo y R, reverso) y condiciones específicos para la detección de los genes *ddl*_{*E. faecalis*} (*Enterococcus faecalis*), *ddl*_{*E. faecium*} (*Enterococcus faecium*), *vanC-1* (*Enterococcus gallinarum*), *vanC-2/vanC-3* (*Enterococcus casseliflavus/Enterococcus flavesiens*), *murG* (*Enterococcus hirae*) y *mur-2_{ed}* (*Enterococcus durans*) (Tabla 12).

Tabla 12. Genes diana y condiciones usadas para la identificación por PCR de *Enterococcus* spp.

Gen diana	Cebador	Secuencia (5'-3')	T ^a de anillado (°C) (tamaño del amplicón, bp)	Referencia
<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i> -F <i>ddl</i> <i>E. faecalis</i> -R	ATCAAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAAGCTTAACTG	54 (941)	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>ddl</i> <i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <i>E. faecium</i> -F <i>ddl</i> <i>E. faecium</i> -R	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	54 (550)	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>)	<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>)-F <i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>)-R	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	54 (822)	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>E. casseliflavus/E. flavesiens</i> (<i>vanC-2/vanC-3</i>)	<i>E. casseliflavus/E. flavesiens</i> (<i>vanC-2/vanC-3</i>)-F <i>E. casseliflavus/E. flavesiens</i> (<i>vanC-2/vanC-3</i>)-R	CTCCTACGATTCTCTTG CGAGGAAGACCTTAAG	54 (439)	Dutka-Malen et al. (1995)
<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)	<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)-F <i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)-R	GGCATATTATCAGCACTAG CTCTGGATCAAGTCCATAAGTGG	55 (521)	Arias et al. (2006)
<i>E. durans</i> (<i>mur-2_{ed}</i>)	<i>E. durans</i> (<i>mur-2_{ed}</i>)-F <i>E. durans</i> (<i>mur-2_{ed}</i>)-R	AACAGCTTACTTGACTGGACGC GTATGGCGCTACTACCCGTATC	55 (177)	Arias et al. (2006)

El ADN de las cepas se extrajo con ayuda del sistema comercial de extracción InstaGene Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EE.UU.). La pureza y concentración del ADN se determinó con ayuda del espectrofotómetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EE.UU.).

Las reacciones (PCR) se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL, con las siguientes concentraciones de reactivos: 0,5 µM de cada cebador (Isogen Life Science, Barcelona, España), 0,2 mM de una mezcla de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) (GeneAmp® dNTP blend, Thermo Scientific), 1x de tampón incompleto (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Alemania), 3 mM de MgCl₂ (Bioron), 1,25 U del enzima taq ADN polimerasa (Bioron) y 5 µL de la solución del ADN bacteriano.

Las amplificaciones del ADN se realizaron en un termociclador Mastercycler (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, España). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (1% peso/volumen; Bioron) en 1x tampón Tris-Aacetato-EDTA (TAE), usando GelRed (Biotium Inc., Hayward, California, EE.UU.) a concentración 1:10.000 para la tinción de los ácidos nucleicos. Las bandas de electroforesis se visualizaron y fotografiaron con ayuda de un transiluminador UV (Gel Doc™ EZ System; Bio-Rad). El tamaño de cada amplicón se estimó usando un marcador de peso molecular (1-kb; Bioron). En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (muestra sin el gen diana) y positivos (muestra con el gen diana procedente de la colección de cepas de la Universidad de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal). Las pruebas que se señalan a continuación se realizaron con una única cepa de cada especie por muestra de carne de caza estudiada.

3.2. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

Se examinó la susceptibilidad de los enterococos aislados frente a un panel de catorce antimicrobianos en agar Mueller-Hinton (Oxoid) mediante el método de difusión por disco (CLSI, 2013). Se utilizaron los siguientes discos: ampicilina (AMP; 10 µg), vancomicina (VA; 30 µg), teicoplanina (TEC; 30 µg), eritromicina (E; 15 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), nitrofurantoína (F; 300 µg), rifampicina (RD; 5 µg), fosfomicina (FOS; 200 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), quinupristina-dalfopristina (QD; 15 µg), gentamicina (CN; 120 µg), kanamicina (K; 120 µg) y estreptomicina (S; 300 µg). Todos los discos de

antibióticos fueron adquiridos ya elaborados (Oxoid) con la excepción de los discos de kanamicina, que se prepararon en nuestro laboratorio. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se utilizaron como cepas de referencia para el control de los discos de antibióticos. Tras la incubación a 35° C durante 18-24 h los halos de inhibición se midieron y las cepas se clasificaron como sensibles, con resistencia intermedia (susceptibilidad intermedia) o resistentes en base a las guías CLSI. En el caso de la gentamicina, kanamicina y estreptomicina únicamente se consideró la categoría de resistencia de alto nivel (*high-level resistance*, HLR) (CLSI, 2014).

OBJETIVO 4. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

4.1. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Los genes de resistencia a la vancomicina [*vanA*, *vanB*, *vanD*], macrólidos [*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*], tetraciclina [*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*], cloranfenicol [*catA*], estreptograminas [*vat(D)*, *vat(E)*] y aminoglucósidos [*acc(6')-aph(2'')*, *aph(3')-III*A, *ant(6)-la*] fueron estudiados mediante la técnica de PCR en todas las cepas de enterococos que mostraron resistencia o susceptibilidad intermedia a estos antimicrobianos. Con la finalidad de detectar la presencia de los transposones Tn5397-like y Tn916/Tn1545-like se llevó a cabo la técnica de PCR para la detección de los genes *tdhX* e *int*, respectivamente, en el caso de las cepas que presentaban el gen *tet(M)*. Los cebadores y condiciones de amplificación usados se muestran en la Tabla 13.

4.2. DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

La presencia de genes implicados en la expresión de gelatinasa (*gelE*), sustancia de agregación (*agg*), factor de colonización (*ace*), determinante de feromonas (*cpd*), regulador de la expresión del *gelE* (*frs*), proteína de superficie de enterococos (*esp*), hialuronidasa (*hyl*) y adhesinas de la pared celular (*efaAfs* y *efaAfm*) se estudió mediante PCR (Tabla 13).

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 13. Genes diana y condiciones usadas en las reacciones de PCR llevadas a cabo en el presente Trabajo.

Gen diana	Cebador	Secuencia (5'-3')	T ^a de anillado (°C) (tamaño del amplicón, bp)	Referencia
<i>vanA</i>	vanA-F vanA-R	GGGAAACGACAATTGC GTACAATCGGGCCGTTA	54 (732)	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanB</i>	vanB-F vanB-R	ATGGGAAGCCGATAGTC GATTCGTTCCCTCGACC	54 (635)	Dutka-Malen <i>et al.</i> (1995)
<i>vanD</i>	vanD-F vanD-R	TAAGGCGCTTGATATACCG TGCAAGCCAATATCCGGTAA	54 (461)	Perichon <i>et al.</i> (1997)
<i>erm(A)</i>	erm(A)-F erm(A)-R	TCTAAAAGCATGTAAGAA CTTCGATAGTTATAATTAGT	52 (645)	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(B)</i>	erm(B)-F erm(B)-R	GAAAAGGTACTCAACCAAATA AGTAACGGTACTAAATTGTTAC	52 (639)	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>erm(C)</i>	erm(C)-F erm(C)-R	TCAAAACATAATAGATAAA GCTAAATTGTTAAATCGTCAAT	52 (642)	Sutcliffe <i>et al.</i> (1996)
<i>tet(K)</i>	tet(K)-F tet(K)-R	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC GCAAACCTATCCAGAACAGCA	55 (697)	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(L)</i>	tet(L)-F tet(L)-R	CATTGGTCTTATTGGATCG ATTACACTTCCCATTTCGG	50 (456)	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(M)</i>	tet(M)-F tet(M)-R	GTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCAACAA	55 (576)	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>tet(O)</i>	tet(O)-F tet(O)-R	ACGGARAGTTATTGTATACC TGGCGTATCTATAATGTTGAC	60 (171)	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>tet(S)</i>	tet(S)-F tet(S)-R	GAAAGCTTACTATACAGTAGC AGGAGTATCTACAATATTAC	50 (169)	Aminov <i>et al.</i> (2001)
<i>catA</i>	catA-F catA-R	GGATATGAAATTATCCCTC CAATCATCTACCCATGAAT	50 (486)	Aarestrup <i>et al.</i> (2000)
<i>vat(D)</i>	vat(D)-F vat(D)-R	CCGAATCCTATGAAAATGTATCC GCAGCTACTATTGCACCATCCC	55 (413)	Robredo <i>et al.</i> (2000b)
<i>vat(E)</i>	vat(E)-F vat(E)-R	ACGTTACCCATCACTATG GCTCCGATAATGGCACCGAC	55 (282)	Robredo <i>et al.</i> (2000b)
<i>aac(6')-aph(2'')</i>	<i>aac(6')-aph(2'')</i> -F <i>aac(6')-aph(2'')</i> -R	CCAAGAGCAATAAGGGCAT CACTATCATAACCACTACCG	60 (220)	Van de Klundert y Vliegenthart (1993)
<i>aph(3')-Illa</i>	<i>aph(3')-Illa</i> -F <i>aph(3')-Illa</i> -R	GCCGATGTGGATTGCGAAA GCTTGATCCCCAGTAAAGTCA	60 (292)	Van de Klundert y Vliegenthart (1993)
<i>ant(6)-la</i>	<i>ant(6)-la</i> -F <i>ant(6)-la</i> -R	ACTGGCTTAATCAATTGGG GCCTTCCGCCACCTCACCG	58 (577)	Clark <i>et al.</i> (1999)
Tn5397	Tn5397-F Tn5397-R	ATGATGGTTGGACAAAGA CTTGCTCGATAGGCTCTA	53 (1500)	Agerso <i>et al.</i> (2006)
Tn916/Tn1545	Tn916/Tn1545-F Tn916/Tn1545-R	GGCGTATTGATCTCACT GACGCTCCTGTTCTTCT	50 (1046)	Doherty <i>et al.</i> (2000)
<i>gelE</i>	<i>gelE</i> -F <i>gelE</i> -R	AGTTCATGTCTTTTCTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	56 (402)	Jurkovič <i>et al.</i> (2006)
<i>agg</i>	<i>agg</i> -F <i>agg</i> -R	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC AAACGGCAAGACAAGATAATA	56 (1553)	Eaton y Gasson (2001)
<i>ace</i>	<i>ace</i> -F <i>ace</i> -R	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTGGTTGCG	56 (320)	Mannu <i>et al.</i> (2003)
<i>cpd</i>	<i>cpd</i> -F <i>cpd</i> -R	TGGTGGGTATTTCATTTC TACGGCTCTGGTTACTA	47 (782)	Eaton y Gasson (2001)
<i>frs</i>	<i>frs</i> -F <i>frs</i> -R	AACCAGAACGACCAATGAAT GCCCTCTATAACTCAATACC	60 (3268)	Pillai <i>et al.</i> (2002)
<i>esp</i>	<i>esp</i> -F <i>esp</i> -R	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC GCGTCAACACTGCTTGGCAA	61 (933)	Eaton y Gasson (2001)
<i>hyl</i>	<i>hyl</i> -F <i>hyl</i> -R	GAGTAGAGGAATATCTTAGC AGGCTCAAATTCTGT	50 (661)	Klare <i>et al.</i> (2005)
<i>efaAfs</i>	<i>efaAfs</i> -F <i>efaAfs</i> -R	GACAGACCCCTCACGAATA AGTTCATCATGCTGTAGTA	55 (705)	Eaton y Gasson (2001)
<i>efaAfm</i>	<i>efaAfm</i> -F <i>efaAfm</i> -R	AACAGATCCGCTAGAATA CATTTCATCATGATAGTA	50 (735)	Eaton y Gasson (2001)

OBJETIVO 5. Conocer la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci, VRE*) en preparados de carne de ave, cerdo y vacuno del noroeste de España.

5.1. TOMA DE MUESTRAS

Se obtuvieron un total de 160 muestras (de aproximadamente 300 g cada una) de preparados crudos de carne de ave (pollo y/o pavo, 80 muestras), cerdo (40 muestras) y vacuno (40 muestras) en establecimientos de venta de venta al público (se tomaron entre seis y ocho muestras en cada punto de venta) de la provincia de León. Se adquirieron muestras en un total de 24 establecimientos, realizándose tres visitas a cada establecimiento y tomándose dos o tres muestras en cada visita. Los preparados de carne de ave incluían salchichas rojas (5 muestras), salchichas blancas (9), hamburguesas (19), albóndigas (10), *nuggets* (8), carne picada (11), escalope (12) y *crepes* (6). Los preparados de carne de cerdo incluían salchichas rojas (11 muestras), salchichas blancas (6), albóndigas (una), carne picada (17) y escalope (5). Finalmente, los preparados de carne de vacuno incluían hamburguesas (9), albóndigas (10), carne picada (10) y escalope (11). Así, se adquirieron muestras de salchichas rojas (16 muestras), salchichas blancas (15), hamburguesas (28), albóndigas (21), *nuggets* (8), carne picada (38), escalope (28) y *crepes* (6). Cada muestra se introdujo en una bolsa de plástico estéril y se transportó de forma inmediata al laboratorio en una nevera portátil. Las muestras se almacenaron a $3\pm1^\circ\text{C}$ durante un tiempo máximo de 4 horas hasta el momento del análisis.

5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Las muestras (de 25 g cada una) se homogeneizaron durante dos minutos en un homogeneizador de paletas (Masticator, IUL) con 225 mL de agua de peptona al 0,1% (peso/volumen) (Oxoid). Cada una de las muestras de salchichas, hamburguesas, albóndigas, *nuggets*, escalope y *crepes* se tomó a partir de dos o más piezas del mismo lote. Después de la incubación a 37°C durante 24 horas, se procedió a la siembra de 0,1 mL de la muestra en la superficie de placas de agar Slanetz-Bartley (Oxoid) suplementado con 6 $\mu\text{g/mL}$ de *vancomicina* (Sigma-Aldrich). Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C .

A partir de cada muestra se tomaron de tres a 5 colonias con morfología típica de *Enterococcus* spp., que fueron caracterizadas inicialmente en base a las pruebas de tinción por el método Gram, actividad catalasa, crecimiento a 10° C y a 45° C y crecimiento en presencia de 6,5% de cloruro sódico. Para la identificación a nivel de género, los cocos Gram-positivos capaces de crecer en las condiciones mencionadas se inocularon en galerías API 20 Strep (bioMérieux) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cepas se identificaron utilizando la base de datos apiweb™ V8.0 (bioMérieux). Los enterococos se identificaron a nivel de especie por ribotipado y mediante PCR.

La prevalencia de VRE en diferentes preparados cárnicos se comparó mediante la prueba de Fisher. Los datos se analizaron con ayuda de programa informático Statistica® 8.0 (Statsoft).

5.3. RIBOTIPIA

Para la ribotipificación, se utilizaron colonias aisladas de cultivos jóvenes (18 a 20 horas) crecidos en placas de agar triptona de soja (TSA, Oxoid). El sistema de caracterización microbiana automatizado RiboPrinter® (Dupont Qualicon; Wilmington, Delaware, EE.UU.) realizó la ribotipificación de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En ocho horas se llevó a cabo la lisis de las células bacterianas con liberación de ADN celular, la digestión del ADN cromosómico con la enzima de restricción EcoRI, la separación de los fragmentos resultantes por electroforesis en gel de agarosa y la hibridación con una sonda de ADN marcada con un compuesto quimioluminiscente que contiene el operón del ARN ribosomal de *E. coli*. La identificación de las cepas fue proporcionada de forma automática por el Riboprinter®.

5.4. IDENTIFICACIÓN POR PCR

La identificación a nivel de especie se realizó también mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores (F, directo y R, reverso) y condiciones específicos para la detección de los genes *ddl*_{*E. faecalis*} (*Enterococcus faecalis*), *ddl*_{*E. faecium*} (*Enterococcus faecium*), *vanC-1* (*Enterococcus gallinarum*), *vanC-2/vanC-3* (*Enterococcus casseliflavus/Enterococcus flavesiens*), *murG* (*Enterococcus hirae*) y *mur-2_{ed}* (*Enterococcus durans*) (Tabla 12).

El ADN de las cepas se extrajo con ayuda del sistema comercial de extracción InstaGene Matrix (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y

concentración del AND se determinó con ayuda del espectrofotómetro NanoDropTM ND-1000 (Thermo Scientific).

Las reacciones (PCR) se llevaron a cabo en un volumen final 25 µL, con los siguientes componentes: 2,5 µL de tampón incompleto (10x; Bioron), 0,75 µL de cloruro de magnesio (100 mM; Bioron), 0,5 µL de una mezcla de los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's) (10 nM; GeneAmp® dNTP blend, Thermo Scientific), 0,5 µL de cada cebador (25 µL; Isogen Life Science), 0,25 µL de taq ADN polimerasa (5 U/ µL; Bioron), 15 µL de agua destilada estéril y 5 µL de la solución del ADN bacteriano extraído.

Las amplificaciones del ADN se realizaron en un termociclador Mastercycler (Eppendorf). Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (1% peso/volumen; Bioron) en 1x tampón Tris-Aacetato-EDTA (TAE), usando GelRed (Biotium) a concentración 1:10.000 para la tinción de los ácidos nucleicos. Las bandas de electroforesis se visualizaron y fotografiaron con ayuda de un transiluminador UV (Gel DocTM EZ System; Bio-Rad). El tamaño de cada amplicón se estimó usando un marcador de peso molecular (1-kb; Bioron). En todos los ensayos se incluyeron controles negativos (muestra sin el gen diana) y positivos (muestra con el gen diana procedente de la colección de cepas de la Universidad de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal). Las pruebas que se señalan a continuación se realizaron con una única cepa de cada especie por muestra de preparado cárnico ensayado.

5.5. PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS

La cepas de *Enterococcus* spp. se ensayaron frente a un panel de 11 antimicrobianos en agar Mueller-Hinton (Oxoid) por el método de difusión por disco (CLSI, 2013). Se utilizaron los siguientes discos: vancomicina (VA; 30 µg), teicoplanina (TEC; 30 µg), ampicilina (AMP; 10 µg), gentamicina (CN; 120 µg), kanamicina (K; 120 µg), estreptomicina (S; 300 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), tetraciclina (TE; 30 µg), eritromicina (E; 15 µg), quinupristina-dalfopristina (QD; 15 µg) y ciprofloxacina (CIP; 5 µg).

Todos los discos de antibióticos fueron adquiridos listos para su uso (Oxoid) con la excepción de los discos de kanamicina, que se prepararon en nuestro laboratorio. Para el control de los discos de antibióticos se utilizaron como cepas de referencia *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Tras la incubación a 35º C

durante 18-24 h los halos de inhibición se midieron y las cepas se clasificaron como sensibles, con resistencia intermedia (susceptibilidad intermedia) o resistentes en base a las guías CLSI. Se procedió a la detección de genes de resistencia a antibióticos en los aislamientos con resistencia o susceptibilidad intermedia a uno o más antimicrobianos. En el caso de la gentamicina, kanamicina y estreptomicina, únicamente se consideró la categoría de resistencia de alto nivel (*high-level resistance*, HLR) (CLSI, 2014).

OBJETIVO 6. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en aislamientos de VRE de preparados cárnicos en el noroeste de España y conocer la capacidad de las cepas para formar *biofilm*.

6.1. DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Se utilizó la técnica de PCR para poner de manifiesto la presencia de los genes *vanA*, *vanB*, *vanD* (para la detección de mecanismos de resistencia adquirida a la vancomicina), *vanC-1* y *vanC-2/vanC-3* (para la detección de mecanismos de resistencia intrínseca) en las cepas de VRE. Asimismo, se estudió la presencia de genes de resistencia al cloranfenicol [*catA*], tetraciclina [*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*], eritromicina [*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*] y quinupristina-dalfopristina [*vat(D)*, *vat(E)*] en todas las cepas de enterococos que mostraron resistencia o susceptibilidad intermedia a estos antimicrobianos. Con la finalidad de detectar la presencia de los transposones Tn5397-like y Tn916/Tn1545-like se llevó a cabo la técnica de PCR para la detección de los genes *tdnX* e *int*, respectivamente, en el caso de las cepas que presentaban el gen *tet(M)*. Los cebadores y condiciones de amplificación usados se muestran en las Tablas 12 y 13.

6.2. DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

La presencia de genes relacionados con factores de virulencia [gelatinasa (*geE*), sustancia de agregación (*agg*), factor de colonización (*ace*), determinante de feromonas (*cpd*), regulador de la expresión del *geE* (*frs*), proteína de superficie de enterococos (*esp*), hialuronidasa (*hyl*) y adhesinas de la pared celular (*efaAfs* y *efaAfm*)] se investigó mediante la técnica de PCR utilizando los cebadores y condiciones descritos con anterioridad (Tabla 13).

6.3. FORMACIÓN DE BIOFILM

La producción de *biofilm* se determinó usando el ensayo de tinción con cristal violeta previamente descrito (Díez-García *et al.*, 2012). La densidad óptica (DO) de las células adheridas se midió a 580 nm en placas de microtítulo de poliestireno de 100 pocillos utilizando un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves) después de la tinción con cristal violeta y el aclarado de los pocillos.

Previamente a la realización del ensayo, las cepas de VRE se transfirieron a tubos con caldo triptona de soja (TSB, Oxoid), que fueron incubados a 37° C durante 5 horas. En estas condiciones los cultivos alcanzaban concentraciones de 10^8 ufc/mL. Los pocillos de las placas de microtítulo se llenaron con 20 µL de la tercera dilución (realizada en TSB, Oxoid) de este cultivo y 230 µL de TSB, para obtener así una concentración de aproximadamente 10^4 ufc/mL en los pocillos. Esta concentración se comprobó por siembra en placa. Se utilizaron cinco controles negativos (250 µL de TSB sin inóculo) por placa de microtítulo para confirmar la ausencia de contaminación. Las placas de microtítulo se incubaron en condiciones de aerobiosis durante 24 horas a 37° C. Transcurrido este tiempo se desechó el contenido de la placa y los pocillos se lavaron con 300 µL de agua destilada. Las bacterias que permanecían adheridas se fijaron añadiendo 250 µL de metanol a cada pocillo. Al cabo de 15 minutos los pocillos se vaciaron volteando la placa, se secaron al aire y se tiñeron adicionando 250 µL de una solución de cristal violeta, que se dejó actuar durante 5 minutos. El exceso de colorante se eliminó colocando la placa de microtítulo bajo el grifo. Posteriormente las placas se secaron al aire y el colorante fijado a las células adheridas se solubilizó añadiendo a los pocillos 250 µL de ácido acético glacial al 33%. La densidad óptica de cada pocillo se determinó a 580 nm (DO_{580}) utilizando un Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves). Las placas de microtítulo se agitaron durante un minuto antes de la determinación de la turbidez. Los experimentos se repitieron cuatro veces en días diferentes.

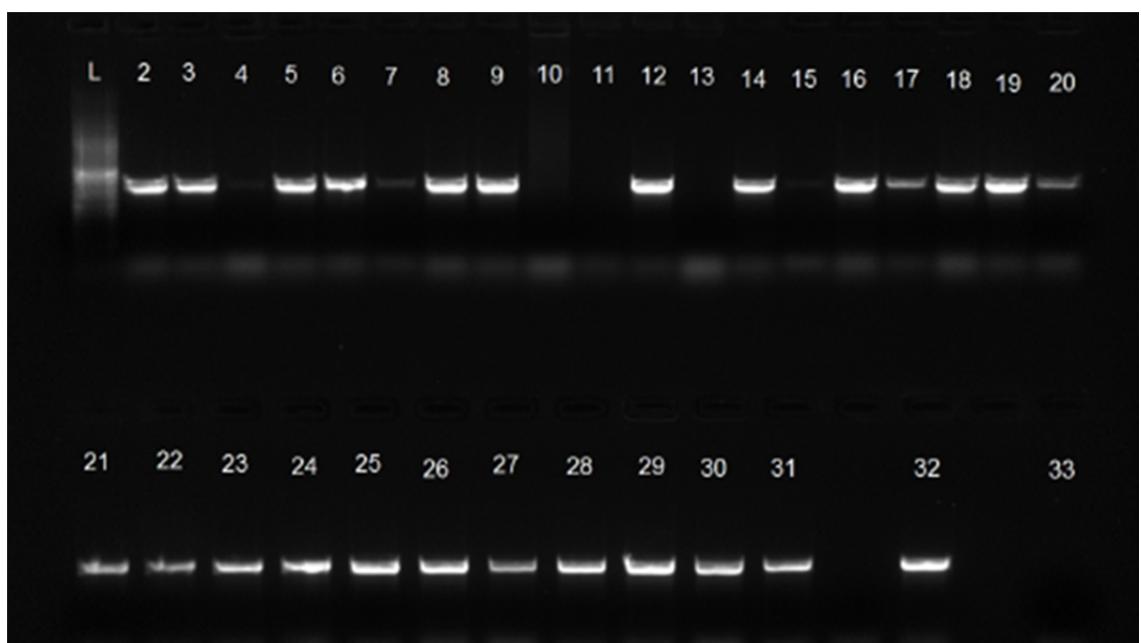
La DO_{580} de corte (DOc) se definió como el valor medio de la DO_{580} de los controles negativos más tres desviaciones estándar. Las cepas se clasificaron en tres categorías: no productoras de *biofilm*, cuando $DO_{580} \leq DO_c$, débiles productoras de *biofilm*, cuando $DO_c < DO_{580} \leq (2 \times DO_c)$, moderadas productoras de *biofilm*, cuando $(2 \times DO_c) < DO_{580} \leq (4 \times DO_c)$, o fuertes productoras de *biofilm*, cuando $(4 \times DO_c) < DO_{580}$.

OBJETIVO 7. Estudiar la diversidad genética de las cepas de VRE aisladas mediante su ribotipado.

7.1. RIBOTIPIA

La técnica utilizada para la ribotipificación de las cepas ha sido descrita en párrafos precedentes. El número, posición e intensidad relativa de los fragmentos de ADN se estimaron automáticamente con el software del RiboPrinter® (Dupont Qualicon), obteniéndose para cada muestra un registro de 256 dígitos. Las distancias de agrupamiento entre cepas se estimaron con ayuda del coeficiente de correlación de Pearson y las cepas se agruparon mediante el método de Ward, utilizando el programa Statistica® 8.0 (Statsoft). Los *cluster* se establecieron para cepas con una distancia de agrupamiento ($1-Pearson\ r \leq 0,25$). Este valor se fijó en base a los resultados de un análisis previo realizado con tres cepas de colección de *Enterococcus* examinadas, cada una de ellas, en tres geles diferentes.

RESULTADOS



RESULTADOS

OBJETIVO 1. Determinar si la exposición de *Escherichia coli* ATCC 12806 a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico, nitrito sódico o hipoclorito sódico provoca la adaptación de la cepa y si esta adaptación se asocia con protección cruzada a otros biocidas.

1.1. ADAPTACIÓN Y ADAPTACIÓN CRUZADA

El método turbidimétrico (las densidades ópticas se midieron utilizando un filtro de banda ancha entre 420-580 nm; OD₄₂₀₋₅₈₀) permitió obtener una relación lineal con los recuentos de células viables únicamente en el rango de 0,200-0,700 (Figura 23). Se obtuvo una correlación de 0,9177 ($R^2=0,8421$) en este intervalo. Por lo tanto, se consideró el punto de corte para el crecimiento bacteriano una densidad óptica de 0,200.

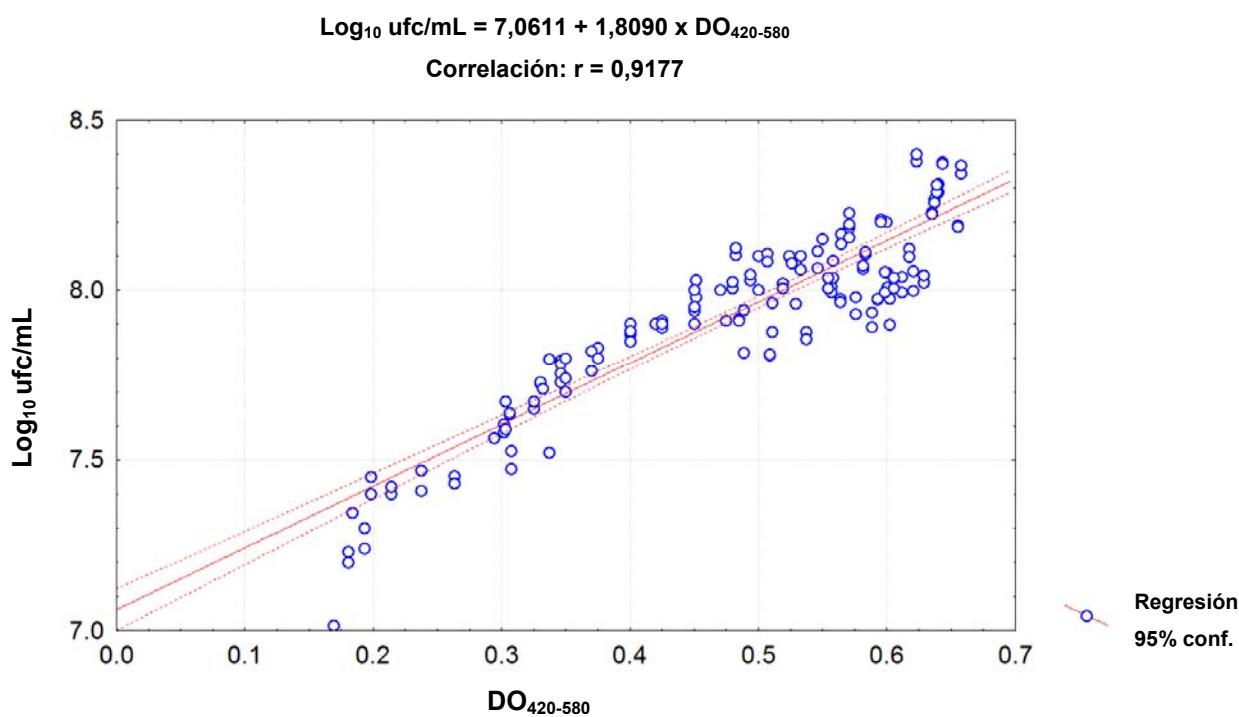


Figura 23. Relación entre los recuentos microbianos y la densidad óptica medida a 420-580 nm (DO₄₂₀₋₅₈₀) de la cepa *Escherichia coli* ATCC 12806 incubada a 37±1° C.

RESULTADOS

Las MICs de los biocidas para *E. coli* antes de la exposición a concentraciones subinhibitorias de los compuestos fueron: 10,428 mg/mL (FTS), 14,876 mg/mL (NS) y 0,239 mg/mL (HIP). Tras la exposición a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas, las concentraciones máximas de compuestos que permitieron el crecimiento bacteriano al cabo de 72 horas de incubación a 37 °C eran: 11,731 mg/mL (FTS), 37,655 mg/mL (NS) y 0,403 mg/mL (HIP). Estas concentraciones de biocidas fueron 1,13 (FTS), 2,53 (NS) y 1,69 (HIP) veces el valor de las MICs observadas en las células antes de la adaptación. La estabilidad de la tolerancia adquirida a los biocidas se determinó realizando pasos de las células cada 24 h en TSB (Oxoid) libre de biocidas. En ausencia de presión selectiva, las células adaptadas al FTS perdían la tolerancia adquirida, volviendo a su sensibilidad inicial, previa al experimento de adaptación. Cuando los cultivos bacterianos adaptados a NS o HIP se subcultivaron durante 7 días en un medio libre de biocidas, las células fueron capaces de crecer en presencia de la concentración máxima de biocidas que permitió el crecimiento de las bacterias inmediatamente después de la adaptación. Esto sugiere que en *E. coli* ATCC 12806 la tolerancia adquirida a NS e HIP fue estable, al menos, durante 7 pasos.

Incluyendo las réplicas, se generaron un total de 96 curvas de crecimiento (combinaciones de adaptación a los biocidas, exposición a los biocidas y exposición a CCCP), que se ajustaron a la ecuación de Gompertz modificada. Se tomaron 121 determinaciones de densidades ópticas ($OD_{420-580}$) durante el período de 120 h, para cada combinación ensayada (desde la hora 0 hasta la hora 120, a intervalos de una hora). Los parámetros cinéticos estimados a partir de la ecuación de Gompertz ajustada se resumen en las Tablas 14 a 16. La Figura 24 muestra las curvas de crecimiento de *E. coli* ATCC 12806 bajo cada condición estudiada.

Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos (>0,90 en todos los casos) pusieron de manifiesto una buena bondad del ajuste conseguido con el modelo utilizado. En base a estos resultados, la ecuación de Gompertz modificada se considera apropiada para describir el crecimiento *in vitro* de *E. coli* ($DO_{420-580}$), dada la concordancia encontrada entre los valores observados y los predichos.

La presencia de biocidas causó una reducción en el crecimiento de las células de *E. coli* no adaptadas. Así, la fase de latencia (L) de las células no expuestas (-6,420±7,860

horas) aumentó ($P<0,05$) cuando se añadieron biocidas en los caldos de cultivo (entre $-4,510 \pm 5,960$ y $18,782 \pm 15,159$ horas, dependiendo del compuesto usado) (Tabla 14). Además, se observó la disminución ($P<0,05$) en el ritmo de crecimiento (μ) y la DO₄₂₀₋₅₈₀ máxima en la fase estacionaria (E) de los cultivos no adaptados cuando crecieron en presencia de biocidas (Tablas 15 y 16).

Tabla 14. Fase de latencia (L; horas) de *Escherichia coli* ATCC 12806 adaptada y/o expuesta a diferentes compuestos.

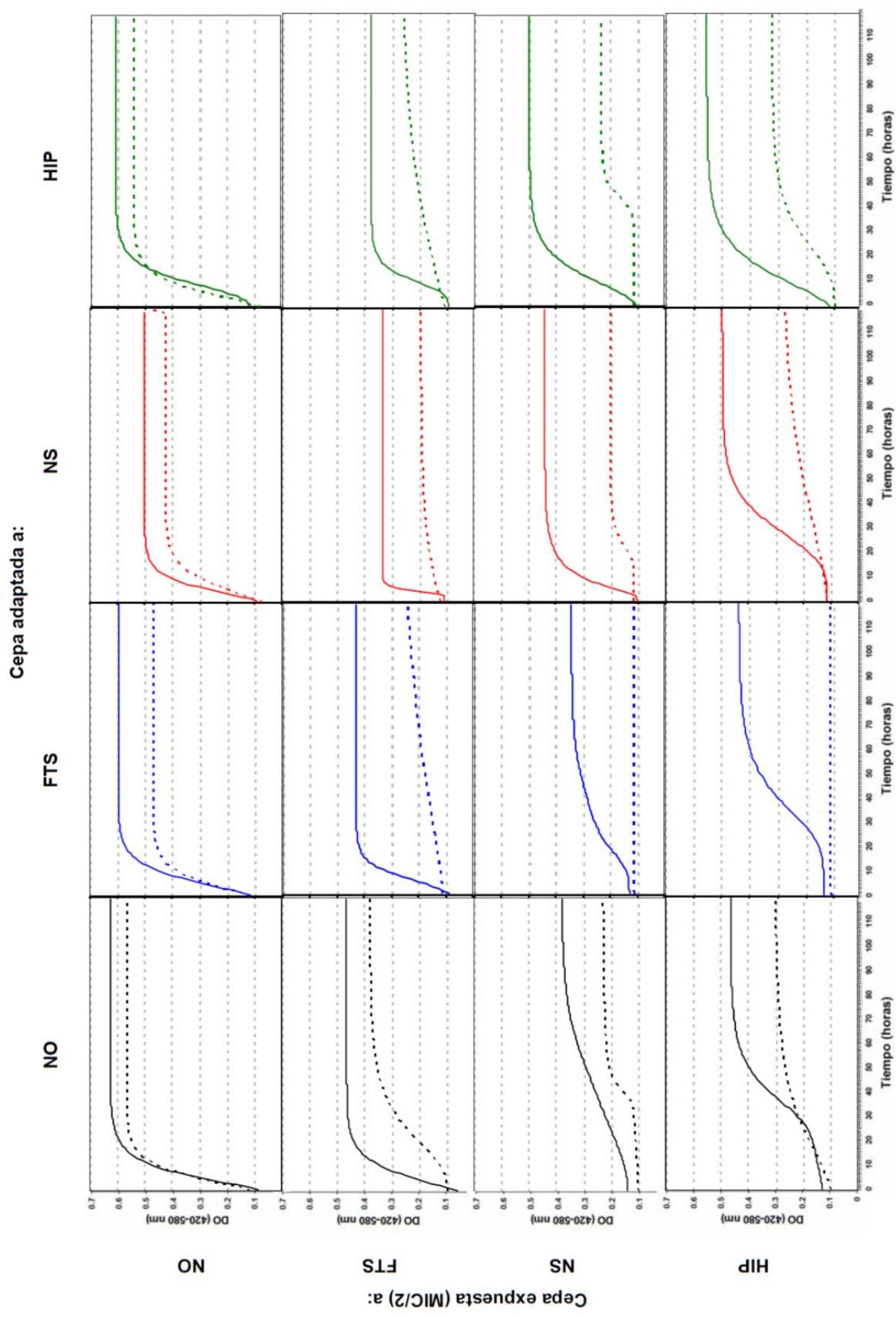
		Cultivo previamente adaptado a ¹ :			
Cultivo expuesto a ² :		NC	FTS	NS	HIP
NC	sin CCCP	-6,420 ± 7,860Aa	-1,946 ± 0,367ABa	0,851 ± 2,386ABa	2,730 ± 0,775Ba
	con CCCP	-1,342 ± 1,499Aa	-1,152 ± 3,382Aa	-2,237 ± 7,325Aa	-2,732 ± 6,656Aab
FTS	sin CCCP	-4,510 ± 5,960Aa	-0,241 ± 6,175ABa	2,896 ± 0,034ABa	4,970 ± 1,824Ba
	con CCCP	8,556 ± 1,165Aa *	0,158 ± 0,081Aa	-6,859 ± 9,844Aa	-47±394 ± 58,725Aa
NS	sin CCCP	18,782 ± 15,159Ab	15,998 ± 12,691Ab	2,910 ± 0,571Ba	25,718 ± 4,607Ab
	con CCCP	27,493 ± 18,281ABb	-	16,097 ± 1,365ACb ***	39,605 ± 3,649Bb *
HIP	sin CCCP	16,446 ± 16,935ABb	20,874 ± 4,289Ab	17,981 ± 0,572Ab	-0,662 ± 2,534Ba
	con CCCP	-0,764 ± 6,605Aa	-	0,126 ± 0,005Aa *	10,741 ± 7,253Ab *

¹, para la adaptación, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas; ², los cultivos se hicieron crecer (a la vez que se determinaron los parámetros de crecimiento microbiano) en presencia de biocidas (a concentración MIC/2).

Los datos (media±STD) se corresponden con el valor medio de tres réplicas llevadas a cabo en días diferentes.

- , sin crecimiento. NC, sin biocida; FTS, fosfato trisódico; NS, nitrito sódico; HIP, hipoclorito sódico; CCCP, carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (se añadió a 50 µM al caldo de cultivo).

Los valores medios en la misma fila sin letras mayúsculas en común presentan diferencias significativas ($P<0,05$). Los valores medios en la misma columna relativos a la misma condición en relación con el CCCP - presencia o ausencia- (se compararon diferentes compuestos) sin letras minúsculas en común presentan diferencias significativas ($P<0,05$). Las diferencias entre medias en la misma columna para cada compuesto (se compararon las medias en presencia y ausencia de CCCP) se señalan con asteriscos: *, $P < 0,05$; ***, $P<0,001$.



Para la adaptación, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas. Para la exposición, los cultivos se hicieron crecer en presencia de biocidas (a concentración MIC/2).

NC, sin biocida; FTS, fosfato trisódico; NS, nitrito sódico; HIP, hipoclorito sódico; CCCP, carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona.

Línea continua, crecimiento en ausencia de CCCP; Línea punteada, crecimiento en presencia de CCCP (se añadió a 50 µM al caldo de cultivo).

Figura 24. Curvas de crecimiento (n=3) de *Escherichia coli* ATCC 12806 examinada bajo diferentes condiciones.

RESULTADOS

Tabla 15. Ritmo máximo de crecimiento (μ ; incremento de densidad óptica por hora) de *Escherichia coli* ATCC 12806 adaptada y/o expuesta a diferentes compuestos.

		Cultivo previamente adaptado a:			
Cultivo expuesto a:		NC	FTS	NS	HIP
NC	sin CCCP	0,068 ± 0,039Aa	0,039 ± 0,003Aa	0,043 ± 0,005Ab	0,035 ± 0,009Aa
	con CCCP	0,041 ± 0,004Aa	0,034 ± 0,010Aa	0,043 ± 0,035Aa	0,055 ± 0,029Aa
FTS	sin CCCP	0,047 ± 0,032ABab	0,049 ± 0,022ABA	0,085 ± 0,001Aa	0,024 ± 0,004Bb
	con CCCP	0,009 ± 0,001Ab	0,022 ± 0,041Aa	0,004 ± 0,002Aa***	0,004 ± 0,002Ab***
NS	sin CCCP	0,006 ± 0,001Ab	0,009 ± 0,004Ab	0,044 ± 0,001Bab	0,020 ± 0,001Ab
	con CCCP	0,009 ± 0,005Ab	-	0,006 ± 0,001Aa *	0,011 ± 0,001Ab ***
HIP	sin CCCP	0,012 ± 0,004ABb	0,009 ± 0,002Ab	0,014 ± 0,001ABb	0,018 ± 0,004Bb
	con CCCP	0,005 ± 0,003ABb *	-	0,002 ± 0,001Aa *	0,007 ± 0,002Bb **

Para interpretación ver Tabla 14.

Tabla 16. Máxima densidad óptica (DO) en la fase estacionaria (E; DO₄₂₀₋₅₈₀) de *Escherichia coli* ATCC 12806 adaptada y/o expuesta a diferentes compuestos.

		Cultivo previamente adaptado a:			
Cultivo expuesto a:		NC	FTS	NS	HIP
NC	sin CCCP	0,627 ± 0,052Aa	0,598 ± 0,039Aa	0,503 ± 0,049Ba	0,609 ± 0,028Aa
	con CCCP	0,563 ± 0,079Aa	0,486 ± 0,102Aa	0,423 ± 0,055Aa	0,543 ± 0,108Aa
FTS	sin CCCP	0,466 ± 0,022Ab	0,429 ± 0,041Ab	0,331 ± 0,010Bb	0,377 ± 0,016Bb
	con CCCP	0,377 ± 0,033Ab *	0,234 ± 0,051Bb **	0,192 ± 0,028Bb *	0,267 ± 0,034Bb *
NS	sin CCCP	0,383 ± 0,037Ac	0,343 ± 0,011Ac	0,444 ± 0,085ABab	0,498 ± 0,094Bb
	con CCCP	0,228 ± 0,020Ac ***	-	0,199 ± 0,017Ab *	0,228 ± 0,028Ab **
HIP	sin CCCP	0,477 ± 0,044Ab	0,438 ± 0,022Ab	0,590 ± 0,014Ba	0,554 ± 0,024Ba
	con CCCP	0,308 ± 0,071Abc **	-	0,274 ± 0,001Ab **	0,319 ± 0,023Ab ***

Para interpretación ver Tabla 14.

La adaptación previa de *E. coli* produjo una ligera reducción del crecimiento en ausencia de los compuestos. Así, las células adaptadas mostraron una mayor ($P<0,005$) fase de latencia (valores medios de $0,143\pm2,453$ h) y un menor ($P<0,05$) ritmo de crecimiento ($0,038\pm0,006$ $\Delta OD/h$) que las células no adaptadas (- $6,420\pm7,860$ h y $0,068\pm0,039$ $\Delta OD/h$, respectivamente) en los medios de cultivo sin biocidas. La adaptación previa de *E. coli* a NS o HIP favoreció el crecimiento microbiano en presencia de biocidas. Las células adaptadas a NS mostraron valores de L inferiores ($2,910\pm0,571$ h) y valores de μ superiores ($0,044\pm0,002$ $\Delta OD/h$) a los de las células no adaptadas ($18,782\pm15,159$ horas y $0,006\pm0,001$ $\Delta OD/h$, respectivamente) en caldo con NS. Del mismo modo, las células adaptadas a HIP mostraron la menor L (- $0,662\pm2,534$ h) y el mayor μ ($0,018\pm0,004$ $\Delta OD/h$) en presencia de HIP. Por otro lado, la adaptación al FTS no modificó los parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli* en relación con los cultivos no adaptados.

El NS y el HIP originaron adaptación cruzada en los cultivos de *E. coli*. Así, los mayores valores de ritmo de crecimiento y $OD_{420-580}$ máxima en la fase estacionaria en presencia de dichos compuestos se obtuvieron para los cultivos previamente adaptados a NS e HIP.

OBJETIVO 2. Conocer el papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular en la adaptación de *E. coli* ATCC 12806 al fosfato trisódico, nitrito sódico e hipoclorito sódico.

2.1. MODIFICACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR DESPUÉS DE LA ADAPTACIÓN

Los parámetros cinéticos de crecimiento de *E. coli* en presencia de CCCP se presentan en las Tablas 14 a 16. La Figura 24 muestra las curvas de crecimiento obtenidas en presencia y en ausencia de CCCP. En los caldos sin biocidas, se observó un comportamiento similar por lo que respecta al crecimiento de *E. coli* en presencia y en ausencia de CCCP. En caldo de cultivo con biocidas, se observaron diferencias sustanciales en la cinética de crecimiento de *E. coli* entre los medios con CCCP y los medios de cultivo

RESULTADOS

sin CCCP. En presencia de FTS, la duración de la fase de latencia de las células no adaptadas fue mayor en los medios con CCCP que en los medios sin CCCP. Se observó una marcada influencia de la adición de CCCP en el caso de las células adaptadas a NS o HIP y crecidas en presencia de dichos compuestos, observándose un aumento de la fase de latencia y una disminución del ritmo de crecimiento máximo en presencia de CCCP. Cuando se añadieron a los caldos de cultivo FTS, NS o HIP, la concentración de bacterias en la fase estacionaria en presencia del inhibidor de las bombas de expulsión alcanzó valores más bajos que en ausencia de CCCP. El efecto del inhibidor de las bombas de expulsión fue marcado en el caso de las células adaptadas a FTS y expuestas a NS o HIP, donde el CCCP inhibió por completo el crecimiento bacteriano.

Se encontraron importantes diferencias en la hidrofobicidad (porcentaje de afinidad al xileno, que osciló entre $4,48 \pm 0,31\%$ y $65,32 \pm 3,39\%$) de los distintos grupos de células, dependiendo de las condiciones ensayadas (Tabla 17). Se observaron reacciones débil ($<20\%$), moderada (21% a 50%) o fuerte ($> 50\%$) para 6 (37,5%), 4 (25,0%) y 6 (37,5%) de las condiciones ensayadas, respectivamente. Los mayores valores de hidrofobicidad de la superficie celular (que se refleja por un mayor porcentaje de células que se desplazan hacia la fase hidrófoba en el ensayo MATS) se observaron en el caso de las células adaptadas y/o expuestas a NS, seguido por HIP. Por el contrario, los valores más bajos se observaron en el caso de los cultivos adaptados y/o expuestos a FTS.

Tabla 17. Hidrofobicidad (porcentaje de afinidad al xileno) de las células patrón (no adaptadas) y adaptadas en ausencia o presencia de concentraciones subinhibitorias de biocidas (MIC/2).

Cultivo expuesto a ² :	Cultivo previamente adaptado a ¹ :			
	NC	FTS	NS	HIP
NC	$16,11 \pm 1,60\text{Aa}$	$4,48 \pm 0,31\text{Ba}$	$66,15 \pm 2,42\text{Ca}$	$20,14 \pm 2,18\text{Da}$
FTS	$6,31 \pm 0,37\text{Ab}$	$6,20 \pm 0,55\text{Aa}$	$26,50 \pm 3,71\text{Bb}$	$17,89 \pm 2,99\text{Ca}$
NS	$64,53 \pm 3,80\text{Ac}$	$65,32 \pm 3,59\text{Ab}$	$65,32 \pm 3,59\text{Aa}$	$61,99 \pm 4,25\text{Ab}$
HIP	$24,82 \pm 6,95\text{Ad}$	$17,89 \pm 2,99\text{Ac}$	$60,95 \pm 2,57\text{Ba}$	$39,50 \pm 2,21\text{Cc}$

¹, para la adaptación, los cultivos fueron previamente expuestos a concentraciones crecientes subinhibitorias de los biocidas; ², los cultivos se hicieron crecer (a la vez que se determinaron los parámetros de crecimiento microbiano) en presencia de biocidas (a concentración MIC/2).

Los datos (media \pm STD) se corresponden con el valor medio de tres réplicas llevadas a cabo en días diferentes. NC, sin biocida; FTS, fosfato trisódico; NS, nitrito sódico; HIP, hipoclorito sódico. Los valores medios en la misma fila sin letras mayúsculas en común son significativamente diferentes ($P<0,05$). Los valores medios en la misma columna sin letras minúsculas en común son significativamente diferentes ($P<0,05$).

OBJETIVO 3. Conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

3.1. ESPECIES DE *Enterococcus*

Se aislaron cepas del género *Enterococcus* en las 55 muestras (100%) de carne de caza examinadas. *E. faecium* fue la especie más prevalente, con 45 aislamientos, seguida por *E. faecalis* (7 aislamientos) y *E. durans* (tres aislamientos). Como se indicó con anterioridad, se utilizó una única cepa de cada especie por muestra de carne de caza estudiada.

3.2. PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA

Se ensayó la susceptibilidad de los 55 enterococos aislados (uno por muestra) frente a 14 antimicrobianos utilizando la técnica de difusión por disco. En la Tabla 18 se muestra la distribución de las especies aisladas y los porcentajes de cepas resistentes a antibióticos por especie microbiana y origen. Se observaron elevados porcentajes de resistencia frente a eritromicina (89,1% de las cepas), tetraciclina (67,3%), ciprofloxacina (92,7%), nitrofurantoína (67,3%), y quinupristina-dalfopristina (81,8%). Por el contrario, se observó un bajo porcentaje (9,1%) de resistencia de alto nivel (*high-level resistance*, HLR) por lo que respecta a gentamicina, kanamicina y estreptomicina (HLR-CN, HLR-K y el HLR-S, respectivamente). Para los restantes agentes antimicrobianos se encontraron prevalencias intermedias de resistencia (entre 10,9% y 47,3% de las cepas).

La Tabla 19 muestra los diferentes fenotipos de resistencia detectados en los 55 aislamientos de enterococos procedentes de la carne de caza. Cabe destacar que todas las cepas mostraron un fenotipo de multirresistencia (resistencia a tres antibióticos al menos). El número medio de resistencias por cepa fue de 5,8 (*E. faecium*), 7,9 (*E. faecalis*) y 5,7 (*E. durans*).

Tabla 18. Prevalencia de la resistencia a antimicrobianos (%) en 55 enterococos aislados de muestras de carne de caza silvestre en el norte de España.

Antibiótico	Corzo			Jabalí			Conejo			Faisán			Paloma		
	<i>E. faecium</i> (n = 31)	<i>E. faecalis</i> (n = 1)	<i>E. durans</i> (n = 3)	Total (n = 35)	<i>E. faecium</i> (n = 10)	<i>E. faecalis</i> (n = 4)	Total (n = 14)	<i>E. faecalis</i> (n = 2)	<i>E. faecium</i> (n = 2)	<i>E. faecalis</i> (n = 2)	<i>E. faecium</i> (n = 2)	<i>E. faecalis</i> (n = 2)	Todas las cepas (n = 55)		
AMP	25,8	100	0,0	25,7	30,0	0,0	21,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	21,8	
VA	45,2	100	66,7	48,6	30,0	100	50,0	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	47,3	
TEC	16,1	0,0	0,0	14,3	10,0	0,0	7,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,9	
E	87,1	0,0	100	85,7	90,0	100	92,9	100	100	100	100	100	100	89,1	
TE	61,3	100	0,0	57,1	70,0	100	78,6	100	100	100	100	100	100	67,3	
CIP	96,8	100	33,3	91,4	90,0	100	92,9	100	100	100	100	100	100	92,7	
F	74,2	0,0	33,3	68,6	100	0,0	71,4	0,0	100	100	100	100	100	67,3	
RD	35,5	100	66,7	40,0	0,0	100	28,6	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,4	
FOS	45,2	0,0	66,7	45,7	60,0	0,0	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	50,0	41,8	
C	16,1	100	33,3	20,0	10,0	25,0	14,3	0,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	20,0	
QD	80,1	100	100	82,9	70,0	100	78,6	50,0	100	100	100	100	100	81,8	
CN	0,0	100	33,3	5,7	0,0	75,0	21,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	
K	0,0	0,0	33,3	2,9	0,0	100	28,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	
S	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	100	35,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	

AMP (ampicilina; 10 µg); VA (vancomicina; 30 µg); TEC (teicoplanina; 30 µg); E (eritromicina; 30 µg); CIP (ciprofloxacina; 5 µg); F (nitrofurantoina; 300 µg); RD (rifampicina; 5 µg); FOS (fosfomicina; 200 µg); C (cloranfenicol; 30 µg); QD (quinupristina-dalfopristina; 15 µg); CN (gentamicina; 120 µg); K (kanamicina; 120 µg); S (estreptomicina; 300 µg).

Tabla 19. Patrones de resistencia a los antibióticos observados en enterococos aislados de carne de caza silvestre en el noroeste de España.

Especie de <i>Enterococcus</i> / fenotipo de resistencia	Número de cepas				
	Corzo	Jabalí	Conejo	Faisán	Paloma
<i>E. faecium</i> (n = 45)					
AMP-VA-E-TE-CIP-F-FOS-QD	1				
VA-E-TE-CIP-F-RD-FOS-QD	1				
E-TE-CIP-F-RD-FOS-C-QD	1				
VA-E-TE-CIP-F-C-QD		1			
AMP-VA-E-CIP-RD-FOS-QD	1				
AMP-TEC-E-TE-CIP-F-QD	1				
AMP-E-TE-CIP-F-C-QD	2				
VA-TEC-E-TE-CIP-C-QD	1				
VA-TEC-E-CIP-F-FOS-QD	1	1			
E-TE-CIP-F-RD-FOS-QD	1				
E-TE-CIP-F-FOS-C-QD					1
AMP-TEC-E-CIP-F-QD	1				
AMP-E-TE-CIP-F-FOS		1			
AMP-E-TE-CIP-F-QD		1			
AMP-E-CIP-F-FOS-QD	1	1			
VA-TEC-E-CIP-RD-QD	1				
VA-E-TE-CIP-F-QD	1				
VA-E-CIP-F-RD-QD	2				
E-TE-CIP-F-FOS-QD	5				
E-TE-CIP-F-C-QD				1	
TE-CIP-F-FOS-QD-S		1			
AMP-VA-E-RD-QD	1				
TE-CIP-F-FOS-QD	1				
E-TE-CIP-F-FOS	1	1			
E-TE-CIP-F-C	1				
E-TE-CIP-F-QD		2			1
VA-E-CIP-RD	2				
VA-E-CIP-QD	1				
VA-E-F-FOS		1			
VA-CIP-RD-QD	1				
E-TE-CIP-QD					1
TE-CIP-F	2				
<i>E. faecalis</i> (n = 7)					
AMP-VA-TE-CIP-RD-C-QD-CN	1				
VA-E-TE-CIP-RD-C-QD-CN-K-S		1			
VA-E-TE-CIP-RD-QD-CN-K-S		2			
VA-E-TE-CIP-RD-QD-K-S		1			
VA-E-TE-CIP-RD-QD			1		
VA-E-TE-CIP-RD			1		
<i>E. durans</i> (n = 3)					
VA-E-F-RD-FOS-C-QD-CN-K	1				
VA-E-CIP-RD-QD	1				
E-FOS-QD	1				

Para interpretación ver Tabla 18.

OBJETIVO 4. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

4.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La presencia de genes de resistencia a antibióticos se estudió mediante la técnica de PCR en todos los aislamientos con resistencia o resistencia intermedia, presentándose los resultados obtenidos en la Tabla 20. Los genes *vanA* y *vanB* se detectaron en 15 y dos de los 26 enterococos resistentes a la vancomicina. Ninguna cepa contenía los genes *vanC-1*, *vanC-2/vanC-3* o *vanD*. Los 17 aislamientos que presentaron un mecanismo adquirido de resistencia (*vanA* o *vanB*) fueron identificados como *E. faecium* (10 cepas), *E. faecalis* (6 cepas) y *E. durans* (una cepa).

Las cepas resistentes a eritromicina (n=49) presentaban el gen *erm(B)* (16 cepas), *erm(C)* (5 cepas), o ambos genes en asociación (una cepa). El gen *erm(A)* no se encontró en ninguna de las cepas aisladas en este estudio. En las cepas de enterococos resistentes a la tetraciclina obtenidas de carne de caza (n=37) se puso de manifiesto la presencia de *tet(L)* (5 cepas), *tet(M)* (23 cepas) o de ambos genes simultáneamente (8 cepas). Se detectó la secuencia específica del transposón *Tn5397* en 17 (54,8%) de las 31 cepas que contenían el gen *tet(M)*.

La presencia de los genes *vat(D)* y *vat(E)*, asociada con resistencia a las estreptograminas, fue investigada por PCR en todas las cepas resistentes a la quinupristina-dalfopristina. Sin embargo, ninguno de ellos presentó estos genes. Del mismo modo, el gen *catA*, que codifica una cloranfenicol acetiltransferasa, no se encontró en ninguna de las 11 cepas resistentes al cloranfenicol.

Todas las cepas de enterococos que mostraban resistencia de alto nivel a la gentamicina (HLR-CN) y a la kanamicina (HLR-K) contenían los genes *acc(6')-aph(2")* y *aph(3')-IIIa*, respectivamente. El gen *ant(6)-la*, responsable de resistencia de alto nivel a la estreptomicina (HLR-S), no se encontró en ninguna de las 5 cepas de *Enterococcus* spp. de este estudio que presentaban resistencia de alto nivel a la estreptomicina.

Tabla 20. Distribución de los genes de resistencia a antibióticos entre los enterococos aislados de carne de caza silvestre en el noroeste de España.

Especie (número de cepas)	Fenotipo de resistencia	Genes detectados por PCR		
		Antibioticos	Nº de cepas	Genes de resistencia o elementos genéticos estudiados
<i>E. faecium</i> (n = 45)	Vancomicina	17	<i>vanA</i> <i>vanB</i> <i>vanC-1</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	8 2 0
	Eritromicina	40	<i>erm(B)</i> <i>erm(C)</i> <i>erm(B) + erm(C)</i> <i>erm(A)</i>	10 5 1 0
	Tetraciclina	30	<i>tet(L)</i> <i>tet(M)</i> <i>tet(M) + Tn5397</i> <i>tet(L) + tet(M)</i> <i>tet(L) + tet(M) + Tn5397</i> <i>tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S)</i>	5 7 13 3 1 0
	Cloranfenicol	8	<i>catA</i>	0
	Quinupristina-dalfopristina	36	<i>vat(D)</i> y/o <i>vat(E)</i>	0
	Estreptomicina	1	<i>ant(6)-la</i>	0
<i>E. faecalis</i> (n = 7)	Vancomicina	7	<i>vanA</i> <i>vanB</i> y/o <i>vanC-1</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	6 0
	Eritromicina	6	<i>erm(B)</i> <i>erm(A)</i> y/o <i>erm(C)</i>	5 0
	Tetraciclina	7	<i>tet(M)</i> <i>tet(M) + Tn5397</i> <i>tet(L) + tet(M)</i> <i>tet(L) + tet(M) + Tn5397</i> <i>tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S)</i>	1 2 3 1 0
	Cloranfenicol	2	<i>catA</i>	0
	Quinupristina-dalfopristina	6	<i>vat(D)</i> y/o <i>vat(E)</i>	0
	Gentamicina	4	<i>acc(6')-aph(2')</i>	4
	Kanamicina	4	<i>aph(3')-IIIA</i>	4
<i>E. durans</i> (n = 3)	Vancomicina	2	<i>vanA</i> <i>vanB</i> y/o <i>vanC-1</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	1 0
	Eritromicina	3	<i>erm(B)</i> <i>erm(A)</i> y/o <i>erm(C)</i>	1 0
	Cloranfenicol	1	<i>catA</i>	0
	Quinupristina-dalfopristina	3	<i>vat(D)</i> y/o <i>vat(E)</i>	0
	Gentamicina	1	<i>acc(6')-aph(2')</i>	1
	Kanamicina	1	<i>aph(3')-IIIA</i>	1

RESULTADOS

4.2. GENES DE VIRULENCIA

La Tabla 21 muestra los genes de virulencia detectados en las cepas estudiadas. El gen *geIE* se detectó en 4 cepas de enterococos (7,3%), el gen *agg* en tres (5,5%), el gen *ace* en 6 (10,9%), el gen *cpd* en 6 (10,9%), el gen *esp* en tres (5,5%), el gen *hyl* en una (1,8%), el gen *efaAfs* en una (1,8%) y el gen *efaAfm* en 5 (9,1%). El gen *frs* no se encontró en ninguna cepa. Quince (27,3%) de los 55 enterococos portaban al menos un gen de virulencia. De los 45 *E. faecium* aislados, el 20,0% (9 cepas) resultaron positivos para uno o más determinantes de virulencia, en comparación con el 71,4% de los aislamientos (5 cepas) de *E. faecalis* y el 33,3% de los aislamientos (una cepa) de *E. durans*. Entre los diversos perfiles de virulencia, *efaAfm* (4 cepas de *E. faecium*) y la asociación *geIE + ace + cpd* (una cepa de *E. faecium* y tres cepas de *E. faecalis*) fueron los más comunes.

Tabla 21. Distribución de los genes de virulencia entre los enterococos aislados de carne de caza silvestre en el noroeste de España.

Especie de enterococos / genes de virulencia	Número de cepas				
	Corzo	Jabalí	Conejo	Faisán	Paloma
<i>E. faecium</i> (n = 45)					
<i>esp</i>	1				
<i>hyl</i>		1			
<i>agg + ace</i>	1				
<i>efaAfm</i>	3		1		
<i>agg + efaAfm</i>		1			
<i>geIE + ace + cpd</i>		1			
<i>E. faecalis</i> (n = 7)					
<i>cpd + esp</i>		2			
<i>geIE + ace + cpd</i>			2		
<i>geIE + ace + cpd + efaAfs</i>	1				
<i>E. durans</i> (n = 3)					
<i>agg + ace</i>	1				

OBJETIVO 5. Conocer la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci, VRE*) en preparados de carne de ave, cerdo y vacuno del noroeste de España.

5.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VRE

Un total de 38 (23,75%) de las 160 muestras de preparados cárnicos analizados fueron positivos para VRE, observándose una mayor prevalencia ($P<0,01$) en los preparados de carne de ave (30 de 80 muestras; 37,5%) que en los de carne de cerdo (6 de 40 muestras; 15,0%) o de vacuno (2 de 40 muestras; 5,0%). Se detectaron cepas de VRE en muestras tomadas en 11 (45,8%) de los 24 establecimientos de venta al por menor estudiados. Los porcentajes de muestras positivas por tipo de preparado cárneo fueron 37,5% (salchichas rojas), 26,7% (salchichas blancas), 39,3% (hamburguesas), 4,8% (albóndigas), 12,5% (nuggets), 18,4% (carne picada), 25,0% (escalope) y 16,7% (crepes). La prevalencia en albóndigas fue inferior que la observada en salchichas rojas ($P<0,05$) o hamburguesas ($P<0,01$).

Se observó una concordancia completa entre los dos métodos de identificación empleados (ribotipia y PCR). Las especies más prevalentes fueron *E. faecium* (14 cepas), que se detectó en el 8,8% de las muestras, seguido por *E. durans* (10 cepas; 6,3% de las muestras), *E. hirae* (7 cepas; 4,4% de las muestras), *E. gallinarum* (5 cepas; 3,1% de las muestras) y *E. casseliflavus/E. flavesiens* (2 cepas; 1,3% de las muestras). Las características de cada cepa se muestran en las Figuras 25-29.

5.2. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE VRE

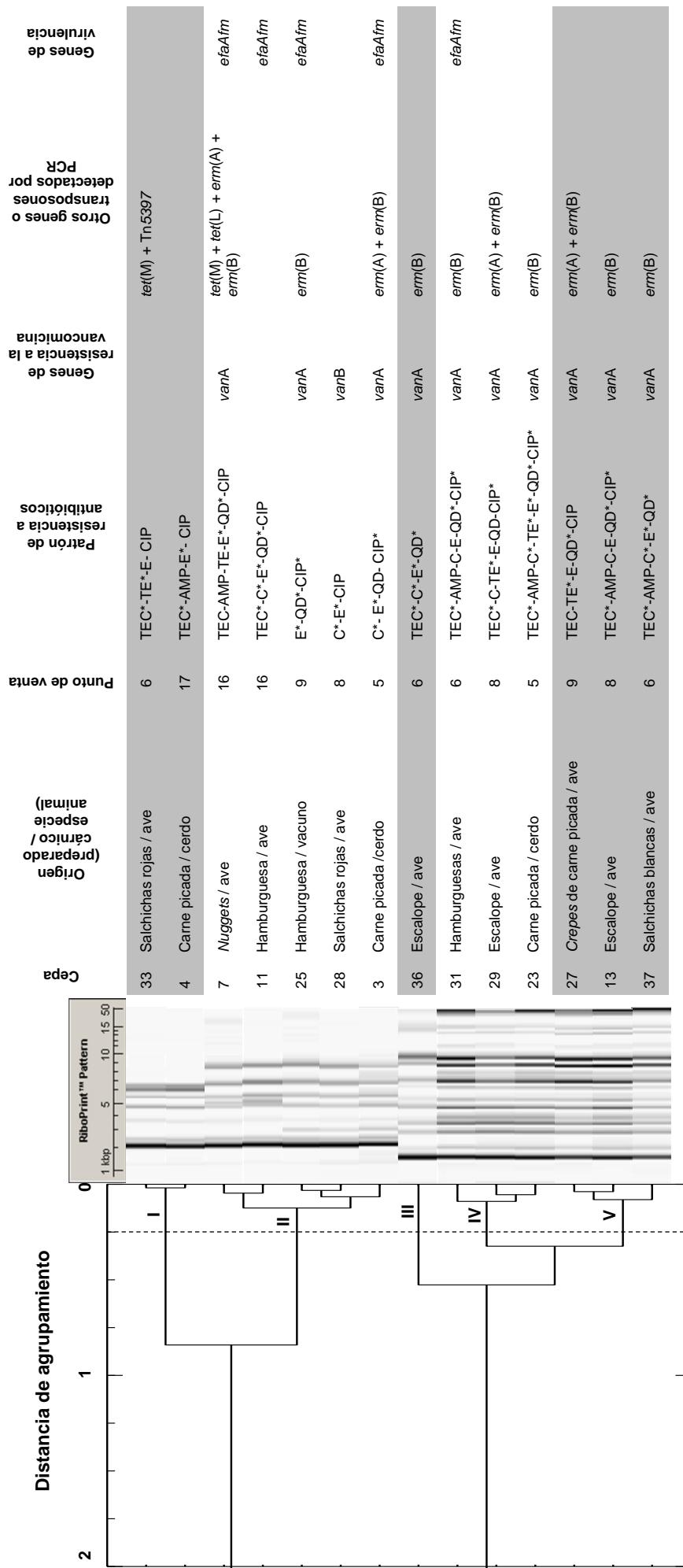
La Tabla 22 muestra la susceptibilidad de las 38 cepas de VRE a los antimicrobianos estudiados por el método de difusión por disco, en función de la especie microbiana y la especie animal de procedencia del preparado cárneo. Todas las cepas aisladas presentaron resistencia a la vancomicina con la técnica de difusión por disco. Se observó una elevada frecuencia de resistencia o susceptibilidad intermedia (entre el 81,6% y el 100% de los aislamientos) en todos los grupos de cepas a la teicoplanina, cloranfenicol, eritromicina, quinupristina-dalfopristina y ciprofloxacina. Se obtuvieron niveles de resistencia o susceptibilidad intermedia a ampicilina (34,2% de las cepas) y tetraciclina (36,8%). Los

RESULTADOS

porcentajes de cepas resistentes (excluyendo las cepas con susceptibilidad intermedia) oscilaron entre el 5,3% (tetraciclina) y el 47,4% (eritromicina). No se encontró resistencia de alto nivel (HLR) a los aminoglucósidos. Se observaron diferencias mínimas en las tasas de resistencia de las cepas en base al origen de la carne o la especie microbiana.

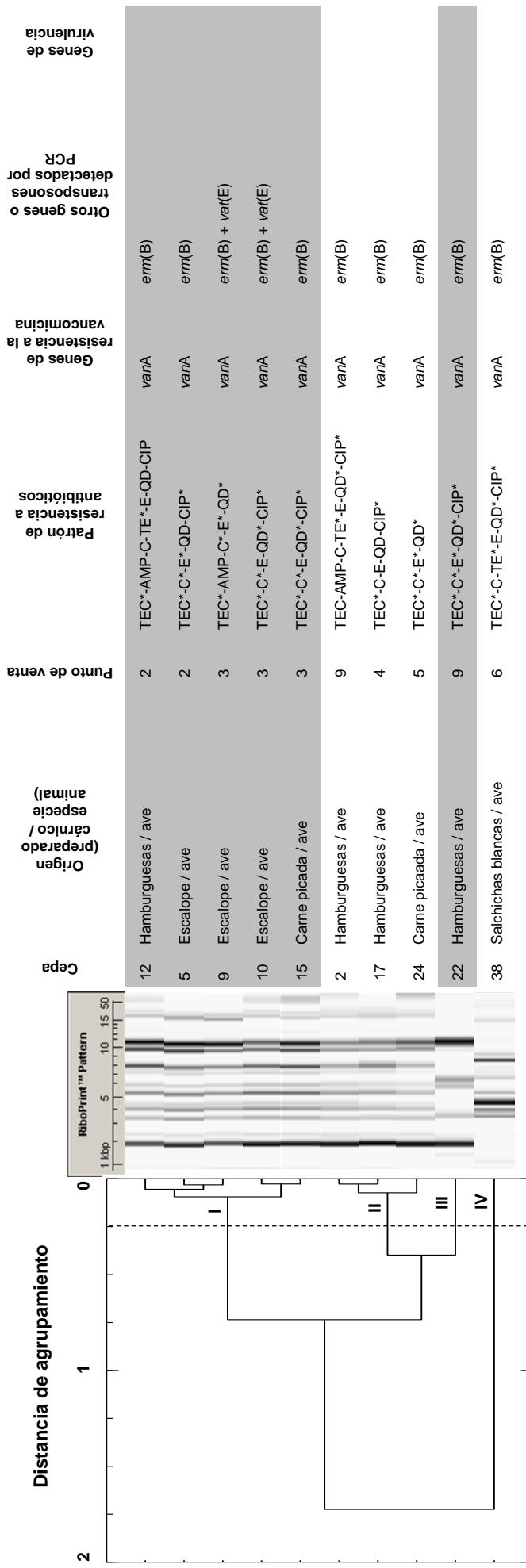
Todas las cepas presentaron resistencia o susceptibilidad intermedia a múltiples antibióticos (al menos 4, incluyendo la vancomicina), con una amplia variabilidad entre perfiles (Figuras 25-29). El número medio de resistencias o reacciones de susceptibilidad intermedia por cepa fue de 5,9 (*E. faecium*), 6,4 (*E. durans*), 6,1 (*E. hirae*), 6,0 (*E. gallinarum*) y 5,5 (*E. casseliflavus/E. flavesiensis*). Considerando exclusivamente las reacciones de resistencia, estos valores fueron 2,8, 2,8, 3,1, 2,6 y 2,5 para *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus/E. flavesiensis*, respectivamente.

La Tabla 23 muestra los fenotipos de resistencia detectados en las 38 cepas de VRE procedentes de los preparados de carne. Todas las cepas presentaron resistencia a varios antibióticos (al menos tres además de la vancomicina), observándose un notable grado de variabilidad en los perfiles de resistencia.



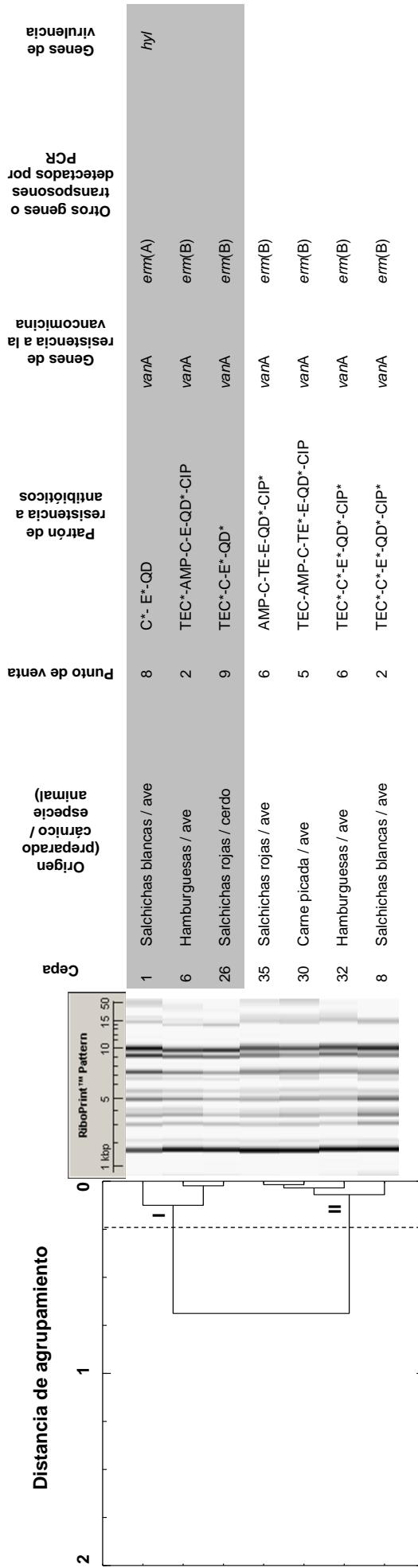
* , susceptibilidad intermedia

Figura 25. Dendrograma que muestra el análisis de *cluster* de los ribotipos de 14 cepas de *Enterococcus faecium* resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18.



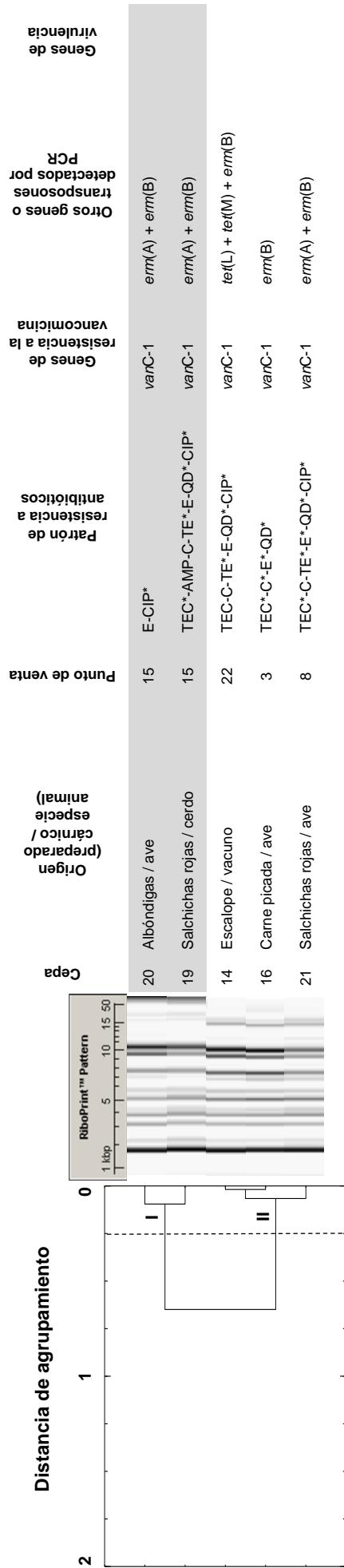
* , susceptibilidad intermedia

Figura 26. Dendrograma que muestra el análisis de cluster de los ribotipos de 10 cepas de *Enterococcus durans* resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18.



* , susceptibilidad intermedia

Figura 27. Dendrograma que muestra el análisis de *cluster* de los ribotipos de 7 cepas de *Enterococcus hirae* resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18.



* , susceptibilidad intermedia

Figura 28. Dendrograma que muestra el análisis de cluster de los ribotipos de 7 cepas de *Enterococcus gallinarum* resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Se ha utilizado el coeficiente de correlación de Pearson y el método de agrupamiento de Ward. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18.

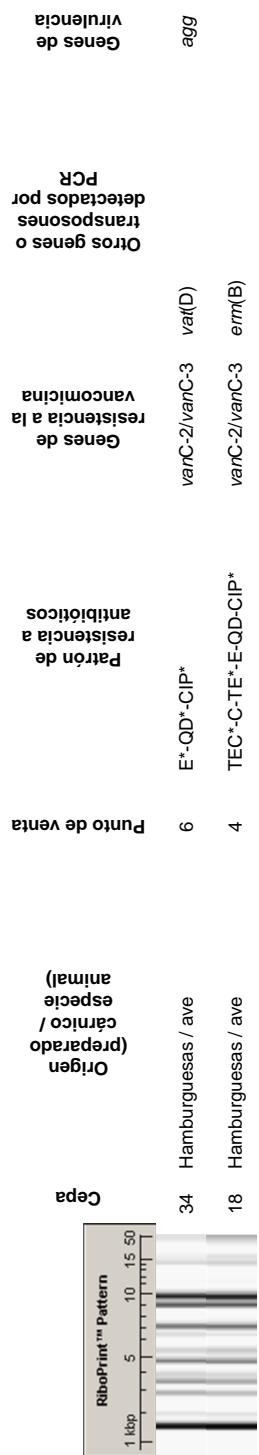


Figura 29. Ribotipos y características de dos cepas de *Enterococcus casseliflavus/Enterococcus flavesiensis* resistentes a la vancomicina aisladas de preparados cárnicos. Para interpretación de los patrones de resistencia a antibióticos, ver Tabla 18.

Tabla 22. Prevalencia de resistencia o susceptibilidad intermedia a antibióticos en 38 cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) aisladas de preparados cárnicos en el noroeste de España.

Antibiotico	Ave						Cerdo						Vacuno (n=1)	Media (n=38)	
	<i>E. faecium</i> (n=10)	<i>E. durans</i> (n=9)	<i>E. hirae</i> (n=6)	<i>E. gallinarum</i> (n=3)	<i>E. casseliflavus /</i> <i>E. flavescentis</i> (n=2)	Total (n=30)	<i>E. faecium</i> (n=3)	<i>E. durans</i> (n=1)	<i>E. hirae</i> (n=1)	<i>E. gallinarum</i> (n=1)	Total (n=6)	<i>E. faecium</i> (n=1)	<i>E. gallinarum</i> (n=1)	Total (n=2)	
TEC	90	100	66,7	66,7	50,0	83,3	66,7	100	100	83,3	0,0	100	100	50,0	81,6
AMP	40,0	33,3	50,0	0,0	0,0	33,3	66,7	0,0	0,0	100	50,0	0,0	0,0	0,0	34,2
CN	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
S	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C	70,0	100	100	66,7	50,0	83,3	66,7	100	100	83,3	0,0	100	100	50,0	81,6
TE	40,0	33,3	33,3	33,3	50,0	36,7	33,3	0,0	0,0	100	33,3	0,0	100	100	36,8
E	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
QD	80,0	100	100	66,7	100	90,0	66,7	100	100	100	83,3	100	100	100	89,5
CIP	80,0	88,9	83,3	66,7	100	83,3	100	0,0	0,0	100	66,7	100	100	100	81,6

TEC, teicoplanina (30 µg); AMP, ampicilina (10 µg); CN, gentamicina (120 µg); K, kanamicina (120 µg); S, estreptomicina (300 µg); C, clorantefenicol (30 µg); E, eritromicina (15 µg), QD, quinupristina-dalfopristina (15 µg), CIP, ciprofloxacina (5 µg).

Tabla 23. Fenotipos de resistencia a antimicrobianos de las 38 cepas de VRE aisladas de preparados cárnicos en el noroeste de España.

Especie de <i>Enterococcus</i> / fenotipo de resistencia a antibióticos	Número de cepas de cada fenotipo		
	Ave	Cerdo	Vacuno
<i>E. faecium</i>			
TEC-AMP-C-TE-E-QD-CIP	-	1	-
TEC-AMP-C-E-QD-CIP	2	-	-
TEC-AMP-TE-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-C-TE-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-AMP-C-E-QD	1	-	-
TEC-C-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-TE-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-AMP- E-CIP	-	1	-
TEC-C-E-QD	1	-	-
TEC-TE-E-CIP	1	-	-
C-E-QD-CIP	-	1	-
C-E-CIP	1	-	-
E-QD-CIP	-	-	1
<i>E. durans</i>			
TEC-AMP-C-TE-E-QD-CIP	2	-	-
TEC-C-TE-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-AMP-C- E-QD	1	-	-
TEC-C-E-QD-CIP	5	-	-
TEC-C-E-QD	-	1	-
<i>E. hirae</i>			
TEC-AMP-C-TE-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-AMP-C-E-QD-CIP	1	-	-
AMP-C-TE-E-QD-CIP	1	-	-
TEC-C-E-QD-CIP	2	-	-
TEC-C-E-QD	-	1	-
C-E-QD	1	-	-
<i>E. gallinarum</i>			
TEC-AMP-C-TE-E-QD-CIP	-	1	-
TEC-C-TE-E-QD-CIP	1	-	1
TEC-C-E-QD	1	-	-
E-CIP	1	-	-
<i>E. casseliflavus/E. flavescentis</i>			
TEC-C-TE-E-QD-CIP	1	-	-
E-QD-CIP	1	-	-

Para interpretación ver Tabla 18.

OBJETIVO 6. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en aislamientos de VRE de preparados cárnicos en el noroeste de España y conocer la capacidad de las cepas para formar *biofilm*.

6.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La presencia de genes de resistencia a antibióticos se estudió mediante PCR en todas las cepas que mostraron resistencia o sensibilidad intermedia, presentándose los resultados en la Tabla 24. Las 38 cepas (cada cepa fue tomada de una muestra diferente) se ensayaron para determinar la presencia de genes de resistencia a la vancomicina (*van*). Se detectaron cepas de VRE con mecanismos de resistencia adquiridos (VRE_{ar}) en 28 (17,5%) de los 160 preparados de carne analizados. Considerando por separado cada tipo de carne, VRE_{ar} estuvo presente en 23 (28,8%), 4 (10,0%) y una (2,5%) muestras de carne de ave, cerdo y vacuno, respectivamente. El gen *vanA* se identificó en 27 aislamientos (10 *E. faecium*, 10 *E. durans* y 7 *E. hirae*) y el gen *vanB* en una cepa de *E. faecium*.

Las cepas de *E. faecium* portadoras del gen *vanA* fueron aisladas de preparaciones de carne de ave (7 cepas), cerdo (dos) y vacuno (una) (Figura 25). Todas las cepas de las especies *E. durans* (9 aislamientos de ave y uno de cerdo) y *E. hirae* (6 aislamientos de ave y uno de cerdo) eran portadoras del gen *vanA* (Figuras 26 y 27). El gen *vanB* se detectó en un aislamiento de *E. faecium* procedente de salchichas rojas elaboradas con carne de ave.

En 7 (4,4%) de las 160 muestras analizadas se encontraron cepas de VRE con mecanismos de resistencia intrínsecos (VRE_{ir}). El gen *vanC-1* se observó en 5 aislamientos de *E. gallinarum* que procedían de carne de ave (tres cepas), cerdo (una) y vacuno (una) (Figura 28). El gen *vanC-2/vanC-3* se detectó en dos aislamientos de *E. casseliflavus/E. flavesiensis* procedentes de hamburguesas elaboradas con carne de ave (Figura 29).

Ninguna de las 31 cepas con resistencia o susceptibilidad intermedia al cloranfenicol presentó el gen *catA*. Las 14 cepas con resistencia o susceptibilidad intermedia a la tetraciclina se examinaron para detectar los genes *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* y *tet(S)*. El gen *tet(M)* se encontró en tres de las 14 cepas resistentes a la tetraciclina, en dos de las cuales

estaba asociado con el gen *tet(L)*, siendo detectada la secuencia específica del transposón Tn5397 en la tercera cepa.

Se detectaron los genes *erm(A)* o *erm(B)* (solos o en asociación) en 33 de las 38 cepas de enterococos resistentes o con susceptibilidad intermedia a la eritromicina. Veinticinco cepas albergaban sólo el gen *erm(B)*, mientras que el gen *erm(A)* y la asociación *erm(A) + erm(B)* se encontraron en una cepa y 7 cepas, respectivamente. El gen *erm(C)* no se detectó en ninguna de las cepas examinadas en este Estudio.

Los genes *vat(D)* y el *vat(E)*, asociados con la resistencia a estreptograminas, se encontraron en una y dos de las 34 cepas resistentes a la quinupristina-dalfopristina, respectivamente.

6.2. GENES DE VIRULENCIA

Se detectaron factores de virulencia en siete (18,4%) de las 38 cepas de VRE. Los genes *agg*, *hyl* y *efaAfm* se encontraron en uno, uno y 5 aislamientos, respectivamente. Ninguna de las cepas de VRE portaba los genes *gelE*, *ace*, *cpd*, *frs*, *esp* o *efaAfs* (Figuras 25-29).

6.3. PRODUCCIÓN DE BIOFILM

La densidad óptica de células adheridas en las placas de microtítulo de poliestireno (células del *biofilm*) osciló entre $0,117 \pm 0,025$ y $0,184 \pm 0,098$. Para la clasificación de las cepas se utilizó un valor de corte de tres desviaciones estándar por encima de la DO media de los controles negativos, en este caso 0,126. Las cepas fueron clasificadas como no productores de *biofilms* (aislamientos de *E. faecium* números 7, 13, 25 y 33; DO media = $0,121 \pm 0,003$) o débiles productores de *biofilm* (34 aislamientos; DO media = $0,145 \pm 0,014$). La DO media producida por las 38 cepas examinadas fue $0,143 \pm 0,016$.

RESULTADOS

Tabla 24. Distribución de los genes de resistencia a antibióticos en las 38 cepas de VRE obtenidas de preparados cárnicos en el noroeste de España.

Especie (número de cepas)	Fenotipo de resistencia		Genes detectados por PCR	
	Antibióticos	Nº de cepas	Genes de resistencia estudiados	Nº de cepas
<i>E. faecium</i> (14)	Vancomicina	14	<i>vanA</i> <i>vanB</i> <i>vanC-1</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	10 1 0
	Cloranfenicol	8	<i>catA</i>	0
	Tetraciclina	5	<i>tet(L) + tet(M)</i> <i>tet(M) + Tn5397</i> <i>tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S) y/o Tn916/Tn1545</i>	1 1 0
	Eritromicina	14	<i>erm(B)</i> <i>erm(A) + erm(B)</i> <i>erm(C)</i>	6 4 0
	Quinupristina-dalfopristina	11	<i>vat(D) y/o vat(E)</i>	0
<i>E. durans</i> (10)	Vancomicina	10	<i>vanA</i> <i>vanB</i> y/o <i>vanC-1</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	10 0
	Cloranfenicol	10	<i>catA</i>	0
	Tetraciclina	3	<i>tet(L) y/o tet(M) y/o tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S) y/o Tn5397 y/o Tn916/Tn1545</i>	0
	Eritromicina	10	<i>erm(B)</i> <i>erm(A) and/or erm(C)</i>	10 0
	Quinupristina-dalfopristina	10	<i>vat(E)</i> <i>vat(D)</i>	2 0
<i>E. hirae</i> (7)	Vancomicina	7	<i>vanA</i> <i>vanB</i> y/o <i>vanC-1</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	7 0
	Cloranfenicol	7	<i>catA</i>	0
	Tetraciclina	2	<i>tet(L) y/o tet(M) y/o tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S) y/o Tn5397 y/o Tn916/Tn1545</i>	0
	Eritromicina	7	<i>erm(B)</i> <i>erm(A)</i> <i>erm(C)</i>	6 1 0
	Quinupristina-dalfopristina	7	<i>vat(D) y/o vat(E)</i>	0
<i>E. gallinarum</i> (5)	Vancomicina	5	<i>vanC-1</i> <i>vanA</i> y/o <i>vanB</i> y/o <i>vanC-2/vanC-3</i> y/o <i>vanD</i>	5 0
	Cloranfenicol	4	<i>catA</i>	0
	Tetraciclina	3	<i>tet(L) + tet(M)</i> <i>tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S) y/o Tn5397 y/o Tn916/Tn1545</i>	1 0
	Eritromicina	5	<i>erm(B)</i> <i>erm(A) + erm(B)</i> <i>erm(C)</i>	2 3 0
	Quinupristina-dalfopristina	4	<i>vat(D) y/o vat(E)</i>	0
<i>E. casseliflavus / E. flavesiensis</i> (2)	Vancomicina	2	<i>vanC-2/vanC-3</i> <i>vanA</i> y/o <i>vanB</i> y/o <i>vanC-1</i> y/o <i>vanD</i>	2 0
	Cloranfenicol	1	<i>catA</i>	0
	Tetraciclina	1	<i>tet(L) y/o tet(M) y/o tet(K) y/o tet(O) y/o tet(S) y/o Tn5397 y/o Tn916/Tn1545</i>	0
	Eritromicina	2	<i>erm(B)</i> <i>erm(A) y/o erm(C)</i>	1 0
	Quinupristina-dalfopristina	2	<i>vat(D)</i> <i>vat(E)</i>	1 0

OBJETIVO 7. Estudiar la diversidad genética de las cepas de VRE aisladas mediante su ribotipado.

7.1. RIBOTIPIA

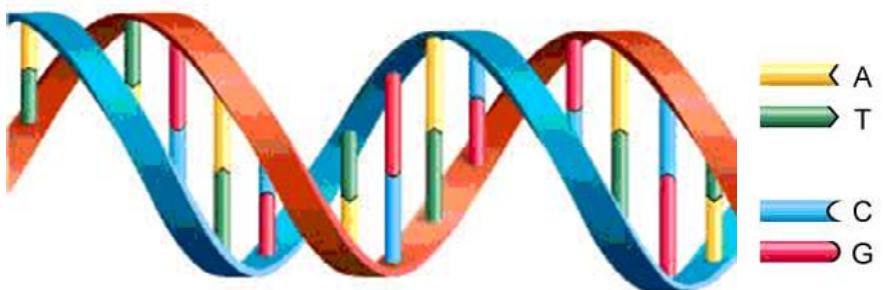
Las Figuras 25-28 muestran el análisis aplicado a los patrones de ribotipificación de *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* y *E. gallinarum*, respectivamente. El umbral utilizado para la formación de agrupaciones se estableció para una distancia de agrupamiento de 0,25.

Utilizando el equipo automatizado RiboPrinter®, con EcoRI como enzima de restricción, las 14 cepas de *E. faecium* resistentes a la vancomicina se agruparon en 5 grupos (I-V). Un perfil (III) incluía una única cepa (36), mientras que los aislamientos restantes se agruparon en 4 *cluster*. El grupo predominante (II) estaba constituido por 5 aislamientos, mientras que los otros tres *cluster* agrupaban dos o tres cepas cada uno.

Las 10 cepas de *E. durans* se agruparon en 4 *cluster*, que estaban constituidos por entre uno (*clusters* III y IV) y 5 (*cluster* I) aislamientos (Figura 26). Las 7 cepas de *E. hirae* se adscribieron a dos *cluster*, con 4 y tres aislamientos, respectivamente (Figura 27). De igual manera, los aislamientos de *E. casseliflavus/E. flavesiensis* se agruparon en dos *cluster*, con tres y dos cepas, respectivamente (Figura 28).

En general, con excepciones mínimas, las cepas se agruparon en los mismos *cluster* independientemente del tipo de preparado cárnico, especie animal de procedencia de la carne, punto de venta y patrón de resistencia a antibióticos.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

OBJETIVO 1. Determinar si la exposición de *Escherichia coli* ATCC 12806 a concentraciones subinhibitorias de fosfato trisódico, nitrito sódico o hipoclorito sódico provoca la adaptación de la cepa y si esta adaptación se asocia con protección cruzada a otros biocidas.

1.1. ADAPTACIÓN Y ADAPTACIÓN CRUZADA

En este Trabajo se presenta una de las primeras investigaciones realizadas para conocer las consecuencias de la exposición a concentraciones subinhibitorias de biocidas en las poblaciones de *E. coli*, especialmente por lo que respecta a su susceptibilidad posterior a los propios biocidas. Los compuestos ensayados en esta Investigación: fosfato trisódico (FTS; Na_3PO_4), nitrito sódico (NS; NaNO_2) e hipoclorito sódico (HIP; NaClO) son compuestos ampliamente utilizados en la Industria Alimentaria, como ha sido señalado en las páginas precedentes (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

La elevada correlación ($r=0,9177$) observada entre la densidad óptica y los recuentos microbianos realizados por siembra en placa es indicativa de una elevada concordancia entre ambos parámetros. No obstante, el método turbidimétrico presenta una relación lineal con la técnica de recuento en placa únicamente en el rango de 7,3 a 8,3 \log_{10} ufc/mL. Por ese motivo, en la ecuación de calibración se incluyeron únicamente los recuentos cuyos valores oscilaban entre 7,3 y 8,3 \log_{10} ufc/mL, con un límite máximo de 30 h de incubación. Estos resultados son coincidentes con los de otros estudios, que ponen de manifiesto que la turbidimetría es capaz de detectar concentraciones bacterianas a partir de aproximadamente 10^7 células/mL (Dalgaard *et al.*, 1994; Díez-García *et al.*, 2012; Lianou y Koutsoumanis, 2011; Rattanasomboon *et al.*, 1999). Por otro lado, a partir de 30 horas de incubación, los datos de densidad óptica no guardaron una relación lineal con los recuentos microbianos, por lo que fueron desechados. Esta falta de correlación a partir de la hora 30 se produce porque al final de la fase de crecimiento exponencial comienza a producirse la muerte celular, lo que implica un descenso en los recuentos microbianos en placa. Sin embargo, las

medidas de turbidez no se ven afectadas como consecuencia de la muerte celular, ya que la densidad óptica está determinada por la suma de las células viables y no viables.

Los resultados del presente estudio ponen de manifiesto la capacidad de *E. coli* para crecer en caldo de cultivo en presencia de concentraciones crecientes subinhibitorias de biocidas. Estos resultados concuerdan con investigaciones de otros autores, en las que se pone de manifiesto la capacidad de *E. coli* para adaptarse a diferentes tipos de estrés subletal, tanto de tipo químico como físico (Braudaki y Hilton, 2004; Chung *et al.*, 2006).

El hecho de que *E. coli* adquiera tolerancia a NS y a HIP, tal y como se ha demostrado en el presente Estudio, es un motivo de preocupación en el ámbito de la Seguridad Alimentaria, considerando que se trata de compuestos ampliamente utilizados, que a menudo son objeto de un empleo inapropiado, a concentraciones inferiores a las deseables.

Las concentraciones subinhibitorias de biocidas podrían ocurrir como consecuencia de diferentes circunstancias (Capita y Alonso-Calleja, 2013). En el caso de los desinfectantes, por ejemplo hipoclorito sódico, las probabilidades de que se alcancen concentraciones subinhibitorias están principalmente relacionadas con dos situaciones particulares (Cerf *et al.*, 2010; SCENIHR, 2009). La primera es la aplicación de uno o más desinfectantes a concentraciones inferiores a las recomendadas como consecuencia de su uso inadecuado (concentración errónea o distribución incorrecta) o cuando han perdido actividad debido a un almacenamiento indebido. Así, cuando los desinfectantes se usan a “escala industrial” (por ejemplo cuando el conjunto de las instalaciones de una industria alimentaria es sometido a un proceso de limpieza y desinfección), algunas superficies no reciben los niveles óptimos del compuesto activo, aumentando las probabilidades de que se produzca una selección de bacterias con resistencia incrementada. Algo parecido ocurre cuando los desinfectantes se aplican en los pediluvios o rodaluvios dispuestos en la periferia de las instalaciones agroalimentarias y explotaciones ganaderas, donde las concentraciones de desinfectantes pueden verse reducidas como consecuencia, por ejemplo, del agua de lluvia. Además, es frecuente que estos dispositivos contengan material biológico o de otro tipo, capaz de inactivar los componentes activos de los desinfectantes, incrementando así el riesgo de selección de bacterias resistentes. La segunda situación asociada a la presencia de concentraciones subinhibitorias de biocidas se debe a que algunos de estos compuestos son degradados lentamente, presentando una elevada persistencia medioambiental, donde

pueden alcanzar concentraciones residuales inferiores a la concentración mínima inhibitoria (*minimum inhibitory concentration*, MIC), hecho que permite el mantenimiento de una presión selectiva que incrementa las probabilidades de supervivencia de las bacterias con susceptibilidad reducida.

En el caso de los descontaminantes, por ejemplo fosfato trisódico, estas concentraciones insuficientes (subinhibitorias) podrían ocurrir como consecuencia de una inadecuada dosificación o distribución del compuesto en el tanque de inmersión o en el depósito de mezclado, o por la presencia de cantidades excesivas de materia orgánica, con capacidad para inactivar algunos compuestos biocidas (Alonso-Hernando *et al.*, 2009). Además, y con el objetivo principal de preservar las características sensoriales y nutricionales de los alimentos, es cada vez más habitual en la Industria Alimentaria el empleo simultáneo o sucesivo de varios compuestos inhibidores y/o condiciones inhibitorias (p. ej. nitrito sódico, ácidos orgánicos o reducción de la Aw) a dosis bajas. Este empleo de diferentes mecanismos de control (intervenciones múltiples) es a menudo denominado “tecnología de barreras”, “teoría de vallas de Leistner” o “barreras múltiples” (Chung *et al.*, 2006; Leistner, 2000).

Parece razonable suponer que las industrias alimentarias son el escenario perfecto para muchas de las situaciones señaladas, pudiendo las bacterias ser expuestas con frecuencia a dosis subinhibitorias de biocidas, lo cual podría crear un ambiente selectivo capaz de posibilitar la tolerancia adaptativa a los agentes habitualmente utilizados, hecho que finalmente podría conducir a una situación indeseable de persistencia de cepas endémicas o residentes con resistencia a dichos compuestos. En este contexto, y dada la escasez de datos al respecto, diferentes organismos internacionales (EFSA, 2008a, b; European Commission, 2006; SCENIHR, 2009; SCHER-SCENIHR, 2008) han aconsejado la realización de nuevos estudios en relación con los riesgos potenciales para la Salud Pública derivados del empleo de biocidas a dosis subinhibitorias.

Por lo que respecta a la estabilidad de la adaptación, la tolerancia adquirida de *E. coli* al FTS se perdió a lo largo siete pasos de la cepa adaptada en caldo de cultivo sin biocidas. En el caso de las células adaptadas a NS o HIP, la reducción de la sensibilidad adquirida tras la adaptación persistió a lo largo de los siete pasos en ausencia de biocidas. Ello permitiría concluir que la adaptación adquirida al NS y al HIP fue estable.

En base a la revisión bibliográfica realizada puede afirmarse que la estabilidad de la tolerancia de *E. coli* al FTS, NS e HIP ha sido determinada por primera vez en el presente Estudio. Sin embargo, nuestros resultados son coincidentes con las observaciones realizadas con otros grupos microbianos y/o compuestos químicos (Jones *et al.*, 1989; To *et al.*, 2002). Loughlin *et al.* (2002) demostraron que la resistencia adquirida (tras 30 días de exposición) al cloruro de benzalconio por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se mantuvo en ausencia del desinfectante. Resultados similares han sido publicados por Braudaki y Hilton (2004), que estudiaron la adaptación de *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* a varios desinfectantes (cloruro de benzalconio, clorhexidina y triclosan).

La estabilidad de la adaptación tras siete subcultivos en TSB sin biocidas añadidos observada en el presente Trabajo podría estar en relación con una posible mutación cromosómica (Malek y Badran, 2010). En este sentido, Lambert (1992) indica que esta resistencia adquirida a los compuestos antimicrobianos es debida a la emergencia de una célula resistente, como consecuencia de una mutación genética esporádica, en una población de células sensibles. Estas modificaciones en ocasiones revierten espontáneamente en ausencia del biocida. Las principales consecuencias de las mutaciones genéticas señaladas están en relación con modificaciones de la cepa, principalmente por lo que se refiere a la estructura y composición de la membrana externa, con el fin de prevenir la fijación o penetración del compuesto antimicrobiano (Russell, 1991). Sin embargo, la adaptación y resistencia adquirida a un agente antimicrobiano puede ser también de tipo fenotípico, y producirse como consecuencia de determinadas regulaciones metabólicas inducidas por la presencia del biocida (Jones *et al.*, 1989). Los experimentos recogidos en la presente Investigación son insuficientes para discriminar entre ambas hipótesis.

La exposición a los biocidas ensayados causó la disminución del crecimiento (incremento de la fase de latencia y disminución del ritmo de crecimiento) de los cultivos patrón (no adaptados) de *E. coli*, de forma marcada en el caso del NS, confirmando que estos compuestos son efectivos agentes antimicrobianos frente a la cepa estudiada. Estos resultados no coinciden con publicaciones previas, en las que se indica que el nitrito sódico no es un compuesto efectivo para controlar el crecimiento de los microorganismos patógenos Gram-negativos de origen intestinal, como es el caso de *Escherichia coli* o *Salmonella* (Tompkin, 2005).

La adaptación de *E. coli* a los biocidas ensayados se acompañó de una reducción en el ritmo de crecimiento cuando las células se incubaron en ausencia de los compuestos. Este fenómeno, que ha sido descrito habitualmente en los procesos de adaptación microbiana (Gilbert y MacBain, 2003), sugiere que los mecanismos por los que la bacteria adquiere tolerancia a los biocidas se ejecutan a costa de ciertas alteraciones en el metabolismo microbiano, hecho que provoca una disminución en la velocidad de crecimiento de las células respecto a la que tenían antes de la adaptación (Loughlin *et al.*, 2002).

La adaptación previa de *E. coli* al NS o al HIP estimuló el crecimiento bacteriano, en relación con las células no adaptadas o adaptadas al FTS, en presencia de NS o HIP. Este hallazgo sugiere que la adaptación previa a NS o HIP incrementa la tolerancia de *E. coli* a estos compuestos. En este sentido, es importante señalar aquí que las cepas de *E. coli* con una susceptibilidad reducida a los biocidas pueden sobrevivir a las agresiones por estos compuestos (por ejemplo programas de L+D no óptimos) en las industrias de alimentos durante largos períodos de tiempo, incrementando así las probabilidades de contaminación de los alimentos.

Los hallazgos del presente estudio, derivados de los parámetros de crecimiento bacteriano obtenidos tras el ajuste de los datos a un modelo matemático primario, indican que la adaptación de *E. coli* al NS incrementa la tolerancia de la cepa al HIP, y viceversa, a pesar de que estos compuestos tienen diferentes mecanismos de acción, como se ha detallado en el apartado de Introducción de esta Memoria. Otros autores han observado también que las células adaptadas a un determinado compuesto presentan susceptibilidad reducida frente a otros diferentes, como es el caso de los compuestos de amonio cuaternario, el fosfato trisódico, los compuestos clorados o el fenol (Langsrud y Sundheim, 1997; To *et al.*, 2002;). Se ha sugerido como posible vínculo entre la tolerancia a diferentes biocidas la existencia de mecanismos de resistencia comunes a diferentes compuestos (Suller y Russell, 2000). Sin embargo, esta hipótesis está lejos de ser probada de manera concluyente. Parece más probable que esta adaptación cruzada entre compuestos se deba a mecanismos de resistencia inespecíficos (p. ej. bombas de expulsión activas o reducción en la permeabilidad celular, que expulsan o impiden la entrada en las células de moléculas químicamente no relacionadas) (Braoudaki y Hilton, 2004; Capita y Alonso-Calleja, 2013).

OBJETIVO 2. Conocer el papel de las bombas de expulsión y de los cambios de la hidrofobicidad de la superficie celular en la adaptación de *E. coli* ATCC 12806 al fosfato trisódico, nitrato sódico e hipoclorito sódico.

2.1. MODIFICACIONES DE LA ACTIVIDAD DE LAS BOMBAS DE EXPULSIÓN Y DE LA HIDROFOBICIDAD DE LA SUPERFICIE CELULAR DESPUÉS DE LA ADAPTACIÓN

Para ilustrar el papel potencial de las bombas de expulsión en la adaptación de *E. coli* a tres biocidas ampliamente usados en la Industria Alimentaria (FTS, NS e HIP), se examinó la cinética de crecimiento en caldo de cultivo con y sin biocidas de las células patrón y adaptadas en presencia de carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP), un compuesto bien conocido por ser un potente inhibidor de las bombas de expulsión. Estudios anteriores ya habían indicado que las bombas de expulsión estaban involucradas en la tolerancia de *E. coli* a ciertos antimicrobianos. Los compuestos ensayados en el presente trabajo no habían sido, hasta el momento, estudiados con esta finalidad.

El estudio del crecimiento bacteriano en presencia de CCCP bajo condiciones específicas ha demostrado ser un procedimiento útil para examinar la adaptación bacteriana a las agresiones ambientales. Como se ha indicado, las bombas de expulsión bacterianas utilizan la fuerza protón-motriz como fuente de energía. El CCCP inhibe la fuerza protón-motriz, impidiendo el funcionamiento de las bombas de expulsión, lo que permite el empleo de este compuesto para el estudio de la actividad de estas proteínas transportadoras.

En el presente estudio, el CCCP no modificó el crecimiento microbiano en TSB sin biocidas. Este hallazgo demuestra que a la concentración usada (50 µM) el CCCP no ejerce un efecto inhibitorio frente a *E. coli* ATTC 12806. Algunos autores han indicado que la concentración de este compuesto debería ser optimizada en los estudios de detección de las bombas de expulsión en *E. coli*, puesto que concentraciones elevadas de CCCP pueden colapsar el gradiente de protones, ejerciendo un efecto deletéreo sobre las células bacterianas (Cho *et al.*, 2001). El efecto perjudicial del colapso del gradiente de protones se debe principalmente al descenso en el ritmo de la síntesis de ATP ligada a la fuerza protón-

motriz, a la incapacidad para regular los valores de pH citoplasmáticos y a la inhibición del transporte de nutrientes (Gage y Neidhardt, 1993).

Las células no adaptadas, así como las que crecieron en ausencia de biocidas, presentaron diferencias mínimas en su cinética de crecimiento cuando el inhibidor de las bombas de expulsión estaba presente o ausente en los caldos de cultivo. Sin embargo, el CCCP ejerció un efecto marcado en los parámetros de crecimiento de las células de *E. coli* adaptadas y expuestas a concentraciones subletales de los biocidas. Estos resultados sugieren que las bombas de expulsión podrían jugar un papel importante en la adaptación de *E. coli* a los biocidas ensayados. Sin embargo, los posibles genes implicados deben ser estudiados con el fin de confirmar estos hallazgos. De manera similar, estudios previos han puesto de manifiesto que el incremento de la tolerancia a los biocidas tras la adaptación está en relación con la inducción de mecanismos activos de expulsión (To *et al.*, 2002). Este sistema de expulsión activo no es específico de sustratos concretos y puede ser iniciado por diferentes compuestos, lo que sugiere que diferentes biocidas podrían servir como sustrato para el mismo sistema de expulsión. En este sentido, D'Arezzo *et al.* (2012) han señalado que los biocidas pueden inducir la expresión de sistemas de expulsión de múltiples compuestos, que son relativamente inespecíficos en el reconocimiento de sustratos y que permiten a las bacterias expulsar numerosas sustancias químicas no relacionadas, como antibióticos y biocidas.

Como respuesta adaptativa a las agresiones externas, las células bacterianas pueden sufrir modificaciones, por ejemplo cambios en la estructura química de sus cubiertas, lo que les permite repeler los compuestos solubles en agua, por ejemplo, FTS, NS o HIP. Estos cambios se traducen en variaciones de la hidrofobicidad de la superficie celular. Dichas modificaciones han sido observadas en diferentes especies bacterianas y compuestos químicos, si bien, hasta donde llega nuestro conocimiento, podemos afirmar que no se han realizado estudios previos en relación con *E. coli* y los tres biocidas de uso alimentario ensayados en la presente Investigación (FTS, NS e HIP). Con el objeto de determinar si los cambios en la superficie celular son un mecanismo de adaptación de *E. coli* a los tres biocidas ensayados, se llevó a cabo la prueba de adhesión microbiana a solventes (*Microbial Adhesion to Solvents*; MATS) antes y después de la adaptación y la exposición a concentraciones subinhibitorias de los biocidas.

En la presente investigación, las células de los cultivos expuestos a condiciones alcalinas (MIC/2 de FTS; pH=8,78), tanto adaptados como no adaptados, presentaron menores valores en el ensayo de adhesión microbiana a solventes que las células control (pH=7,35) o expuestas a NS (MIC/2; pH=7,28) o a HIP (MIC/2; pH=7,37). Hallazgos similares han sido observados en el caso de *Listeria monocytogenes* por Giotis *et al.* (2009), quienes han sugerido que la exposición a condiciones alcalinas reduce los valores obtenidos en la prueba de adhesión microbiana a solventes (ensayo MATS), ya que elevados valores de pH se asocian con la solubilización de las proteínas hidrofóbicas de la membrana bacteriana. Además, los compuestos alcalinos pueden atacar la estructura de la superficie celular por saponificación de los lípidos o modificación de las proporciones de ácidos grasos de la membrana que pueden provocar un descenso en la hidrofobicidad de la superficie celular.

En este Trabajo se muestra que el contacto (adaptación y/o la exposición) con NS o HIP originó un aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular de *E. coli* respecto a los cultivos patrón. Una posible explicación podría estar en relación con la reducción de zonas con carga negativa (hidrófilas) que sirven como puntos de unión a los biocidas (Loughlin *et al.*, 2002). Esta hipótesis serviría también para explicar el incremento en la tolerancia al NS y al HIP observado en las células adaptadas, con respecto a las no adaptadas. Es decir, parece que a medida que las células de *E. coli* se adaptan a los biocidas, los lugares de unión a estos compuestos se van “perdiendo” o enmascarando. Como se ha indicado, estos lugares de unión poseen mayoritariamente cargas negativas, que reducen la hidrofobicidad celular, por lo que su ausencia supone un incremento en la hidrofobicidad de la superficie celular y, por lo tanto, una mayor afinidad a los solventes no polares, xileno en el presente Estudio. Así, los resultados obtenidos sugieren que las modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie de las células de *E. coli* están en relación con la respuesta adaptativa de este microorganismo al NS o al HIP. Deben realizarse estudios adicionales con el fin de determinar si la adaptación bacteriana es una consecuencia de los cambios de la superficie celular o éstos son fenómenos no relacionados. Por otro lado, la presente investigación puso de manifiesto que el contacto (adaptación y/o exposición) con FTS provocaba reducciones significativas en los porcentajes de afinidad al xileno de los cultivos de *E. coli*.

Este Estudio ofrece, por primera vez, evidencias biológicas que confirman que la exposición previa a concentraciones subletales de NS o HIP contribuye al incremento de la tolerancia de *E. coli* a los biocidas. Los resultados sugieren que esta adaptación podría ser debida, al menos parcialmente, a las bombas de expulsión y a los cambios en la hidrofobicidad de la superficie celular. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar estos hallazgos. Estos mecanismos de adaptación deben ser investigados con el fin de desarrollar estrategias que permitan prevenir o reducir este incremento de la tolerancia bacteriana a los biocidas.

Como conclusión, el uso inadecuado de biocidas en la Industria Alimentaria puede conllevar la exposición de las bacterias a dosis subletales, hecho que representa un riesgo real para el desarrollo de adaptación y adaptación cruzada a una serie de agentes antimicrobianos. Los riesgos asociados con la exposición prolongada a bajas concentraciones de un único desinfectante deben ser un aspecto a tener en cuenta en el diseño de los programas de limpieza y desinfección (L+D) en la Industria Alimentaria. Además, se debe tener precaución cuando se usan concentraciones subletales de conservantes en los alimentos, circunstancia habitual en el contexto de la “teoría de vallas”, que sostiene que muchos factores inhibidores pueden ser altamente eficientes en niveles subletales cuando se utilizan en combinación.

Teniendo en cuenta el actual debate y la controversia generada en relación con los riesgos bióticos asociados a la aplicación de biocidas, los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Investigación arrojan conclusiones de gran interés. Hay que señalar, no obstante, que los datos obtenidos derivan de experimentos de laboratorio realizados con una única cepa, por lo que sería conveniente realizar nuevos trabajos, en las condiciones de aplicación habitual de los compuestos y ampliando el número de cepas, para sustentar estos hallazgos. El estudio de la base genética de la tolerancia adquirida al nitrito sódico y al hipoclorito sódico debería ser también abordado.

OBJETIVO 3. Conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

3.1. ESPECIES DE *Enterococcus*

La presencia de enterococos en todas las muestras de carne de caza estudiadas fue un resultado esperado, teniendo en cuenta que la contaminación de los canales con heces es frecuente en la caza. Esto se debe a que después de ser cazados, los animales son eviscerados y desollados generalmente en el campo, en condiciones probablemente no muy higiénicas (Gill, 2007).

En el presente estudio, *E. faecium* y *E. faecalis* fueron las especies predominantes en las muestras de carne de caza. Estos datos coinciden con los encontrados en las publicaciones de otros autores, que consideran que estas dos especies de enterococos son las más prevalentes en las cepas obtenidas de animales silvestres (Radimersky *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2013), animales domésticos (Butaye *et al.*, 2001; De Leener *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2013; Poeta *et al.*, 2007) y muestras de alimentos (Aslam *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2008.; Klibi *et al.*, 2013; Pesavento *et al.*, 2014). Cabe señalar que estas dos especies de enterococos son los miembros de este género de mayor relevancia en el ámbito clínico (Gomes *et al.*, 2008). Al igual que en el presente Estudio, en la mayoría de las publicaciones antes mencionadas se pone también de manifiesto una baja prevalencia de *E. durans*.

3.2. PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS Y FENOTIPOS DE RESISTENCIA

Es un hecho ampliamente reconocido que *Enterococcus* spp. es un reservorio potencial de genes de resistencia a antibióticos que pueden ser transferidos horizontalmente a otras bacterias, incluyendo especies más patógenas (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Mientras que los enterococos de entornos clínicos y de muestras de alimentos de origen animal han sido estudiados ampliamente, se sabe poco sobre la resistencia a los antibióticos de las cepas de enterococos de ambientes silvestres. Hasta donde llega nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en demostrar la presencia de resistencias múltiples en enterococos recuperados de la carne de caza en el noroeste de España.

Se encontró una considerable prevalencia de resistencia a la eritromicina, tetraciclina, ciprofloxacina y quinupristina-dalfopristina. Elevados porcentajes de resistencia a la mayoría de estos antibióticos han sido también observados por otros autores en animales salvajes (Guenther *et al.*, 2010; Poeta *et al.*, 2007; Radhouani *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2010, 2011a) y en poblaciones humanas y ganaderas en Europa (Guenther *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2013). Por el contrario, la resistencia a la nitrofurantoína, que fue observada en el 67,3% de los aislamientos, ha sido un resultado inesperado dada la prohibición del uso de este medicamento en animales productores de alimentos que se impuso en la Unión Europea hace veinte años, como consecuencia de los riesgos toxicológicos para los consumidores. Cabe señalar que los mecanismos de resistencia cruzada o co-resistencia (Capita y Alonso-Calleja, 2013) pueden ser la causa de la resistencia a este compuesto observada tanto en el presente trabajo como en investigaciones previas (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012). Se puede llegar a conclusiones similares para la prevalencia de la resistencia al cloranfenicol (20% de las cepas en este estudio), que también fue prohibido a mediados de la década de 1990.

La sorprendentemente alta prevalencia de resistencia a antibióticos en la carne de caza observada en el presente estudio plantea, inevitablemente, la cuestión de dónde se originaron estas resistencias. Se han detectado bacterias resistentes a los antimicrobianos en diferentes animales salvajes de lugares muy alejados de la influencia humana, lo que apoya la hipótesis de que existen presiones antibióticas en ambientes naturales (Da Costa *et al.*, 2013). Sin embargo, la mayoría de los estudios sugieren una fuerte correlación entre la actividad humana y la propagación de la resistencia a los antibióticos en la vida silvestre (Bonnedahl y Järhult, 2014; Marinho *et al.*, 2013; Poirel *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2014). Se ha sugerido que la prevalencia de la resistencia a los antimicrobianos en los animales silvestres se relaciona con la presencia de granjas (Allen *et al.*, 2011) o interacciones con residuos agrícolas (Cole *et al.*, 2005), con la densidad de ganado (Guenther *et al.*, 2010), la proximidad humana (Wheeler *et al.*, 2012) o la densidad de población humana (Skurnik *et al.*, 2006). La carne utilizada en el presente estudio se obtuvo de animales silvestres que habitaban en zonas muy próximas a explotaciones ganaderas y centros urbanos, existiendo, por lo tanto, una alta probabilidad de contacto con animales productores de alimentos y seres humanos.

E. faecalis fue la especie que mostró el mayor valor medio de resistencias a antibióticos (7,9), como había sido demostrado previamente por otros autores en muestras de alimentos (Gomes *et al.*, 2008; Pesavento *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2008). En este sentido, se ha sugerido que *E. faecalis* tiene una marcada capacidad para adquirir y transferir genes de resistencia a antibióticos (McBride *et al.*, 2007).

OBJETIVO 4. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de carne de caza en el noroeste de España.

4.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Diecisiete aislamientos (30,9% de las cepas) presentaban mecanismos de resistencia a la vancomicina adquiridos, genes *vanA* o *vanB*, que habitualmente se encuentran ubicados en elementos genéticos móviles. Este es un hallazgo preocupante que pone de relieve el hecho de que la carne de animales silvestres puede estar contaminada con bacterias resistentes a la vancomicina, a la vez que indica la posibilidad de transferencia de genes de resistencia a la vancomicina entre diferentes grupos bacterianos presentes en el entorno alimentario (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Otros estudios también han puesto de manifiesto la presencia de genes *vanA* o *vanB* en los animales salvajes (Gonçalves *et al.*, 2010; Radhouani *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2012). La detección, en carne de caza, de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*, VRE) con el gen *vanA* es un hallazgo de especial relevancia en el escenario de la Salud Pública, ya que este gen confiere un alto nivel de resistencia a vancomicina y teicoplanina, y potencialmente podría transferirse a otras bacterias patógenas para el hombre, como por ejemplo *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) (López *et al.*, 2009).

El gen *erm(B)* fue el más prevalente en las cepas resistentes a la eritromicina, encontrándose en 17 de las 49 cepas con resistencia a este antibiótico. El predominio de gen *erm(B)* es un resultado acorde con los hallazgos de otros autores en relación con los enterococos aislados de animales salvajes (Santos *et al.*, 2013). Nuestros resultados sugieren que otros mecanismos de resistencia diferentes pueden estar presentes en las

cepas con resistencia a la eritromicina en las que no se encontraron genes de resistencia a los macrólidos.

Treinta y seis (97,3%) de las 37 cepas resistentes a la tetraciclina presentaban los genes *tet(M)* o *tet(L)*, o ambos. Estos resultados son similares a los obtenidos en enterococos aislados de conejos silvestres (Silva *et al.*, 2010) y aves silvestres (Santos *et al.*, 2013). En el presente estudio, el gen *erm(B)* y los genes de resistencia a tetraciclina *tet(M)*, *tet(L)* o ambos, se detectaron con frecuencia en la misma cepa. Este es un resultado esperable puesto que los genes de resistencia a tetraciclina se encuentran con frecuencia en los mismos elementos genéticos móviles que los genes de resistencia a los macrólidos (Soltani *et al.*, 2000). Además, el 54,8% de los enterococos que fueron positivos para *tet(M)* eran portadores de genes específicos del transposón Tn5397, si bien no se realizaron investigaciones adicionales para demostrar la asociación del gen *tet(M)* con este transposón. Resultados similares, en cuanto a la coincidencia entre los citados genes de resistencia a la eritromicina y a la tetraciclina, han sido publicados por otros autores (Agerso *et al.*, 2006; Gonçalves *et al.*, 2010; Poeta *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2012).

Las acetiltransferasas Vat(D) y Vat(E) confieren resistencia a quinupristina-dalfopristina y se distribuyen ampliamente en los enterococos a partir de diferentes fuentes (Soltani *et al.*, 2000). De los 45 aislamientos de enterococos que mostraron resistencia a quinupristina-dalfopristina, ninguno albergaba los genes *vat(D)* o *vat(E)*. Resultados similares se han observado en enterococos procedentes de aves silvestres (Santos *et al.*, 2013) y de caballos (Moura *et al.*, 2013).

El gen *acc(6')-aph(2")* se detectó en todas las cepas con resistencia de alto nivel a la gentamicina (HLR-CN) y el gen *aph(3')-IIIa* en todos aquellos con resistencia de alto nivel a la kanamicina (HLR-K). Estos genes han sido encontrados previamente en enterococos aislados de los alimentos de origen animal (Choi y Woo, 2013; Novais *et al.*, 2005).

La resistencia fenotípica que se observó a varios antimicrobianos (tales como cloranfenicol, quinupristina-dalfopristina o estreptomicina) en el presente Estudio no puede explicarse por la presencia de los genes más comúnmente asociados con estas resistencias. Este hecho puede indicar la existencia de otros mecanismos de resistencia en las cepas en las que no se encontró ninguno de los genes de resistencia a antibióticos que

fueron ensayados (Soltani *et al.*, 2000). Se deben realizar nuevos estudios con el fin de esclarecer estos tipos de resistencia y los mecanismos asociados con ellos.

4.2. GENES DE VIRULENCIA

En los enterococos, hay varios factores de virulencia que están posiblemente asociados con su capacidad de colonización y con la patogénesis de la enfermedad humana (Jett *et al.*, 1992). Existen muy pocas publicaciones centradas en el estudio de factores de virulencia en los enterococos de animales silvestres (Poeta *et al.*, 2005; Radhouani *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2011a, b), siendo el presente trabajo el primero de este tipo en España.

Los factores de virulencia hallados en el estudio que se presenta aquí (*geIE*, *agg*, *ace*, *cpd*, *esp*, *hyl*, *efaAfs* y *efaAfm*) se han observado con frecuencia en enterococos (Aslam *et al.*, 2012; Gomes *et al.*, 2008; Jahangiri *et al.*, 2010; Valenzuela *et al.*, 2008). Cabe señalar, sin embargo, que, en general, los enterococos aislados de ambientes clínicos producen una mayor cantidad de factores de virulencia que las cepas recuperadas del ganado o de los animales silvestres (Silva *et al.*, 2011a).

Existe una especial preocupación por el factor *geIE* debido a su asociación con las infecciones. Se ha observado que la gelatinasa, codificada por el gen *geIE*, es una endopeptidasa extracelular dependiente de zinc que hidroliza el colágeno, la gelatina, la hemoglobina y otros compuestos bioactivos, y se ha demostrado que exacerba la endocarditis en modelos animales (Klibi *et al.*, 2013; Valenzuela *et al.*, 2008).

Las proteínas antigénicas de endocarditis de *E. faecalis* (gen *efaAfs*) y *E. faecium* (gen *efaAfm*) y la proteína Esp (gen *esp*) están implicadas en la adhesión de los enterococos a superficies orgánicas e inertes (Silva *et al.*, 2011a; Valenzuela *et al.*, 2008). La proteína de agregación producida por los enterococos (codificada por *agg*) también está implicada en la adhesión a las células eucariotas, además de participar en la agregación celular.

La hialuronidasa, que se expresa por el gen *hyl*, actúa sobre el ácido hialurónico e incrementa la invasión bacteriana. El gen *ace*, que codifica una proteína con características similares a la proteína de unión al colágeno de *Staphylococcus aureus*, contribuye a la adhesión bacteriana y aparentemente se expresa durante la infección en seres humanos. Por último, las feromonas sexuales, como las expresadas por el gen *cpd*, pueden inducir la

transferencia horizontal de plásmidos conjugativos que codifican determinantes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Dunny, 2013; Fisher y Phillips, 2009).

Se detectó una mayor prevalencia de factores de virulencia en las cepas de *E. faecalis* que en el resto de las especies de *Enterococcus*, corroborando los resultados de publicaciones anteriores relativas a animales salvajes (Silva *et al.*, 2011b) y a muestras de alimentos (Gomes *et al.*, 2008; López *et al.*, 2009; Valenzuela *et al.*, 2008).

Todos los genes de virulencia que se encontraron en el presente estudio se asociaron con la presencia de genes que codifican la resistencia a antimicrobianos de importancia clínica (vancomicina, tetraciclina, macrólidos y aminoglucósidos). Se ha sugerido la posibilidad de que los genes de virulencia y resistencia están físicamente unidos en los mismos elementos genéticos (Aslam *et al.*, 2012). Este hecho plantea problemas debido a la posibilidad de co-selección de los genes de virulencia junto con los genes de resistencia bajo condiciones de presión selectiva causada por los antibióticos, y la probabilidad de co-transferencia de estos determinantes genéticos a otras bacterias presentes en el mismo entorno.

Como conclusión a los objetivos tres y 4, señalar que las cepas de enterococos presentes en carne de caza en el noroeste de España constituyen un reservorio de genes de virulencia y de resistencia a los antimicrobianos, incluyendo el gen *vanA*. Estos genes o las bacterias que los contienen podrían ser potencialmente transmitidos a otros animales o a las personas.

Se ha sugerido que existe una correlación entre la prevalencia de la resistencia a antibióticos en las bacterias de los animales salvajes y el nivel de contacto de estos animales con las poblaciones humanas y animales de granja. Por ello, la carne de caza ofrece una oportunidad para monitorizar el impacto de la utilización de antibióticos en las explotaciones agrícolas y los entornos urbanos próximos. Se necesitan estudios adicionales de vigilancia para obtener una mejor comprensión de la aparición y diseminación de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos en los ecosistemas silvestres y para evaluar el riesgo potencial de estas bacterias para la salud humana y animal.

OBJETIVO 5. Conocer la prevalencia y los patrones de resistencia a antibióticos de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci, VRE*) en preparados de carne de ave, cerdo y vacuno del noroeste de España.

5.1. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE VRE

Este es el primer estudio sobre la presencia de VRE en preparados de carne en España, unos quince o diecisésis años después de que la avoparcina fuese prohibida en la Unión Europea como promotor del crecimiento en animales de abasto. En el presente Trabajo de Investigación se detectaron cepas de VRE en el 23,75% de las muestras, que es una prevalencia sustancialmente mayor que la encontrada en otros estudios realizados en países europeos en los últimos años (Çetinkaya *et al.*, 2013; Kasimoglu-Dogru *et al.*, 2010; Kolumnan *et al.*, 2009; Petternel *et al.*, 2014). De hecho, después de la prohibición del uso de la avoparcina en producción animal, se ha producido una disminución significativa de la prevalencia de VRE en la carne de los animales de abasto (López *et al.*, 2009).

La prevalencia de VRE fue superior en los preparados de carne de ave que en los elaborados con carne de cerdo o de vacuno. Estos hallazgos coinciden con los resultados de otros autores (Çetinkaya *et al.*, 2013) y subrayan la importancia de los productos elaborados con carne de ave como reservorio de VRE, así como la posibilidad de transferencia de estos microorganismos a los seres humanos a través de la manipulación de estos alimentos o bien como consecuencia de eventos de contaminación cruzada a otros productos o del consumo de estas preparaciones insuficientemente cocinadas.

Las especies de enterococos aisladas (*E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* y *E. casseliflavus/E. flavescentis*) se han detectado con frecuencia en muestras de carne cruda de diferentes áreas geográficas (Aslam *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2007; Kasimoglu-Dugru *et al.*, 2010; Klibi *et al.*, 2013; Radhouani *et al.*, 2010; Robredo *et al.*, 2000a). Curiosamente, *E. faecalis* no se identificó en el presente Estudio. Este resultado es coincidente con los datos obtenidos previamente por Borgen *et al.* (2001), Çetinkaya *et al.* (2013), Jung *et al.* (2007) y Morandi *et al.* (2006) en muestras de alimentos. Por el contrario, la presencia de *E. faecalis* ha sido observada en productos cárnicos por la mayoría de los investigadores (Kolumnan *et al.*, 2009; Lemcke y Bülte *et al.*, 2000; Messi *et al.*, 2006).

5.2. SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE VRE

Los resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos pusieron de manifiesto que todas las cepas eran resistentes a, al menos, cuatro antibióticos (incluyendo la vancomicina) de importancia clínica. Este fenotipo de multirresistencia es coincidente con los hallazgos de otros investigadores, y viene a confirmar que los enterococos son habitualmente resistentes, cada vez con mayor frecuencia, a múltiples antibióticos (Borhani *et al.*, 2014).

OBJETIVO 6. Determinar la frecuencia de genes de resistencia y de virulencia en aislamientos de VRE de preparados cárnicos en el noroeste de España y conocer la capacidad de las cepas para formar *biofilm*.

6.1. GENES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La presencia de VRE con el gen de resistencia *vanA*, observada en 27 (16,9%) preparados de carne analizados, es un hallazgo de especial relevancia, ya que este gen interviene en la resistencia de alto nivel a la vancomicina y teicoplanina, situación altamente preocupante en el ámbito clínico, ya que ambos agentes se consideran “de importancia crítica” en medicina humana (WHO, 2011). Además, este gen puede ser transferido horizontalmente a otras bacterias más patógenas, tales como *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (López *et al.*, 2009). Un hecho a destacar es que las cepas de *E. faecium* portadoras del gen *vanA* son los aislamientos de VRE de mayor prevalencia en el ámbito clínico en Europa (Werner *et al.*, 2008). Por otro lado, todas las cepas aisladas en el presente Trabajo que contenían el gen *vanA* presentaron un fenotipo de multirresistencia, exhibiendo resistencia a cuatro o más agentes antimicrobianos estructuralmente no relacionados de relevancia clínica. La prevalencia del gen *vanA* observada en el presente Estudio es superior a la encontrada recientemente en muestras de alimentos en España (López *et al.*, 2009) y en otros países europeos (Kasimoglu-Dogru *et al.*, 2010; Messi *et al.*, 2006).

Un aislamiento de *E. faecium* procedente de carne de ave presentaba el gen *vanB*, que confiere varios niveles de resistencia a la vancomicina (Cattoir y Lecrercq, 2012). Este

es un hallazgo destacable teniendo en cuenta que en los últimos años se han producido en España varios brotes y casos individuales de infección por cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* portadoras del gen *vanB* (López *et al.*, 2012; Nebreda *et al.*, 2007).

La razón de la persistencia de VRE con mecanismos de resistencia adquiridos (VRE_{ar}) en la carne en ausencia de presión selectiva de este glucopéptido en animales (la avoparcina está prohibida como promotor del crecimiento en la Unión Europea desde el año 1997) no está clara, pero podría ser una consecuencia de la co-selección debida al uso de otros agentes antimicrobianos, principalmente macrólidos y tetraciclinas, en la producción de alimentos (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Jung *et al.*, 2007). Así, la resistencia a macrólidos, mediada por el gen *erm(B)*, se ha relacionado con el mismo plásmido conjugativo que alberga los genes *vanA* y por lo tanto ambos genes pueden ser transferidos simultáneamente (Aarestrup *et al.*, 2000). En el presente Estudio 26 (68,4%) aislamientos presentaron los genes *vanA* y *erm(B)*.

Estos resultados sugieren que la co-selección podría ocurrir a través de la utilización de otros antimicrobianos diferentes a los macrólidos. Además, no puede excluirse la existencia de otro mecanismo, diferente a la co-resistencia mediada por genes físicamente unidos y presentes en los mismos elementos genéticos, como responsable de la persistencia de resistencia a glucopéptidos en las cepas de enterococos (Haenni *et al.*, 2009).

Cabe señalar que siete cepas (*E. gallinarum* y *E. casseliflavus/E. flavesiens*) mostraron mecanismos intrínsecos de resistencia mediada por los genes *vanC*. Esta resistencia intrínseca se debe a genes localizados en el cromosoma y, en consecuencia, no es transferible a otras bacterias.

Los genes *vanC* se asocian con bajos niveles de resistencia a la vancomicina y sensibilidad a la teicoplanina (Cattoir y Leclercq, 2012). Sin embargo, en este Trabajo, se observó resistencia o susceptibilidad intermedia a la teicoplanina en 4 aislamientos de *E. gallinarum* y uno de *E. casseliflavus/E. flavesiens* clasificados como no-*vanA* y no-*vanD*. Estos resultados son coincidentes con los hallazgos de otros investigadores (Ahmed *et al.*, 2011), y ponen de manifiesto la capacidad de estas especies para adquirir y desarrollar otros mecanismos de resistencia a la teicoplanina. Para poner de manifiesto dichos

mecanismos de resistencia será necesario someter las cepas de VRE aisladas a estudios adicionales. En este sentido, se ha sugerido que otros genes *van*, como el *vanM*, que confiere un elevado grado de resistencia a vancomicina y teicoplanina, deberían ensayarse de forma rutinaria en los aislamientos de VRE (Chen *et al.*, 2015).

El aislamiento de cinco especies de enterococos con diferentes mecanismos de resistencia a la vancomicina demuestra que, en los preparados cárnicos, existe un amplio espectro de cepas que portan estos genes. Las especies de enterococos detectadas no son consideradas como especialmente patógenas, pero el principal riesgo es la posibilidad de que puedan transferir sus genes de resistencia (excepto la resistencia intrínseca de *E. gallinarum* y *E. casseliflavus/E. flavesiens*) a otras bacterias más patógenas.

En el presente Estudio, todas las cepas mostraron un fenotipo de multirresistencia, con resistencia frecuente a la ampicilina, tetraciclina, eritromicina y ciprofloxacina. Estos compuestos son habitualmente empleados en animales de abasto en la UE (Briyne *et al.*, 2014), lo que podría haber contribuido a los elevados porcentajes de resistencia a dichos agentes encontrados en este Trabajo, así como en otros estudios consultados (Busani *et al.*, 2004; Klibi *et al.*, 2013). Estos cuatro compuestos se consideran agentes antimicrobianos “de importancia crítica” en medicina veterinaria según la Organización Mundial de Sanidad Animal (Oficina Internacional de Epizootías, OIE) (World Organization for Animal Health, 2015). Por su parte, la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a la tetraciclina como un antibiótico de “importancia elevada” y a la ampicilina, eritromicina y ciprofloxacina como antibióticos de “importancia crítica” en medicina humana (WHO, 2011). Es de destacar también la elevada prevalencia de resistencia frente a quinupristina-dalfopristina, que son antibióticos “de importancia elevada” (WHO, 2011).

Merece la pena destacar que todas las cepas de VRE eran resistentes a la eritromicina, lo que sugiere una fuerte asociación entre los genes de resistencia a la vancomicina y a la eritromicina, como ha sido sugerido con anterioridad (Busani *et al.*, 2004). La mayoría de las cepas (68,4%) portaban el gen *erm(B)*, siendo detectado el gen *erm(A)* en 8 (21,1%) aislamientos (4 identificados como *E. faecium*, uno como *E. hirae* y 3 como *E. gallinarum*). Este gen es parte del transposón *Tn554* de *Staphylococcus* (Millán *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren eventos de transferencia horizontal. Sin embargo, se requieren investigaciones adicionales para contrastar esta hipótesis. Hay que señalar que

otros autores han encontrado también el gen *erm(A)* en cepas de enterococos de origen cárnico (Werner *et al.*, 2013).

La resistencia al cloranfenicol, compuesto reconocido como antibiótico “de importancia elevada” (WHO, 2011), que fue observada en el 81,6% de los aislamientos, es un resultado inesperado ya que a mediados de la década de 1990 se prohibió el empleo de cloranfenicol en animales productores de alimentos en la UE como consecuencia del riesgo toxicológico que su uso podía implicar para los consumidores. Cabe señalar que los mecanismos de resistencia cruzada o co-resistencia (Capita y Alonso-Calleja, 2013) podrían ser la causa de la resistencia observada a este compuesto en el presente Estudio, así como en investigaciones previas (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012).

Ninguna de las cepas VRE exhibió resistencia de alto nivel a gentamicina, kanamicina y estreptomicina. Otros autores han obtenido resultados similares en cepas de VRE de origen alimentario (Çetinkaya *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2008). Estos resultados indican que es probable que los aminoglucósidos sean eficaces en el tratamiento de las infecciones por enterococos, como ha sido sugerido anteriormente por Santos *et al.* (2013).

No se detectaron genes de resistencia a antibióticos en numerosos aislamientos de enterococos con resistencia a estos compuestos. Este hallazgo indica que pueden estar presentes otros mecanismos de resistencia en las cepas resistentes a los antibióticos en las que no se encontraron genes de resistencia, como también ha sido indicado por otros autores (Poeta *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2013).

6.2. GENES DE VIRULENCIA

Una de las principales preocupaciones en relación con los enterococos es la presencia de factores de virulencia que pueden incrementar la gravedad de las infecciones causadas por estas bacterias. En el presente Estudio, únicamente se detectaron los genes de virulencia *agg*, *hyl* y *efaAfm*. El gen *hyl*, que codifica la actividad hialuronidasa, se ha detectado previamente en animales productores de alimentos y productos alimenticios derivados de ellos (Mannu *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2012). Los genes de virulencia de la sustancia agregación (*agg*) y la proteína antigénica de endocarditis (*efaAfm*) también se han detectado previamente en enterococos aislados de muestras de carne (Aslam *et al.*, 2012; Valenzuela *et al.*, 2008).

La baja prevalencia de determinantes de virulencia observada en la presente Investigación es coincidente con los hallazgos de otros autores, que han puesto de manifiesto que los factores de virulencia aparecen con mayor frecuencia en aislamientos de enterococos de origen clínico (Ramos *et al.*, 2012). También se ha observado que las cepas de *E. faecium*, *E. durans* y *E. hirae* están generalmente desprovistas de determinantes de virulencia (Gomes *et al.*, 2008; Poeta *et al.*, 2006). De igual manera que en trabajos de otros autores (Klibi *et al.* 2013), no se observó correlación entre la prevalencia de genes de virulencia y la resistencia a antibióticos de la cepas de enterococos.

6.3. PRODUCCIÓN DE *BIOFILM*

La formación de *biofilms* por enterococos, especialmente por aquellos con factores de virulencia y/o de resistencia a varios antibióticos, es un motivo de preocupación tanto en la Industria Alimentaria como en los entornos clínicos (Díez-García *et al.*, 2012). En el presente Estudio, ninguna de las cepas presentó una capacidad moderada o fuerte para formar *biofilms* sobre superficies de poliestireno. Las cepas estudiadas mostraron una débil capacidad para formar *biofilms* (10,5%) o no fueron productoras de *biofilms* (89,5%). Según Di Rosa *et al.* (2006), la formación de *biofilms* puede ser modulada por la presencia del gen *esp*, que no fue detectado en el presente estudio. Asimismo, se ha sugerido que la adquisición de resistencia a la vancomicina puede derivar en una menor capacidad para formar *biofilms* (Asmat *et al.*, 2014; Ramadhan y Hegedus, 2005).

OBJETIVO 7. Estudiar la diversidad genética de las cepas de VRE aisladas mediante su ribotipado.

7.1. RIBOTIPIA

Si bien en el presente Estudio se identificaron únicamente cinco especies de enterococos, hay que señalar que hubo una gran diversidad de cepas, como se indica por el número de *cluster* en el que se agruparon mediante análisis de ribotipado (Figuras 25-28). Estos resultados concuerdan con los hallazgos de otros autores, que señalan que la ribotipificación automatizada con el enzima de restricción *EcoRI* tiene un poder discriminatorio adecuado para los aislamientos de enterococos y podría ser el método de

DISCUSIÓN

elección para determinar con rapidez la relación entre cepas (Brisse *et al.*, 2002). Estas observaciones, así como los resultados del presente Estudio, indican que la ribotipia podría ser útil en la vigilancia epidemiológica de VRE.

El hecho de que cepas procedentes de diferentes preparados de carne, especies animales y puntos de venta se agruparan en los mismos *cluster*, sugiere una fuerte relación genética entre los VRE aislados de diferentes fuentes en el noroeste de España. Cabe señalar, sin embargo, que todos los aislamientos se obtuvieron de una única región, es decir, en un área geográfica relativamente reducida, circunstancia que podría incrementar la probabilidad de similitud entre cepas. Por lo tanto, serían necesarias investigaciones adicionales para corroborar este punto.

La ausencia de correlaciones entre patrones de resistencia a antibióticos, genes de resistencia y patrones de ribotipado ha sido observada con anterioridad para diferentes especies bacterianas (Capita *et al.*, 2007). En este sentido, cabe señalar que el Ribo-Printer® amplifica regiones cromosómicas conservadas, mientras que la resistencia a antibióticos está con frecuencia mediada por ADN extracromosómico.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

PRIMERA. Las células de *Escherichia coli* ATCC 12806 expuestas a concentraciones subinhibitorias de nitrito sódico (NS) o hipoclorito sódico (HIP) son capaces de adaptarse a estos compuestos, observándose adaptación cruzada entre ambos agentes. Una vez adquirido, el incremento de la tolerancia es estable, permaneciendo incluso en ausencia de los antimicrobianos. Estos resultados enfatizan la necesidad de un uso adecuado de los biocidas a lo largo de la cadena alimentaria, para evitar la exposición de las bacterias a concentraciones subinhibitorias de los compuestos.

SEGUNDA. La reducción en la susceptibilidad *Escherichia coli* a los biocidas encontrada tras la adaptación podría estar, al menos parcialmente, relacionada con la presencia de uno o más tipos de bombas de expulsión inespecíficas y con modificaciones en la hidrofobicidad de la superficie celular. El mejor conocimiento de dichos mecanismos de adaptación permitiría el desarrollo de estrategias encaminadas a prevenir este fenómeno. Hay que señalar, no obstante, que los datos obtenidos derivan de experimentos de laboratorio realizados con una única cepa, por lo que sería conveniente llevar a cabo nuevos trabajos, en las condiciones de aplicación habitual de los compuestos y ampliando el número de cepas, para sustentar estos hallazgos. El estudio de la base genética de la tolerancia adquirida al nitrito sódico y al hipoclorito sódico debería ser también abordado.

TERCERA. Se observó una elevada prevalencia de resistencia a antibióticos en los aislamientos de *Enterococcus* spp. procedentes de carne de caza en el noroeste de España. El análisis genómico permitió conocer que estas cepas constituyen un reservorio importante de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos, incluyendo el gen *vanA*, hecho que pone de manifiesto la importancia de una correcta manipulación de la carne de caza para evitar la diseminación de dichos genes y/o de las bacterias que los contienen.

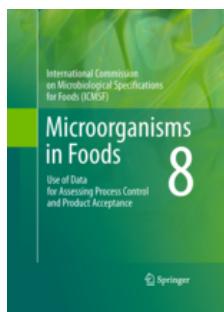
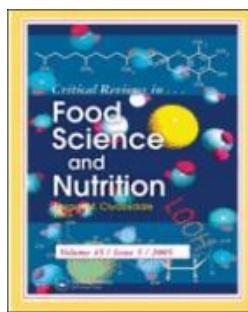
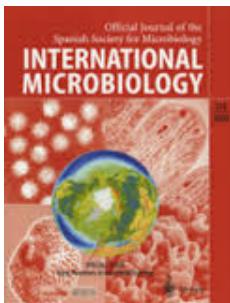
CUARTA. La alta prevalencia de resistencia a antibióticos en enterococos procedentes de carne de caza subraya la necesidad de conocer el origen de estas resistencias. Para ello, sería conveniente llevar a cabo nuevos estudios que encaminados a determinar la relación entre la prevalencia de resistencia a antibióticos en carne de caza silvestre y el grado de contacto de estos animales con poblaciones humanas o ganaderas.

QUINTA. Los preparados cárnicos (especialmente los elaborados con carne de ave) constituyen una fuente potencial de cepas de enterococos resistentes a la vancomicina (VRE) con resistencias múltiples. Estos resultados ponen de manifiesto la conveniencia de llevar a cabo estudios epidemiológicos y moleculares que permitan esclarecer el papel de dichos alimentos en la diseminación de la resistencia a antibióticos, así como evaluar el riesgo potencial de los preparados cárnicos en el escenario de la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública.

SEXTA. Las cepas de *Enterococcus* procedentes de preparados cárnicos presentaban resistencias a antibióticos prohibidos desde hace décadas en producción animal. Este hecho apunta a la existencia de mecanismos de resistencia cruzada o co-resistencia entre diferentes antibióticos. Asimismo, algunas resistencias fenotípicas no pudieron explicarse por la presencia de los genes más frecuentemente asociados con dichas resistencias, resultados que sugieren la existencia de otros mecanismos de resistencia y aconsejan la realización de nuevos ensayos para determinarlos.

SÉPTIMA. El ribotipado automatizado de las cepas de VRE utilizando la enzima de restricción EcoRI mostró un poder discriminatorio adecuado, permitiendo la diferenciación de aislamientos de la misma especie, hecho que, unido al reducido tiempo necesario para la obtención de resultados, pone de manifiesto la posible utilidad de esta técnica en los estudios epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aarestrup, F. M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. y Jensen, L. B. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **37** (2), 127-137.
- AECOSAN (2015). Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Disponible en: <http://aesan.msssi.gob.es/>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- AESAN (2012). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el riesgo asociado a la presencia de plomo en carne de caza silvestre en España. Nº Referencia: AESAN 2012-002. AESAN, Madrid. Disponible en: http://aesan.msssi.gob.es/AESAN/docs/docs/evaluacion_riesgos/comite_cientifico/PLOMO_CAZA.pdf. Fecha del último acceso: 22/11/2015.
- Agersø, Y., Pedersen, A. G. y Aarestrup, F. M. (2006). Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57** (5), 832-839.
- Ahmed, M. O., Clegg, P. D., Williams, N. J., Baptiste, K. E. y Bemet, M. (2011). Vancomycin resistant enterococci (VRE) in equine-fecal samples, pp. 357-362. En: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Science and Technology Against Microbial Pathogens. Research, Development and Evaluation*. World Scientific Publishing Company Pte. Ltd., London.
- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research* **36** (6), 697-705.
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. y Handelsman, J. (2010). Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* **8** (4), 251-259.
- Allen, S. E., Boerlin, P., Janecko, N., Lumsden, J. S., Barker, I. K., Pearl, D. L., Reid-Smith, R. J. y Jardine, C. (2011). Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology* **77** (3), 882-888.
- Alonso, A., Sánchez, P. y Martínez, J. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* **3** (1), 1-9.
- 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* **37** (2-3), 130-136.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2009). Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *Journal of Microbiology* **47** (2), 142-146.
- Alonso-Hernando, A., Guevara-Franco, J. A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2013). 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.
- 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.
- Álvarez-Ordóñez, A., Fernández, A., López, M., Arenas, R. y Bernardo, A. (2008). Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. *International Journal of Food Microbiology* **123** (3), 212-219.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aminov, R. I., Garrigues-Jeanjean, N. y Mackie, R. I. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (1), 22-32.
- Andrade, A., Girón, J. A., Ahmaz, J. M. K., Trabulsi, L. R. y Martínez, M. B. (2002). Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infection and Immunity* **70** (10), 5882-5886.
- ANICE (2015). El sector cárnico español. Disponible en: www.anice.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- Arias, C. A., Robredo, B., Singh, K. V., Torres, C., Panesso, D. y Murray, B. E. (2006). Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae mur-2* gene in *E. durans*. *Journal of Clinical Microbiology* **44** (4), 1567-1570.
- ASICCAZA (2015). Asociación Interprofesional de la Carne de Caza. El sector en cifras. Disponible en: www.asiccaza.org. Fecha del último acceso: 14/10/2015.
- Aslam, M., Diarra, M. S., Checkley, S., Bohaychuk, V. y Masson, L. (2012). Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *International Journal of Food Microbiology* **156** (3), 222-230.
- Asmat, A., Dada, A. Ch. y Gires, U. (2014). Biofilm formation, *gel* and *esp* gene carriage among recreational beach enterococci. *Global Journal of Health Science* **6**, 241-253.
- Baquero F., Blázquez J. y Martínez J. L. (2002). Mutación y resistencia a antibióticos. *Investigación y Ciencia Diciembre* **2002** (315), 72-78.
- Barnes, H. J. y Gross, W. B. (1997). Colibacilosis, pp. 131-139. En: Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W. y McDougald, L. R. (Eds.), *Diseases of poultry*, 10th ed. Mosby-Wolfe Medical Publication Ltd., London.
- Blumenschine, R. J. y Cavallo, J. A. (1992). Scavenging and human evolution. *Scientific American* **247** (4), 90-96.
- BOE (1983). Real Decreto 3380/1983, de 30 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Lejas. *Boletín Oficial del Estado* **28/01/1984** núm. **24**, 2331-2334. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/1984/01/28/pdfs/A02331-02334.pdf>. Fecha del último acceso: 24/09/2015.
- BOE (1986). Orden de 14 de enero de 1986 por la que se aprueba la norma de calidad para carnes picadas de vacuno, ovino y porcino destinadas al mercado interior. *Boletín Oficial del Estado* **21/01/1986** núm. **18**, 2935-2937. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/1986/01/21/pdfs/A02935-02937.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- BOE (1993). Real Decreto 349/1993, de 5 de marzo, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Lejas aprobada por el Real Decreto 3380/1983, de 30 de noviembre. *Boletín Oficial del Estado* **20/04/1993** núm. **94**, 11575-11578. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/1993/04/20/pdfs/A11575-11578.pdf>. Fecha del último acceso: 24/09/2015.
- BOE (1995). Real Decreto 2551/1994, de 29 de diciembre, por el que se establecen las condiciones de sanidad animal y sanitarias aplicables a los intercambios e importaciones de productos no sometidos, con respecto a estas condiciones, a las normas específicas establecidas en el capítulo I del Anexo A del Real Decreto 49/1993, de 15 de enero, y, por lo que se refiere a los patógenos, en el Real Decreto 1316/1992, de 30 de octubre. *Boletín Oficial del Estado* **10/02/1995** núm. **35**, 4526-4538. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/1995/02/10/pdfs/A04526-04538.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.

- BOE (2003). Real Decreto 1376/2003, de 7 de noviembre, por el que se establecen las condiciones sanitarias de producción, almacenamiento y comercialización de las carnes frescas y sus derivados en los establecimientos de comercio al por menor. *Boletín Oficial del Estado 14/11/2003* núm. 2073, 40094-40101. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2003/11/14/pdfs/A40094-40101.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- BOE (2004). Real Decreto 1976/2004, de 1 de octubre, por el que se establecen las normas zoosanitarias aplicables a la producción, transformación, distribución e introducción de los productos de origen animal destinados al consumo humano. *Boletín Oficial del Estado 15/10/2004* núm. 249, 34461-34466. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2004/10/15/pdfs/A34461-34466.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- BOE (2006). Real Decreto 640/2006, de 26 de mayo, por el que se regulan determinadas condiciones de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene, de la producción y comercialización de los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado 27/05/2006* núm. 126, 19999-20002. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2006/05/27/pdfs/A19999-20002.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- BOE (2010). Real Decreto 135/2010, de 12 de febrero, por el que se derogan disposiciones relativas a los criterios microbiológicos de los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado 25/02/2010* núm. 49, 18297-18299. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2010/02/25/pdfs/BOE-A-2010-3032.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- BOE (2011). Real Decreto 1338/2011, de 3 de octubre, por el que se establecen distintas medidas singulares de aplicación de las disposiciones comunitarias en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado 14/10/2011* núm. 248, 107631-107635. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2011/10/14/pdfs/BOE-A-2011-16118.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- BOE (2014). Real Decreto 474/2014, de 13 de junio, por el que se aprueba la norma de calidad de derivados cárnicos. *Boletín Oficial del Estado 18/06/2014* núm. 147, 46058-46078. Disponible en: <https://www.boe.es/boe/dias/2014/06/18/pdfs/BOE-A-2014-6435.pdf>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- Boeris, P. S., Domenech, C. E. y Lucchesi, G. I. (2007). Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *Journal of Applied Microbiology* 103 (4), 1048-1054.
- Bonnedalh, J. y Järhult, J. D. (2014). Antibiotic resistance in wild birds. *Upsala Journal of Medical Sciences* 119 (2), 113-116.
- Borgen, K., Sørum, M., Wasteson, Y. y Kruse, H. (2001). VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *International Journal of Food Microbiology* 64 (1-2), 89-94.
- Borhani, K., Ahmadi, A., Rahimi, F., Pourshafie, M. R. y Talebi, M. (2014). Determination of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* diversity in Tehran sewage using plasmid profile, biochemical fingerprinting and antibiotic resistance. *Jundishapur Journal of Microbiology* 7 (2), e8951.
- Braoudaki, M. y Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology* 42 (1), 73-78.
- Braoudaki, M. y Hilton, A. C. (2005). Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25, 31-37.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brisse, S., Fussing, V., Ridwan, B., Verhoef, J. y Willems, R. J. L. (2002). Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (6), 1977-1984.
- Briyne, N. de, Atkinson, J., Pokludová, L. y Borriello, S. P. (2014). Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record* **175** (13), 325.
- Buchanan, R. L., Golden, M. H. y Phillips, J. G. (1997). Expanded models for the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* **82**, 567-577.
- Busani, L., del Grosso, M., Paladini, C., Graziani, C., Pantosti, A., Biavasco, F. y Caprioli, A. (2004). Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and –resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *International Journal of Food Microbiology* **97** (1), 17-22.
- Butaye, P., Devriese, L. A. y Haesebrouck, F. (2001). Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (5), 1374-1378.
- CAE (2006). Código Alimentario Español y disposiciones complementarias, 7^a ed. Tecnos, Madrid.
- Cámara de Comercio de España (2015). Base de datos. Exportaciones. Disponible en: www.camaradecomercio.es. Fecha del último acceso: 24/09/2015.
- Capita González, R. (2013). Papel de la Industria Alimentaria en el control de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Discurso de Toma de Posesión como Académica Correspondiente en la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León. Universidad de León, León.
- 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.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. y Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses in slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103** (5), 1366-1375.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, M. C. y Moreno, B. (2002). Review: trisodium phosphate treatment for decontamination of poultry. *Food Science and Technology International* **8**, 11-24.
- Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2003). Sampling methods for microbiological analysis of red meat and poultry carcasses. *Journal of Food Protection* **67** (6), 1303-1308.
- 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 biofilms, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology* **80** (4), 1268-1280.
- Carlson, S. A., Sharma, V. K., McCuddin, Z. P., Rasmussen, M. A. y Franklin, S. K. (2007). Involvement of a *Salmonella* genomic island 1 gene in the rumen protozoa-mediated enhancement of invasion for multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity* **75** (2), 792-800.
- Cattoir, V. y Leclercq, R. (2012). Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68** (4), 731-742.
- CDC (2013). Antibiotic Resistance Threats in the United States. Centers for Disease Prevention and Control. Disponible en: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>. Fecha del último acceso: 24/09/2015.

- Cerf, O., Carpentier, B. y Sanders, P. (2010). Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "Resistance has different meanings". *International Journal of Food Microbiology* **136** (3), 247-254.
- Çetinkaya, F., Muş, T. E., Soyutemiz, G. E. y Çibik, R. (2013). Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* **37** (5), 588-593.
- Chen, Ch., Sun, J., Guo, Y., Lin, D., Guo, Q., Hu, F., Zhu, D., Xu, X. y Wand, M. (2015). High prevalence of *vanM* in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Shanghai, China. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy*. En prensa. Doi:10.1128/AAC.01732-15.
- Cho, H., Oh, Y., Park, S. y Lee, Y. (2001). Concentration of CCCP should be optimized to detect the efflux system in quinolone-susceptible *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology* **39** (1), 62-66.
- Choi, J. M. y Woo, G. J. (2013). Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *International Journal of Food Microbiology* **165** (1), 1-6.
- Chung, H. J., Bang, W. y Drake, M. A. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5** (3), 52-64.
- Clark, N. C., Olsvik, Ø., Swenson, J. M., Spiegel, C. A. y Tenover, F. C. (1999). Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*addA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (1), 157-160.
- Cloete, T. E. (2003). Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation* **51** (4), 277-282.
- CLSI (2013). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals, 4th ed. Approved Standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- CLSI (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
- Codex Alimentarius (2005). CAC/RCP 58-2005 "Code of hygienic practice for meat". Disponible en: <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/es/?provide=standards&orderField=fullReference&sort=asc&num1=CAC/RCP>. Fecha del último acceso: 16/11/2015.
- Cole, D., Drum, D. J. V., Stallknecht, D. E., White, D. G., Lee, M. D., Ayers, S., Sobsey, M. y Maurer, J. J. (2005). Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerging Infectious Diseases* **11** (6), 935-938.
- Corona-Izquierdo, F. P. y Membrillo-Hernández, J. (2002). Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Research in Microbiology* **153**, 181-185.
- Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W. y Carmeli, Y. (2003). Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases* **36** (1), 53-59.
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J. (2002). Aditivos alimentarios, 1^a ed. Mundi Prensa, Madrid.
- D'Arezzo, S., Lanini, S., Puro, V., Ippolito, G. y Visca, P. (2012). High-level tolerance to triclosan may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation. *BMC Research Notes* **5**, 43.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Da Costa, P. M., Loureiro, L. y Matos, A. J. F. (2013). Transfer of multidrugresistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **10** (1), 278–294.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K. y McMeekin, T. A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology* **23** (3-4), 391-404.
- Davidson P. M. y Zivanovic S. (2003). The use of natural antimicrobials, pp. 5-30. En: Zeuthen P. y Bøgh-Sørensen L. (Eds.), *Food preservation techniques*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge.
- Davidson, P. M. y Harrison, M. A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology* **56** (11), 69-78.
- De Leener, E., Decostere, A., De Graef, E. M., Moyaert, H. y Haesebrouck, F. (2005). Presence of antimicrobial resistance among enterococci from cats and dogs. *Microbial Drug Resistance* **11** (4), 395-403.
- Del Río, E., Muriente, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007). Effectiveness of trisodium phosphate, acidified sodium chlorite, citric acid, and peroxyacids against pathogenic bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection* **70**, 2063-2071.
- Demple, B. (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon - a review. *Gene* **179** (1), 53-57.
- Di Rosa, R., Creti, R., Venditti, M., D'Amelio, R., Arciola, C. R., Montanaro, L. y Baldassarri, L. (2006). Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp), and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiology Letters* **256** (1), 145-150.
- 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.
- Doherty, N., Trzcinski, K., Pickerill, P., Zawadzki, P. y Dowson, Ch. G. (2000). Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (11), 2979-2984.
- Doublet, B., Golding, G. R., Mulvey, M. R. y Cloeckaert, A. (2008). Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS ONE* **3** (4), 1-11.
- Doyle, M. P. y Erickson, M. C. (2006). Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science* **74** (1), 98-112.
- Dunny, G. M. (2013). Enterococcal sex pheromones: signaling, social behavior, and evolution. *Annual Review of Genetics* **47**, 457-482.
- Dutka-Malen, S., Evers, S. y Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **33** (1), 24-27.
- Eaton, T. J. y Gasson, M. J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (4), 1628-1635.

- ECDC (2012). European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm. Disponible en: <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2011.pdf>. Fecha del último acceso: 15/10/2015.
- ECDC (2015). European Centre for Disease Prevention and Control. Disponible en: <http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>. Fecha del último acceso: 15/10/2015.
- ECDC/EFSA/EMEA/SCENIHR (2009). Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. Scientific Opinion of the European Centre for Disease Prevention and Control; Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards; Opinion of the Committee for Medicinal Products for Veterinary Use; Scientific Opinion of the Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. *EFSA Journal* **2009** *7* (11), 1372-1450.
- ECDC/EMEA (2009). ECDC/EMEA (European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency) joint technical report. The bacterial challenge: time to react. Disponible en: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_toReact.pdf. Fecha del último acceso: 15/10/2015.
- EEA (European Environment Agency) (2010). Environmental Terminology and Discovery Service (ETDS). Definitions. Disponible en: http://glossary.eea.europa.eu/terminology/concept_html?term=fungicide. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- EFSA (2008a). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *EFSA Journal* **2008** *765*, 1-87. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/biohaz_op_ej765_antimicrobial_resistance_en.3.pdf?ssbinary=true. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- EFSA (2008b). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from DG SANCO on the assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *EFSA Journal* **2008** *659*, 1-26. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/biohaz_op_ej659_decontamination_for_substances_en.3.pdf?ssbinary=true. Fecha del último acceso: 14/10/2015.
- EFSA (2010). EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 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* **2010** *8*, 1544-1575. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1544.pdf>. Fecha del último acceso: 14/10/2015.
- EFSA-ECDC (2015a). EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* **13** (1), 3991, 162 pp.
- EFSA-ECDC (2015b). EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal* **13** (2), 4036, 178 pp.
- Estrela, C., Estrela, C. R. A., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A. y Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal* **13** (2), 113-117.
- European Commission (2006). Scientific Committee on Consumer Products (SCCP). Opinion on triclosan. SCCP/1040/06. Adopted by the SCCP during the 9th plenary meeting of 10 October 2006. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_073.pdf. Fecha del último acceso: 15/10/2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- European Commission (2013). Prospects for Agricultural Markets and Income in the EU 2013-2023. December 2013. Disponible en: http://ec.europa.eu/agriculture/markets-and-prices/medium-term-outlook/2013/fullrep_en.pdf. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- European Parliament (2006). *Antibiotic resistance*. IP/A/STOA/ST/2006-4. Disponible en: http://www.europarl.europa.eu/stoa/publications/studies/stoa173_en.pdf. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- Fajardo, V., González I., Martín, I., Rojas, M. Hernández, P. E., García, T. y Martín, R. (2009) Producción y comercialización de la carne y productos cárnicos procedentes de especies de caza mayor. *Eurocarne* nº 182, 40-47.
- FAO (2011). World livestock 2011: Livestock in food security. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2011. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/014/i2373e/i2373e00.htm>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- FAO (2014a). Food and Nutrition in numbers, 2014. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i4175e.pdf>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- FAO (2014b). Statistical Year Book, 2014. Europe and Central Asia food and agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Budapest, 2014. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3621e.pdf>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- FAO (2014c). Perspectivas alimentarias- Análisis del Mercado Mundial 2014. Disponible en www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/background.html. Fecha del último acceso: 06/11/2015.
- FAOSTAT (2015). Base de datos. Disponible en: <http://data.fao.org>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- FDA (2012). US Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations. Title 21-Food and Drugs. Disponible en: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>. Fecha del último acceso: 15/10/2015.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 155 (6), 1749-1757.
- Furuya, E. Y. y Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology* 4, 36-45.
- Gage, D. J. y Neidhardt, C. (1993). Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2, 4-dinitrophenol. *Journal of Bacteriology* 175 (21), 7105-7108.
- García, A. (2011). Calidad de la carne de especies cinegéticas. Disponible en: www.asicccaza.org. Fecha del último acceso: 10/09/2015.
- Garthright, W. E. (1991). Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology* 8 (3), 239-248.
- Giguère, S., Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walkerm R. D. y Dowling, P. M. (2006). *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Gilbert, P. y MacBain, A. J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 16 (2), 189-208.
- Gill, C. O. (2007). Review: Microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Science* 77 (2), 149–160.

- Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Ike, Y. y Shankar, N. (Eds) (2014). Enterococci. From commensals to leading causes of drug resistant infection. Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>. Fecha del último acceso: 12 de octubre de 2015.
- Giotis, E. S., Blair, I. S. y McDowell, D. A. (2009). Effects of short-term alkaline adaptation on surface properties of *Listeria monocytogenes* 10403S. *The Open Food Science Journal* **3**, 62-65.
- Gomes, B. C., Esteves, C. T., Palazzo, I. C. V., Darini, A. L. C., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco, B. D. G. M. y de Martins, E. C. P. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology* **25** (5), 668-675.
- Gómez-Escalada, M., Harwood, J. L., Maillard, J.-Y. y Ochs, D. (2005). Triclosan inhibition of fatty acid synthesis and its effect on growth of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55** (6), 879-882.
- Gonçalves, A., Poeta, P., Silva, N., Araujo, C., López, M., Ruiz, E., Uliyakina, I., Direitinho, J., Igrelas, G. y Torres, C. (2010). Characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from fecal samples of ostriches by molecular methods. *Foodborne Pathogens and Disease* **7** (9), 1133-1136.
- Guenther, S., Ewers, C. y Wieler, L. H. (2011). Extended-spectrum beta-lactamases producing *E. coli* in wildlife, yet another form of environmental pollution? *Frontiers in Microbiology* **2**, 246.
- Guenther, S., Grobbel, M., Heidemanns, K., Schlegel, M., Ulrich, R. G., Ewers, C. y Wieler, L. H. (2010). First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Science of the Total Environment* **408** (17), 3519–3522.
- Guerin, E., Cambray, G., Sánchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., González-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C. y Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* **324** (5930), 1034.
- Haenni, M., Saras, E., Châtre, P., Meunier, D., Martin, S., Lepage, G., Ménard, M.-F., Lebreton, P., Rambaud, T. y Madec, J.-Y. (2009). *vanA* *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus casseliflavus* detected in French cattle. *Foodborne Pathogens and Disease* **6** (9), 1107-1111.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. y Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* **2** (2), 95-108.
- Hamadi, F., Latrache, H., Zahir, H., Elghmari, A., Timinouni, M. y Ellouali, M. (2008). The relation between *Escherichia coli* surface functional groups composition and their physicochemical properties. *Brazilian Journal of Microbiology* **39**, 10-15.
- Hammerum, A. M. (2012). Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clinical Microbiology and Infection* **18** (7), 619-625.
- Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T. M., Werner, G. y Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clinical Microbiology and Infection* **16** (6), 541-554.
- Hoffman, L. C. y Wicklund, E. (2006). Game and venison meat for the modern consumer. *Meat Science* **74**, 197-208.
- IFT (Institute of Food Technologists) (2006). Antimicrobial resistance: Implications for the Food System. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **5** (3), 71-137.
- Jahangiri, S., Talebi, M., Eslami, G. y Pourshafie, M. R. (2010). Prevalence of virulence factors and antibiotic resistance in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolated from sewage and clinical samples in Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology* **28** (4), 337-341.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- James, R. C., Pierce, J. G., Okano, A. y Boger, D. L. (2012). Redesign of glycopeptide antibiotics: back to the future. *ACS Chemical Biology* **7**, 797-804.
- Jett, B. D., Jensen, H. G., Nordquist, R. E. y Gilmore, M. S. (1992). Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infection and Immunity* **60** (6), 2445-2452.
- Jones, M. V., Herd, T. M. y Christie, H. J. (1989). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios* **58** (234), 49-61.
- Jung, W. K., Lim, J. Y., Kwon, N. H., Kim, J. M., Hong, S. K., Koo, H. C., Kim, S. H. y Park, Y. H. (2007). Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *International Journal of Food Microbiology* **113** (1), 102-107.
- Jurkovič, D., Križková, L., Dušinský, R., Belicová, A., Sojka, M., Krajčovič, J. y Ebringer, L. (2006). Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Letters in Applied Microbiology* **42** (6), 553-559.
- Kashket, E. R. (1985). The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Annual Reviews in Microbiology* **39**, 219-242.
- Kasimoglu-Dogru, A., Gencay, Y. E. y Ayaz, N. D. (2010). Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of *vanA* and *vanB* in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Research in Veterinary Science* **89** (2), 153-158.
- Kempf, I. y Zeitouni, S. (2009). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences. *Pathologie Biologie* **60** (2), e9-e14.
- Kim, H., Ryu J. H. y Beuchat, L. R. (2007). Effectiveness of disinfectants in killing *Enterobacter sakazakii* in suspension, dried on the surface of stainless steel, and in a biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (4), 1256-1265.
- Klare, I., Konstabel, C., Mueller-Bertling, S., Werner, G., Strommenger, B., Kettlitz, C., Borgmann, S., Schulte, B., Jonas, D., Serr, A., Fhor, A. M., Eigner, U. y Witte, W. (2005). Spread of ampicillin/vancomycin resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **24** (12), 815-825.
- Klibi, N., Said, L. B., Jouini, A., Slama, K. B., López, M., Sallem, R. B., Boudabous, A. y Torres, C. (2013). Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Science* **93** (3), 675-680.
- Kolumna, A., Akan, L. S. y Çakiroğlu, F. P. (2009). Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control* **20** (3), 281-283.
- Kuhn, I., Iversen, A., Burman, L. G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F. M., Seyfarth, A. M., Blanch, A. R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M. A., Domínguez, L., Herrero, I. A. y Mollby, R. (2003). Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment-a European Study. *International Journal of Food Microbiology* **88** (2-3), 133-145.
- Kümmerle, N., Feucht, H. H. y Kaulfers, P. M. (1996). Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (10), 2276-2279.
- Lago Moneo, J. A., Rodriguez Silgado, M. y Lamas, A (2011). El consumo de comida rápida. Doc. 08/2011. EAE Business School, Madrid. Disponible en: <https://www.yumpu.com/es/document/view/14251449/el-consumo-de-comida-rapida-abces>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.

- Lambert, P. A. (1992). Resistance to non-antibiotic antimicrobial agents, pp. 295-304. En: Hugo, W. B. y Russell, A. D. (Eds.), *Pharmaceutical Microbiology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Langsrud, S. y Sundheim, G. (1997). Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Microbiology* **82** (6), 705-712.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 181-186.
- Lemcke, R. y Bülte, M. (2000). Occurrence of the vancomycin-resistant genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2* and *vanC3* in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *International Journal of Food Microbiology* **60** (2-3), 185-194.
- Leonard, W. R. (2003). Incidencia de la dieta en la hominización. *Investigación y Ciencia* nº **317**, 49-57.
- Leonard, W. R., Snodgrass, J. J. y Robertson, M. L. (2007). Effects of Brain Evolution on Human Nutrition and Metabolism. *Annual Review of Nutrition* **27**, 311-327.
- Lester, C. H., Frimodt-Møller, N., Sørensen, T. L., Monnet, D. L. y Hammerum, A. M. (2006). In vivo transfer of the *vanA* resistance gene from an isolate of animal origin to an *Enterococcus faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50** (2), 596-599.
- Li, D., Yu, T., Zhang, Y., Yang, M., Li, Z., Liu, M. y Qi, R. (2010). Antibiotic resistance characteristics of environmental bacteria from an oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (11), 3444-3451.
- Lianou, A. y Koutsoumanis, K. P. (2011). Effect of the growth environment on the strain variability of *Salmonella enterica* kinetic behavior. *Food Microbiology* **28**, 828-837.
- Linton, M., McClements, J. M. J. y Patterson, M. F. (2001). Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skimmed milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **2** (2), 99-104.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F. M., Hasman, H. y Cizek, A. (2010). Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology* **108** (5), 1702-1711.
- López, M., Rezusta, A., Seral, C., Aspiroz, C., Marne, C., Aldea, M. J. Ferrer, I., Revillo, M. J., Castillo, F. J. y Torres, C. (2012). Detection and characterization of a ST6 clone of *vanB2-Enterococcus faecalis* from three different hospitals in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **31** (3), 257-260.
- López, M., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martínez, S., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zaragoza, M. y Torres, C. (2009). Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *International Journal of Food Microbiology* **133** (1-2), 172-178.
- Loughlin, M. F., Jones, M. V. y Lambert, P. A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49** (4), 631-639.
- Lozano, C., González-Barrio, D., Camacho, M. C., Lima-Bargero, J. F., de la Puente, J., Höfle, U. y Torres, C. (2015). Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microbial Ecology*. PMID: 26194421.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lunestad, B. T., Nesse, L., Lassen, J., Svhuis, B., Nesbakken, T., Fossum, K., Rosnes, J. T., Kruse, H. y Yazdankhah, S. (2007). *Salmonella* in fish feed; occurrence and implications for fish and human health in Norway. *Aquaculture* **265** (1-4), 1-8.
- MAGRAMA (2014). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Datos de consumo alimentario 2013. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- MAGRAMA (2015a). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe sector Industrias cárnica. Abril, 2115. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- MAGRAMA (2015b). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Industria Alimentaria 2013-2014. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- MAGRAMA (2015c). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. CEXGAN, 2014. Exportaciones ganaderas. Junio, 2014. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- MAGRAMA (2015d). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. CEXGAN Exportación animal. Abril 2015. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- MAGRAMA (2015e). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Base de datos de consumo en los hogares. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- MAGRAMA (2015f). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Informe del Consumo de Alimentación en España, 2014. Mayo, 2015. Disponible en: www.magrama.gob.es. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- Malek, S. M. A. y Badran, Y. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adapted to 2-phenoxyethanol shows cross-resistance to dissimilar biocides and increased susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica* **66** (6), 588-592.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Duprè, I. y Sechi, L. A. (2003). Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *International Journal of Food Microbiology* **88** (2-3), 291-304.
- Marinho, C., Silva, N., Pombo, S., Santos, T., Monteiro, R., Goncalves, A., Micael, J., Rodrigues, P., Costa, A. C., Igrelas, G. y Poeta, P. (2013). Echinoderms from Azores islands: an unexpected source of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolates. *Marine Pollution Bulletin* **69** (1-2), 122-127.
- McBride, S. M., Fischetti, V. A., LeBlanc, D. J., Moellering Jr., R. C. y Gilmore, M. S. (2007). Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PLoS ONE* **2** (7), e582.
- McManus, M. C. (1997). Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy* **54** (12), 1420-1433.
- Messi, P., Guerrieri, E., Niederhäusern, S. de, Sabia, C. y Bondi, M. (2006). Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* **107** (2), 218-222.
- Millán, L., Goñi, P., Cerdá, P., Rubio, M. C. y Gómez-Luz, R. (2007). Novel 10-bp deletion in the translational attenuator of a constitutively expressed *erm(A)* gene from *Staphylococcus epidermidis*. *International Microbiology* **10** (2), 147-150.

- Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A. y Capita, R. (2014). Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**, 329-334.
- Moorman, M. A., Theleman, C. A., Zhou, S., Pestka, J. J., Linz, J. E. y Ryser, E. T. (2008). Altered hydrophobicity and membrane composition in stress-adapted *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection* **71** (1), 182-185.
- Morandi, S., Brasca, M., Andriguetto, C., Lombardi, A. y Lodi, R. (2006). Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian dairy products. *International Dairy Journal* **16** (8), 867-875.
- Mortensen, H. D., Jacobsen, T., Koch, A. G. y Arneborg, N. (2008). Intracellular pH homeostasis plays a role in the tolerance of *Debaromyces hansenii* and *Candida zeylanoides* to acidified nitrite. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (15), 4835-4840.
- Moura, I., Torres, C., Silva, N., Somalo, S., Igrelas, G. y Poeta, P. (2013). Genomic description of antibiotic resistance in *Escherichia coli* and enterococci isolates from healthy Lusitano horses. *Journal of Equine Veterinary Science* **33** (12), 1057-1063.
- Navarro-Gonzalez, N., Porrero, M. C., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Domínguez, L. y Lavín, S. (2013). Antimicrobial resistance in indicator *Escherichia coli* isolates from free-ranging livestock and sympatric wild ungulates in a natural environment (Northeastern Spain). *Applied and Environmental Microbiology* **79** (19), 6184-6186.
- Nebreda, T., Oteo, J., Aldea, C., García-Estébanez, C., Gastelu-Iturri, J., Bautista, V., García-Cobos, S. y Campos, J. (2007). Hospital dissemination of a clonal complex 17 vanB2-containing *Enterococcus faecium*. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* **59** (4), 806-807.
- Norouzi, F., Mansouri, S., Moradi, M. y Razavi, M. (2010). Comparison of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among ESBL- and non-ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *African Journal of Microbiology* **4** (11), 1143-1147.
- Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J. C., Baquero, F. y Peixe, L. V. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* **56** (6), 1139-1143.
- OJEC (1998). Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. *Official Journal of the European Communities* **24/04/1998** **L123**: 1-63. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:123:0001:0001:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 15/10/2015.
- OJEU (2002). Regulation (EC) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Union* **01/02/2004** **L31**, 1-24. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:031:0001:0024:en:PDF>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- OJEU (2004a). Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Union* **30/04/2004** **L139**, 55-205. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OJEU (2004b). Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union 30/04/2004 L139*, 1-54. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0001:0054:en:PDF>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.

OJEU (2004c). Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 laying down specific rules for the organisation of official controls on products of animal origin intended for human consumption. *Official Journal of the European Union 30/04/2004 L226*, 83-227. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:226:0083:0127:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.

OJEU (2005a). Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union 22/12/2005 L338*, 1-26. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32005R2073&from=en>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.

OJEU (2005b). Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 laying down implementing measures for certain products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the organisation of official controls under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004. *Official Journal of the European Union 22/12/2005 L338*, 27-59. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0027:0059:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.

OJEU (2005c). Commission Regulation (EC) No 2075/2005 of 5 December 2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union 22/12/2005 L338*, 60-82. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0060:0082:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.

OJEU (2007). Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuff. *Official Journal of the European Union 07/12/2007 L322*, 12-29. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.

OJEU (2008). Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on food additives. *Official Journal of the European Union 31/12/2008 L354*, 16-33. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:en:PDF>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.

OJEU (2011). Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of European Union 12/11/2011 L295*, 1-177. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:295:0001:0177:en:PDF>. Fecha del último acceso: 12/11/2015.

OJEU (2012a). Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. *Official Journal of European Union 27/06/2012 L167*, 1-123. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:167:0001:0123:en:PDF>. Fecha del último acceso 15/11/2015.

- OJEU (2012b). Commission Regulation (EU) No 231/2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council. *Official Journal of European Union* **23/03/2012 L83**, 1-295. Disponible en: <http://www.mpeda.com/Aquaculture/EC-Regulation.pdf>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- OJEU (2013). Commission Regulation (EU) No 101/2013 of 4 February 2013 concerning the use of lactic acid to reduce microbiological surface contamination on bovine carcasses. *Official Journal of the European Union* **05/03/2013 L34**, 1-3. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:034:0001:0003:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 17/10/2015.
- OJEU (2014a). Commission Regulation (EU) No 216/2014 of 7 March 2014 amending Regulation (EC) No 2075/2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union* **08/03/2014 L69**, 85-92. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2014:069:0085:0092:EN:PDF>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- OJEU (2014b). Commission implementing Regulation (EU) No 1114/2014 of 21 October 2014 amending Regulation (EC) No 2075/2005 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union* **26/10/2014 L302**, 46-50. Disponible en: https://www.fsai.ie/uploadedFiles/Reg1114_2014.pdf. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- OJEU (2015). Commission implementing Regulation (EU) 2015/1375 of 10 August 2015 laying down specific rules on official controls for *Trichinella* in meat. *Official Journal of the European Union* **11/08/2015 L212**, 7-34. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1375&from=EN>. Fecha del último acceso: 15/11/2015.
- Ortega-Morente, E., Fernández-Fuertes, M. A., Grande-Burgos, M. J., Abriouel, H., Pérez-Pulido, R. y Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **162** (1), 13-25.
- Pagedar, A., Singh, J. y Batish, V. K. (2012). Adaptation to benzalkonium chloride and ciprofloxacin affects biofilm formation potential, efflux pump and haemolysin activity of *Escherichia coli* of dairy origin. *Journal of Dairy Research* **79** (4), 383-389.
- Perichon, B., Reynolds, P. y Courvalin, P. (1997). VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (9), 2016-2018.
- Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A. y Lo Nostro, A. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology* **41** (August 2014), 1-7.
- Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G. y Ellerbroek, L. (2003). Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *International Journal of Food Microbiology* **88** (2-3), 311-314.
- Pettnerl, C., Galler, H., Zarfel, G., Luxner, J., Haas, D., Grisold, A. J., Reinthaler, F. F. y Feierl, G. (2014). Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiology* **44**, 41-46.
- Pillai, S. K., Sakoulas, G., Gold, H. S., Wennersten, C., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C. y Inouye, R. T. (2002). Prevalence of the *frs* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *Journal of Clinical Microbiology* **40** (7), 2651-2652.
- 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Poeta, P., Costa, D., Rodrigues, J. y Torres, C. (2006). Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents* **27** (2), 131-137.
- Poeta, P., Costa, D., Rodrígues, J. y Torres, C. (2005). Study of faecal colonization by *vanA*-containing *Enterococcus* strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobials and Chemotherapy* **55** (2), 278-280.
- Poirel, L., Potron, A., De la Cuesta, C., Clearly, T., Nordman, P. y Munoz-Price, L.S. (2012). Wild coastline birds as reservoirs of broad-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Miami Beach, Florida. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56** (5), 2756-2758.
- Pos, K. M., Schiefner, A., Seeger, M. A. y Diederich, C. (2004). Crystallographic analysis of AcrB. *FEBS Letters* **564** (3), 333-339.
- Potenski, C. J., Gandhi, M. y Matthews, K. R. (2003). Exposure of *Salmonella Enteritidis* to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* **220** (2), 181-186.
- 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.
- Radhouani, H., Pinto, L., Coelho, C., Sargo, R., Araújo, C., López, M., Torres, C., Igrejas, G. y Poeta, P. (2010). MLST and a genetic study of antibiotic resistance and virulence factors in *vanA*-containing *Enterococcus* from buzzards (*Buteo buteo*). *Letters in Applied Microbiology* **50** (5), 537-541.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S. y Igrejas, G. (2014). Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. *Frontiers in Microbiology* **5** (23), doi: 10.3389/fmicb.2014.00023.
- Radimersky, T., Frolkova, P., Janoszowska, D., Dolejska, M., Svec, P., Roubalova, E., Cikova, P., Ciek, A. y Literak, I. (2010). Antibiotic resistance in faecal bacteria (*Escherichia coli*, *Enterococcus* spp.) in feral pigeons. *Journal of Applied Microbiology* **109** (5), 1687-1695.
- Ramadhan, A. A. y Hegedus, E. (2005). Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. *Journal of Clinical Pathology* **58** (7), 685-686.
- Ramos, S., Igrejas, G., Rodrigues, J., Capelo-Martínez, J. L. y Poeta, P. (2012). Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *vanA*-containing enterococci from cattle, sheep and pigs subsequent to the discontinuation of the use of avoparcin. *The Veterinary Journal* **193** (1), 301-303.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., Piddock, L. J. V. y Webber, M. A. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60** (6), 1273-1280.
- Rattanasomboon, N., Bellara, S. R., Harding, C. L., Fryer, P. J., Thomas, C. R., Al-Rubeai, M. y McFarlane, C. M. (1999). Growth and enumeration of the meat spoilage bacterium *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology* **51**, 145-158.
- Rice, L. B. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology* **12** (5), 476-481.
- Robredo, B., Singh, K. V., Baquero, F., Murray, B. E. y Torres, C. (2000a). Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology* **54** (3), 197-204.

- Robredo, B., Singh, K. V., Torres, C. y Murray, B. E. (2000b). Streptogramin resistance and shared pulsed-field gel electrophoresis patterns in *vanA*-containing *Enterococcus faecium* and *Enterococcus hirae* isolated from humans and animals in Spain. *Microbial Drug Resistance* **6** (4), 305–311.
- Rolain, J. M. (2013). Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. *Frontiers in Microbiology* **4**, 1-10.
- Romanova, N. A., Wolfs, P. F. G., Brovko, L. Y. y Griffiths, M. W. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (5), 3498-3503.
- Rosenberg, M., Gutnick, D. y Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters* **9** (1), 29-33.
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The landscape of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* **117** (6), A245-A250.
- Ruiz, J., Ventanas, S., Martín, D. y Martín, A. (2015). La calidad de la carne de caza. Servicio de publicaciones, Junta de Extremadura, Mérida.
- Russell, A. D. (1991). Principles of antimicrobial activity activity, pp. 29-58. En: Block, S. S. (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52**, 750-763.
- Santos, T., Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Micael, J., Rodrigues, T., Resende, 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** (December 2013), 25-31.
- Sanyal, D. y Greenwood, D. (1993). An electronmicroscope study of glycopeptide antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology* **39**, 204-210.
- SCENIHR (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf. Fecha del último acceso: 16/10/2015.
- SCHER-SCENIHR (2008). SCHER/SCENIHR Scientific Opinion on the environmental impact and effect on antimicrobial resistance of four substances used for the removal of microbial surface contamination of poultry carcasses, April 2008. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_015.pdf. Fecha del último acceso: 16/10/2015.
- Schmitz, F.-J., Perdikouli, M., Beeck, A., Verhoef, J. y Fluit, A. C. for the European SENTRY participants (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and modifications in genes coding for dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in European *Streptococcus pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **48**, 931-942.
- Shi, X. y Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology* **20**, 407-413.
- Silva, N., Igrejas, G., Felgar, A., Gonçalves, A., Pacheco, R y Poeta, P. (2012). Molecular characterization of *vanA*-containing *Enterococcus* from migratory birds: song thrush (*Turdus philomelos*). *Brazilian Journal of Microbiology* **43** (3), 1026-1029.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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), 4871-4876.
- Silva, N., Igrejas, G., Rodrigues, P., Rodrigues, T., Gonçalves, A., Felgar, A. C., Pacheco, R., Gonçalves, D., Cunha, R. y Poeta, P. (2011b). Molecular characterization of vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum β-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates in wild birds from the Azores Archipelago. *Avian Pathology* **40** (5), 473-479.
- Silva, N., Igrejas, G., Vaz, J., Araújo, C., Cardoso, L., Rodrigues, J., Torres, C. y Poeta, P. (2011a). Virulence factors in enterococci from partridges (*Alectoris rufa*) representing a food safety problem. *Foodborne Pathogens and Disease* **8** (7), 831-833.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B. y Denamur, E. (2006). Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **57** (6), 1215-1219.
- Smith, K. y Hunter I.S. (2008). Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology* **57** (Pt 8), 966-973.
- Smith, S., Wang, J., Fanning, S. y McMahon, B. J. (2014). Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: a coincidence or cause of concern? *Irish Veterinary Journal* **67** (1), 8. doi: 10.1186/2046-0481-67-8.
- Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J. y Woodford, N. (2000). Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. *Antimicrobials Agents and Chemotherapy* **44** (2), 433-436.
- Sosa, A. de J., Byarugaba, D. K., Amábile-Cuevas, C. F., Hsueh, P. R., Kariuki, S. y Okeke, I. N. (2009). Antimicrobial Resistance in Developing Countries. Springer, New York.
- Spellberg, M. D. (2012). New antibiotic development: barriers and opportunities in 2012. *APUA Clinical Newsletter* **30** (1), 8-10.
- Stickler D. J. y Jones, G. L. (2008). Reduced susceptibility of *Proteus mirabilis* to triclosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52** (3), 991-994.
- Stickler, D. J. (2004). Intrinsic resistance of Gram-negative bacteria, pp. 154-168. En: Fraise, A. P., Lambert, P. A. y Maillard, J.-Y. (Eds.), *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 4th edn. Blackwell Scientific Publication, Oxford.
- Sujatha, S. y Praharaj, I. (2012). Glycopeptide resistance in Gram-positive cocci: A review. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2012:ID 781679.
- Suller, M. T. E. y Russell, A. D. (2000). Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46** (1), 11-18.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A. y Wondrack, L. (1996). Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (11), 2562-2566.
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control* **34**, S3-S10; discussion S64-S73.
- Thomas, L., Maillard, J.-Y., Lambert, R. J. W. y Russell, A. D. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *Journal of Hospital Infection* **46** (4), 297-303.

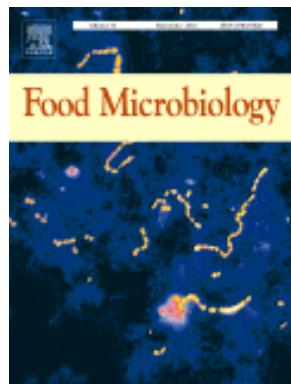
- To, M. S., Favrin, S., Romanova, N. y Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **68** (11), 5258-5264.
- Tompkin, R. B. (2005). Nitrite, pp. 169-236. En: Davidson, P. M., Sofos, J. N. y Branen, A. L. (Eds.), *Antimicrobials in Food*, 3rd ed. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton.
- Torres Manrique, C. (2012). La resistencia bacteriana a los antibióticos. Siete décadas después de Fleming. Discurso de Toma de Posesión como Académica de Número de la Academia de Farmacia Reino de Aragón. Colegio Oficial de Farmacéuticos de Zaragoza, Zaragoza.
- Torres, C., Tenorio, C., Portillo, A., García, M., Martínez, C., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F. y Zaragaza, M. (2003). Intestinal colonization by *vanA*- or *vanB*-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. *Microbial Drug Resistance* **9**, S47-S52.
- Valenzuela, A., Omar, N. B., Abriouel, H., López, R. L., Ortega, E., Cañamero, M. M. y Gálvez, A. (2008). Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. *Food and Chemical Toxicology* **46** (8), 2648-2652.
- Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J.G., Beaudet, R., Shareck, F. y Villemur, R. (2001). Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (6), 2404-2409.
- Van de Klundert, J. A. M. y Vliegenthart, J. S. (1993). PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes, pp. 547-552. En: Persing, D. H., Smith, T. F., Tenover, F. C. y White, T. J. (Eds.), *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Van den Bogaard, A. E. y Stobberingh, E. E. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics links between animals and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **14** (4), 327-335.
- Vargas, R. H. M., Reich, F., Klein, G. y Atanassova, V. (2013). Bacterial contamination and antibiotic resistance of isolates from packaged game meat. *Fleischwirtschaft* **93** (4), 179-182.
- Weese, J. S., Dick, H., Willey, B. M., McGeer, A., Kreiswirth, B. N., Innis, B. y Low, D. E. (2006). Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. *Veterinary Microbiology* **115** (1-3), 148-155.
- Werner, G., Coque, T. M., Franz, Ch. 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 Food Microbiology* **303** (6-7), 360-379.
- Werner, G., Coque, T. M., Hammerum, A. M., Hope, R., Hrynewicz, W., Johnson, A., Klare, I., Kristinsson, K. G., Leclercq, R., Lester, C. H., Lillie, M., Novais, C., Olsson-Liljequist, B., Peixe, L. V., Sadowy, E., Simonsen, G. S., Top, J., Vuopio-Varkila, J., Willems, R. J., Witte, W. y Woodford, N. (2008). Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveillance* **13** (47), pii 19046.
- Wessels, S. y Ingmer, H. (2013). Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **67** (3), 456-467.
- Wheeler, E., Hong, P., Bedon, L. C. y Mackie, R. I. (2012). Carriage of antibiotic resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. *Journal of Wildlife Diseases* **48** (1), 56-67.
- WHO (2002). World Health Organization. Antimicrobial resistance. Fact sheet N° 194. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Fecha del último acceso: 12/10/2015.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WHO (2009). World Health Organization. Related WHO publications and links on antimicrobial resistance. Disponible en: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/publications/en/index.html. Fecha del último acceso: 12/10/2015.
- WHO (2011). World Health Organization. WHO list of critically important antimicrobials. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Fecha del último acceso: 26/10/2015.
- Williams, G. J. y Stickler, D. J. (2008). Effect of triclosan on the formation of crystalline biofilms by mixed communities of urinary tract pathogens on urinary catheters. *Journal of Medical Microbiology* **57** (9), 1135-1140.
- Winder, C. L., Al-Adham, I. S. I., Abdel Malek, S. M. A., Buultjens, T. E. J., Horrocks A. J. y Collier, P. J. (2000). Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Applied Microbiology* **89** (2), 289-295.
- World Organisation of Animal Health (OIE) (2015). OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Disponible en: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrob_ials_May2015.pdf. Fecha del último acceso: 26/10/2015.
- Wright, G. D. (2010). Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology* **8**, 123.

ANEXO I

PUBLICACIONES



PRIMERA PUBLICACIÓN

Alonso-Calleja, C., Guerrero-Ramos, E., Alonso-Hernando, A. y Capita, R. (2015). Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* **56**, 86-94.



Adaptation and cross-adaptation of *Escherichia coli* ATCC 12806 to several food-grade biocides

Carlos Alonso-Calleja ^a, Emilia Guerrero-Ramos ^b, Alicia Alonso-Hernando ^a, Rosa Capita ^{a,*}

^a Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, Spain

^b Ministry of Health, Regional Government of Castilla y León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 August 2014

Received in revised form

25 February 2015

Accepted 3 March 2015

Available online 19 March 2015

Keywords:

Escherichia coli

Adaptation

Biocides

Efflux pumps

Cell surface hydrophobicity

ABSTRACT

The objective of this paper was to determine whether *Escherichia coli* ATCC 12806 can adapt to growth in increasing concentrations of three biocides commonly used in food processing facilities (trisodium phosphate [TSP], sodium nitrite [SNI] or sodium hypochlorite [SHY]), and whether cross-adaptation occurs. Adaptability over time was estimated by the growth kinetic parameters (modified Gompertz equation): lag phase, maximum growth rate and cell density in the stationary phase. Attempts were made to determine whether efflux pumps (in the presence of the efflux inhibitor carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone [CCCP]) and cell surface hydrophobicity changes (microbial adhesion to solvents [MATS] assay) are associated with this adaptation. After repeated sub-culturing in static broth cultures containing increasing sub-inhibitory concentrations of TSP, SNI or SHY, *E. coli* exhibited an adaptive tolerance, especially to SNI and SHY. The increased tolerance was stable and remained after 7 successive passages in biocide-free growth media. Cross-adaptation between dissimilar biocides (SNI and SHY) was observed. Both efflux pumps and changes in cell surface hydrophobicity appear to be associated with adaptation to SNI and SHY. It is suggested that sub-lethal exposure to food-grade biocides represents a risk for the development of adaptation and cross-adaptation to such compounds.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Biocides are compounds commonly used in the food system as disinfectants (e.g. sodium hypochlorite), food preservatives (e.g. sodium nitrite or trisodium phosphate) or red meat and poultry decontaminants (e.g. trisodium phosphate) to reduce or eliminate both pathogenic and spoilage micro-organisms (Capita & Alonso-Calleja, 2013). The frequent use of biocides in food environments has raised concerns about the potential of target micro-organisms to develop a reduced susceptibility to these compounds as a mechanism of adaptation to environmental conditions. It has become increasingly clear that the efficacy of biocides may be questionable in some circumstances and there is a growing concern over the imprudent use of biocides, which might allow the

exposure of bacteria to sub-lethal concentrations of such compounds (Davidson & Harrison, 2002).

An increase in biocide tolerance is an important public health issue, as it might be expected to contribute to the increased persistence of pathogens in the food chain. Moreover, microbial adaptation responses to one sub-lethal stress can lead to reduced susceptibility to a different stress (cross-protection or cross-adaptation). Numerous stress-induced cross-protection studies have been performed (Chung, Bang, & Drake, 2006), and evidence suggests that a decrease in susceptibility to one biocide can confer cross-resistance to other biocides (Braoudaki & Hilton, 2004; Randall et al., 2007; Thomas, Maillard, Lambert, & Russell, 2000). Microbial strategies for counteracting the effects of antimicrobials include biofilm formation, efflux or enzymatic inactivation of the compound before it reaches its target site, changes in surface permeability, modification or overproduction of the target site, and acquisition of alternative metabolic pathways to those inhibited by the drug (IFT, 2006).

As an adaptation to adverse environments, bacteria can use multi-drug efflux pumps to eliminate and avoid accumulations of

* Corresponding author. Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, Campus de Vegazana, s/n, E-24071 León, Spain. Tel.: +34 987 29 1000x5633; fax: +34 987 44 20 70.

E-mail address: rosa.capita@unileon.es (R. Capita).

chemicals. Efflux pumps, which are an important resistance mechanism, are transport proteins that actively remove the antimicrobials penetrating the cell, reducing their intracellular concentration to below effective levels. Efflux has been described for several antimicrobials (Alanis, 2005). It may be specific to one substance, or may work on a range of dissimilar substances, for example, additives and antibiotics (Potenski, Gandhi, & Matthews, 2003). It has been postulated that efflux pumps working on a range of substances may have been selected by bacteria to avoid the effects of toxic substances present in their natural environment. However, once antimicrobial selective pressure is applied, mutants that overproduce these determinants can be selected, reinforcing their adaptive role in the acquisition of resistance (Alonso, Sánchez, & Martínez, 2001).

In *Escherichia coli*, energy associated with the oxidation of an energy source is conserved as an electrochemical potential difference of hydrogen ions across the cytoplasmic membrane and is termed the proton motive force (PMF). The electrical potential ($\Delta\Psi$) together with the difference in proton concentration between the periplasm and cytoplasm (ΔpH) make up the proton motive force, which is typically maintained at a steady-state value of -150 to -200 mV (Kashket, 1985). PMF is harnessed to drive nutrient transport, ATP synthesis, and other endergonic reactions at the cell membrane. Uncouplers of oxidative phosphorylation, such as carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), are able to transport protons across biological membranes, which usually have extremely low proton conductance (Gage & Neidhardt, 1993). By transporting protons down the electrochemical potential gradient, these agents collapse PMF. Since the bacterial efflux pump is energized by the proton motive force, CCCP, which dissipates the proton gradient, has been widely used to detect the efflux pump (Cho, Oh, Park, & Lee, 2001), and observations of bacterial growth in the presence of CCCP under specific conditions are considered to be a useful way of examining bacterial adaptation to environmental changes.

The bacteria interact with the environment through their surfaces, which are vital to the microorganisms' survival. Thus, a common form of resistance to antimicrobials is due to the structure and composition of bacterial membranes, which can act as barriers to permeability, either naturally or through acquired resistance mechanisms. This barrier limits the amount of an antimicrobial that enters the cell, thus decreasing the effective antimicrobial concentration. Several reports of reduced biocide efficacy following changes in proteins (Winder et al., 2000), fatty acid composition (Moorman et al., 2008), phospholipids (Boeris, Domenech, & Lucchesi, 2007) or lipopolysaccharides (Stickler, 2004) in the bacterial membranes have been published. Recently, it has been shown that changes in membrane fluidity can play an important role in the adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants (Alonso-Hernando, Alonso-Calleja, & Capita, 2010). Such changes can cause alterations in cell surface hydrophobicity (To & Griffiths, 2002). Thus, changes in cell membrane hydrophobicity are believed to be responsible for the non-specific increase in tolerance to biocides (Romanova, Wolffs, Brovko, & Griffiths, 2006).

It has been demonstrated that bacteria, including *E. coli*, are capable of adapting to biocides after prolonged exposure to sub-lethal concentrations (Chung et al., 2006). However, it would appear that no studies have been performed to compare the effects of repeated exposure to sub-inhibitory concentrations of three food-grade biocides (trisodium phosphate, sodium nitrite and sodium hypochlorite) upon the adaptation of *E. coli* to such compounds. Moreover, while the mechanisms of resistance to antibiotics have been widely studied (Wright, 2010), little is known

about mechanisms leading to a lack of susceptibility to non-antibiotic agents.

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) strains, including *E. coli* ATCC 12806, have been associated with foodborne diseases worldwide (Andrade, Girón, Ahmaz, Trabulsi, & Martínez, 2002). This strain has been used to test the antimicrobial effectiveness of various physical (Linton, McClements, & Patterson, 2001) and chemical (Alonso-Hernando, Guevara-Franco, Alonso-Calleja, & Capita, 2013) agents. Moreover, the effect of several biocides on the biofilm formation ability, the resistance to antibiotics and the ultrastructure of *E. coli* ATCC 12806 has been recently studied (Capita, Riesco-Peláez, Alonso-Hernando, & Alonso-Calleja, 2014). However, information about the effect of sublethal concentrations of biocides on the adaptation, the efflux pumps activity and the cell surface characteristics of this strain is lacking. The aim of this research was to determine whether subjecting *E. coli* ATCC 12806 to sub-inhibitory concentrations of trisodium phosphate, sodium nitrite or sodium hypochlorite would result in adaptation and whether this adaptation would produce cross-protection to other biocides. Possible mechanisms of adaptation that involve efflux pumps and cell surface hydrophobicity changes were also examined.

2. Materials and methods

2.1. *E. coli* strain and culture conditions

A culture collection strain (*E. coli* ATCC 12806) was used. The strain was maintained in tryptone soya broth (TSB, Oxoid Ltd., Hampshire, England) supplemented with 20% (v/v) glycerol at -30 °C. Prior to each experiment, frozen cells were subcultured twice in TSB at 37 °C. Working cultures were kept at 4 ± 1 °C on plates of tryptone soya agar (TSA, Oxoid Ltd.) and were renewed monthly.

2.2. Biocides

Three compounds were tested: trisodium phosphate (TSP, Merck, Germany), sodium nitrite (SNI, Sigma-Aldrich, Germany) and sodium hypochlorite (SHY, Sigma-Aldrich, Germany). Solutions were aseptically prepared before each experiment in sterile distilled water.

2.3. Determination of minimum inhibitory concentrations

The Minimum Inhibition Concentration (MIC) values were established using a microdilution broth method in accordance with the National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI, 2008). Five colonies of each organism were taken from TSA plates, inoculated into 10 mL of Mueller-Hinton (MH) broth (Oxoid Ltd.) and incubated at 37 °C. Previous experiments showed that after 24 h of incubation these bacterial cultures contained approximately 10^8 cfu/mL (data not shown). For the experiment, 100-well polystyrene micro-well plates (Oy Growth Curves Ab Ltd., Finland) were used. Wells were filled with 20 µL of the decontaminant solution (a range of concentrations was used) and 180 µL of appropriate dilutions (in MH broth) of inocula in order to give a final concentration in the well of 5×10^5 cfu/mL. The inoculum concentration was confirmed by plating. The microwell plates were incubated at 37 °C in a Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finland). Both positive (200 µL of inoculum at 5×10^5 cfu/mL) and negative (180 µL of MH broth + 20 µL of chemical compound) controls were included in each experiment. Experiments were replicated five times on separate days.

The MIC was established as the lowest biocide concentration necessary to prevent growth after 48 h of incubation. A calibration equation was performed in order to establish a cut-off for bacterial growth. The growth of the strain was determined in two ways for this purpose: by measuring the optical densities (OD) using a wide band filter (band area 420–580 nm; OD_{420–580}) in a Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.), and by enumerating viable cells in plate count agar (PCA, Oxoid Ltd.) in duplicate, using 0.1% (wt/vol) peptone water (Oxoid Ltd.) for decimal dilutions, and counting visible colonies after 48 h of incubation at 37 °C. Blank sample wells with uninoculated broth were included as a control for contamination. Five replications were made on different days. The degree of correlation between optical densities and microbial counts was investigated by linear regression continuous data.

2.4. Exposure to increasing concentrations of biocides

The test was performed in the same manner as described for determining MIC. The decontaminant starting concentration was MIC/2. When growth was observed, 20 µL of the suspension were aseptically transferred to the next well, which contained 160 µL of MH broth and 20 µL of decontaminant solution. After the transfer, each well contained a decontaminant concentration 1.5 times stronger than the previous well. This procedure was continued until no growth was observed after 72 h of incubation at 37 °C. The suspension in the last well with recorded growth was streaked on TSA plates with biocide (one-half of the maximum concentration of biocide that supported microbial growth was added to TSA) and stored (at 4 ± 1 °C) after incubation at 37 °C for 48 h.

2.5. Stability of adapted cultures

The stability of adaptive tolerance was determined for each compound by repeated subculture of *E. coli* in non-selective broth (TSB) without biocides. This procedure was repeated every 24 h for 7 days. After 7 days, the ability of strains to grow in presence of the maximum concentration of biocides that supported microbial growth after adaptation was determined.

2.6. Growth curves

Growth experiments were carried out on micro-well plates. The wells were filled with 180 µL of inocula (final concentration 10⁵ cfu/mL) and 20 µL of the decontaminant solutions at appropriate concentrations in order to give a final concentration in the well of MIC/2. Bacterial growth was monitored before incubation (at hour 0) and every hour until 120 h had elapsed. Growth was determined by measuring the OD_{420–580} in a Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd.). The micro-well plates were shaken for one minute prior to the measurement of turbidity. The experiment was replicated three times on separate days.

The model used to fit growth curves to the data obtained was the modified Gompertz equation (Garthright, 1991): OD_t = A + B * exp(−exp(2.71828183 * µ * (L−t)/B+1)), where t = the time in hours that has elapsed since inoculation, OD_t = Optical Density (determined at 420–580 nm) at time t, L = the lag time when the lag period ends (hours), µ = the maximum growth rate achieved (ΔOD/h), B = the increase in OD_{420–580} since inoculation to stationary phase (E), and A = the upper asymptote curve (concentration of bacteria in the stationary stage, E) − B. Values for L, µ and E were obtained for each strain and replication by fitting a sigmoidal curve to the data set using a Marquardt algorithm that calculated those parameter values which gave the minimum residual sum of squares. The goodness of fit was evaluated using the coefficient of determination (R^2).

2.7. Efflux pump inhibition with CCCP

To determine the activity of efflux pumps, the inhibitor carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP; final concentration 50 µM; Sigma—Aldrich) was used. The growth kinetic parameters of *E. coli* were determined both in the absence and in the presence of CCCP for all the conditions tested (adapted and non-adapted cells in the absence or presence of sub-inhibitory concentrations of biocides). Parent and adapted cells grown in the presence of CCCP without biocides were used to ensure that CCCP had no inhibitory effect.

2.8. Determination of cell surface hydrophobicity

Microbial cell hydrophobicity was determined by the microbial adhesion to solvents (MATS) test based on affinity to non-polar solvents (Rosenberg, Gutnick, & Rosenberg, 1980; To & Griffiths, 2002). Xylene was used as the hydrocarbon phase. Log-phase cells of *E. coli* ATCC 12806 were harvested by centrifugation (5000× g for 10 min), washed twice in sterile phosphate buffer saline (pH = 7.0), and re-suspended in 0.15 M NaCl at a concentration of approximately 10⁸ cfu/mL. The cell suspension (2.4 mL) was vortexed with 0.4 mL of the appropriate solvent for 60 s and was allowed to stand for 15 min at room temperature, which resulted in complete separation of the two phases. An aqueous phase sample (1 mL) was obtained, and the absorbance at 400 nm was determined (Bioscreen C MBR). The percentage of cells present on the solvent was calculated with the following equation: percent affinity = 100 × (1 − (A/A₀)), where A₀ is the absorbance of the original suspension at 400 nm prior to mixing and A is the absorbance of the aqueous phase. Each experiment was performed in triplicate with three independently prepared cultures on separate days. Cell surface hydrophobicity was grouped in three categories from weak (<21%), to moderate (21%–50%) and strong (>50%) (Norouzi, Mansouri, Moradi, & Razavi, 2010).

2.9. Statistical analysis

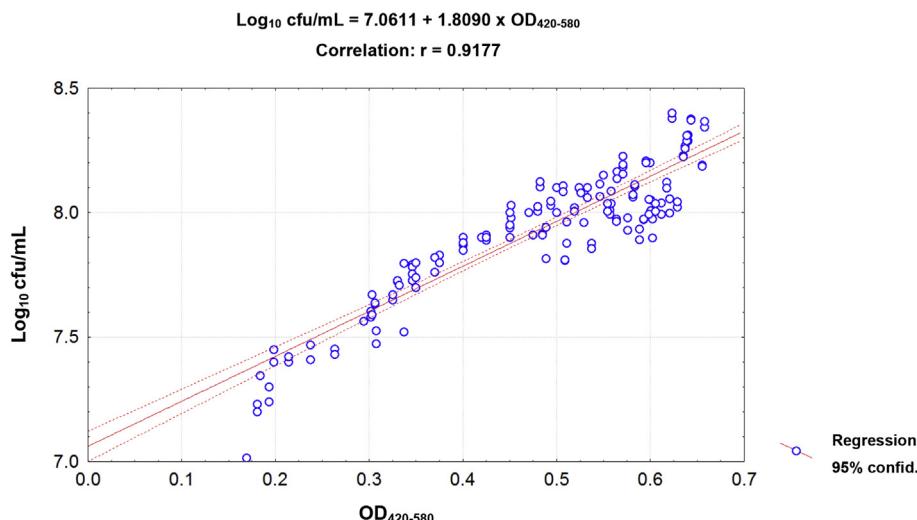
Growth kinetic parameters (L, µ and E) and percentage affinity to xylene were compared for statistical significance using analysis of variance techniques. Mean separations were obtained using Duncan's multiple range test. All data processing was carried out using the Statistica® 8.0 software package (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Significance was determined at the 5% ($P < 0.05$) level.

3. Results

3.1. Adaptation and cross-adaptation

The turbidimetric method (optical densities were measured at the band area of 420–580 nm; OD_{420–580}) gave a linear relationship only in the range of 0.200–0.700 when compared with viable counts (Fig. 1). A correlation of 0.9177 ($R^2 = 0.8421$) was obtained over this range. Thus, an optical density of 0.200 was considered the cut-off for bacterial growth.

The MIC values of biocides for *E. coli* prior to exposure to sub-inhibitory concentrations of biocides were: 10.428 mg/mL (TSP), 14.876 mg/mL (SNI) and 0.239 mg/mL (SHY). After several passages through gradually higher concentrations of biocides, the maximum concentrations of compounds that allowed bacterial growth after 72 h of incubation at 37 °C were 11.731 mg/mL (TSP), 37.655 mg/mL (SNI) and 0.403 mg/mL (SHY). These biocide concentrations were 1.13, 2.53 and 1.69 times the value of the MICs of parent (non-adapted) cells, respectively. The stability of adaptive resistance to the food-grade biocides was determined by sub-culturing cells



Five replications were performed on separate days.

Fig. 1. Relationship between microbial counts (Log_{10} cfu/mL) and optical densities ($\text{OD}_{420-580}$) observed for *Escherichia coli* ATCC 12806.

every 24 h in biocide-free TSB. In the absence of selective pressure, cells adapted to TSP returned to the pre-adaptation sensitivity. When bacterial cultures adapted to SNI or SHY were passed through a biocide-free medium for 7 days, cells were able to grow in the presence of the maximum concentration of biocides that allowed bacterial growth immediately after adaptation. This suggests that in *E. coli* ATCC 12806 adaptive tolerance to SNI and SHY was stable for at least 7 passages.

Including the replicates, a total of 96 growth curves representing different combinations of adaptation to biocides, exposure to biocides and exposure to CCCP were generated and fitted to the modified Gompertz equation. One hundred and twenty-one determinations for optical densities ($\text{OD}_{420-580}$) were taken during the 120 h period for each combination. The kinetic parameters estimated from the fitted Gompertz equation are summarized in Tables 1–3. Fig. 2 shows the comparative growth curves for *E. coli* ATCC 12806 under each condition tested.

The R^2 values for the Gompertz model fit were high (>0.90). Thus, the modified Gompertz equation was regarded as appropriate

for describing *in vitro* bacterial growth ($\text{OD}_{420-580}$) because of the good agreement observed between experimental and predicted values.

The presence of biocides caused growth reduction in parent (non-adapted) cultures of *E. coli*. Thus, the lag phase (L) of non-exposed cells (-6.420 ± 7.860 h) increased ($P < 0.05$) when biocides were added to the culture broths (between -4.510 ± 5.960 and 18.782 ± 15.159 h, depending on the compound used). Moreover, decreases ($P < 0.05$) in the growth rate (μ) and the maximum $\text{OD}_{420-580}$ in the stationary phase (E) of non-adapted cultures were observed in presence of biocides (Tables 2 and 3).

Previous adaptation of *E. coli* caused a slight growth inhibition in the absence of chemicals. Thus, adapted cells showed a higher ($P < 0.005$) lag phase (average values of 0.143 ± 2.453 h), and a lower ($P < 0.05$) growth rate (0.038 ± 0.006 $\Delta\text{DO}/\text{h}$) than non-adapted cells (-6.420 ± 7.860 h and 0.068 ± 0.039 $\Delta\text{DO}/\text{h}$, respectively) in biocide-free media. Previous adaptation of *E. coli* to SNI or SHY stimulated microbial growth in the presence of biocides. Cells adapted to SNI showed lower L values (2.910 ± 0.571 h) and

Table 1

Lag phase (L; hours) of *Escherichia coli* ATCC 12806 adapted and/or exposed to different compounds.

Culture exposed to ^b :	Culture previously adapted to ^a :				
	NC	TSP	SNI	SHY	
NC	without CCCP	-6.420 ± 7.860 Aa	-1.946 ± 0.367 ABA	0.851 ± 2.386 ABA	2.730 ± 0.775 Ba
	with CCCP	-1.342 ± 1.499 Aa	-1.152 ± 3.382 Aa	-2.237 ± 7.325 Aa	-2.732 ± 6.656 Aab
TSP	without CCCP	-4.510 ± 5.960 Aa	-0.241 ± 6.175 ABA	2.896 ± 0.034 ABA	4.970 ± 1.824 Ba
	with CCCP	8.556 ± 1.165 Aa*	0.158 ± 0.081 Aa	-6.859 ± 9.844 Aa	-47.394 ± 58.725 Aa
SNI	without CCCP	18.782 ± 15.159 Ab	15.998 ± 12.691 Ab	2.910 ± 0.571 Ba	25.718 ± 4.607 Ab
	with CCCP	27.493 ± 18.281 Ab	—	16.097 ± 1.365 ACb***	39.605 ± 3.649 Bb*
SHY	without CCCP	16.446 ± 16.935 ABb	20.874 ± 4.289 Ab	17.981 ± 0.572 Ab	-0.662 ± 2.534 Ba
	with CCCP	-0.764 ± 6.605 Aa	—	0.126 ± 0.005 Aa*	10.741 ± 7.253 Ab*

Data (mean \pm STD) are the average of three replications performed on separate days.

—, no growth. NC, no compound; TSP, trisodium phosphate; SNI, sodium nitrite; SHY, sodium hypochlorite; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (50 μM were added to growth media).

Means in the same row with no upper-case letters in common are significantly different ($P < 0.05$). Means in the same column relating to the same CCCP condition (different compounds are compared) with no lower-case letters in common are significantly different ($P < 0.05$). Differences between means in the same column for each compound (the presence and the absence of CCCP are compared) are established by aesthetics: *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

^a For adaptation, cultures were previously exposed to sub-inhibitory increasing concentrations of biocides.

^b Cultures were grown (and growth kinetic parameters determined) in the presence of biocides (concentration MIC/2).

Table 2

Maximum growth rate (μ ; increase of optical density per hour) of *Escherichia coli* ATCC 12806 adapted and/or exposed to different compounds.

Culture exposed to ² :		Culture previously adapted to ¹ :			
		NC	TSP	SNI	SHY
NC	without CCCP	0.068 ± 0.039Aa	0.039 ± 0.003Aa	0.043 ± 0.005Aab	0.035 ± 0.009Aa
	with CCCP	0.041 ± 0.004Aa	0.034 ± 0.010Aa	0.043 ± 0.035Aa	0.055 ± 0.029Aa
TSP	without CCCP	0.047 ± 0.032ABab	0.049 ± 0.022ABA	0.085 ± 0.001Aa	0.024 ± 0.004Bb
	with CCCP	0.009 ± 0.001Ab	0.022 ± 0.041Aa	0.004 ± 0.002Aa***	0.004 ± 0.002Ab***
SNI	without CCCP	0.006 ± 0.001Ab	0.009 ± 0.004Ab	0.044 ± 0.001Bab	0.020 ± 0.001Ab
	with CCCP	0.009 ± 0.005Ab	—	0.006 ± 0.001Aa*	0.011 ± 0.001Ab***
SHY	without CCCP	0.012 ± 0.004ABb	0.009 ± 0.002Ab	0.014 ± 0.001ABb	0.018 ± 0.004Bb
	with CCCP	0.005 ± 0.003ABb*	—	0.002 ± 0.001Aa*	0.007 ± 0.002Bb**

For interpretation see Table 1.

Table 3

Maximum optical densities (OD) at stationary phase (E; OD_{420–580}) of *Escherichia coli* ATCC 12806 adapted and/or exposed to different compounds.

Culture exposed to ² :		Culture previously adapted to ¹ :			
		NC	TSP	SNI	SHY
NC	without CCCP	0.627 ± 0.052Aa	0.598 ± 0.039Aa	0.503 ± 0.049Ba	0.609 ± 0.028Aa
	with CCCP	0.563 ± 0.079Aa	0.486 ± 0.102Aa	0.423 ± 0.055Aa	0.543 ± 0.108Aa
TSP	without CCCP	0.466 ± 0.022Ab	0.429 ± 0.041Ab	0.331 ± 0.010Bb	0.377 ± 0.016Bb
	with CCCP	0.377 ± 0.033Ab*	0.234 ± 0.051Bb**	0.192 ± 0.028Bb*	0.267 ± 0.034Bb*
NSI	without CCCP	0.383 ± 0.037Ac	0.343 ± 0.011Ac	0.444 ± 0.085ABab	0.498 ± 0.094Bb
	with CCCP	0.228 ± 0.020Ac***	—	0.199 ± 0.017Ab*	0.228 ± 0.028Ab**
SHY	without CCCP	0.477 ± 0.044Ab	0.438 ± 0.022Ab	0.590 ± 0.014Ba	0.554 ± 0.024Ba
	with CCCP	0.308 ± 0.071Abc**	—	0.274 ± 0.001Ab**	0.319 ± 0.023Ab***

For interpretation see Table 1.

higher μ values ($0.044 \pm 0.002 \Delta\text{DO}/\text{h}$) than non-adapted cells ($18.782 \pm 15.159 \text{ h}$ and $0.006 \pm 0.001 \Delta\text{DO}/\text{h}$, respectively) in broth with SNI. Similarly, cells adapted to SHY showed the lowest L ($-0.662 \pm 2.534 \text{ h}$) and the highest μ ($0.018 \pm 0.004 \Delta\text{DO}/\text{h}$) in presence of SHY. On the other hand, adaptation to TSP did not modify the growth kinetic parameters of *E. coli* relative to non-adapted cultures.

SNI and SHY were observed to cause cross-adaptation in *E. coli* cultures. The highest growth rate and the maximum OD_{420–580} at stationary phase in presence of such compounds were found for both SNI- and SHY-adapted strains.

3.2. Modifications of efflux pumps activity and cell surface hydrophobicity after adaptation

The growth kinetic parameters for *E. coli* in presence of CCCP are shown in Tables 1–3 Fig. 2 shows the comparative growth curves in presence and absence of CCCP. A similar behavior was observed for *E. coli* cells growth in the presence or in the absence of CCCP in biocide-free media. In culture broth with biocides, substantial differences in the growth kinetics of *E. coli* between media with CCCP and media without CCCP were observed. In presence of TSP, the lag period of non-adapted cells became longer in media with CCCP than in media without CCCP. A marked influence of the addition of CCCP was observed for cells adapted to SNI or SHY and growth in presence of such compounds, where the lag phase increased and the maximum growth rate decreased in the presence of CCCP. When TSP, SNI or SHY were added to culture broths, the concentration of bacteria at the stationary phase in the presence of the efflux pump inhibitor reached lower values than it did in the absence of CCCP. The effect of the efflux pump inhibitor was marked in cells adapted to TSP and exposed to SNI or SHY, where CCCP inhibited cell growth completely.

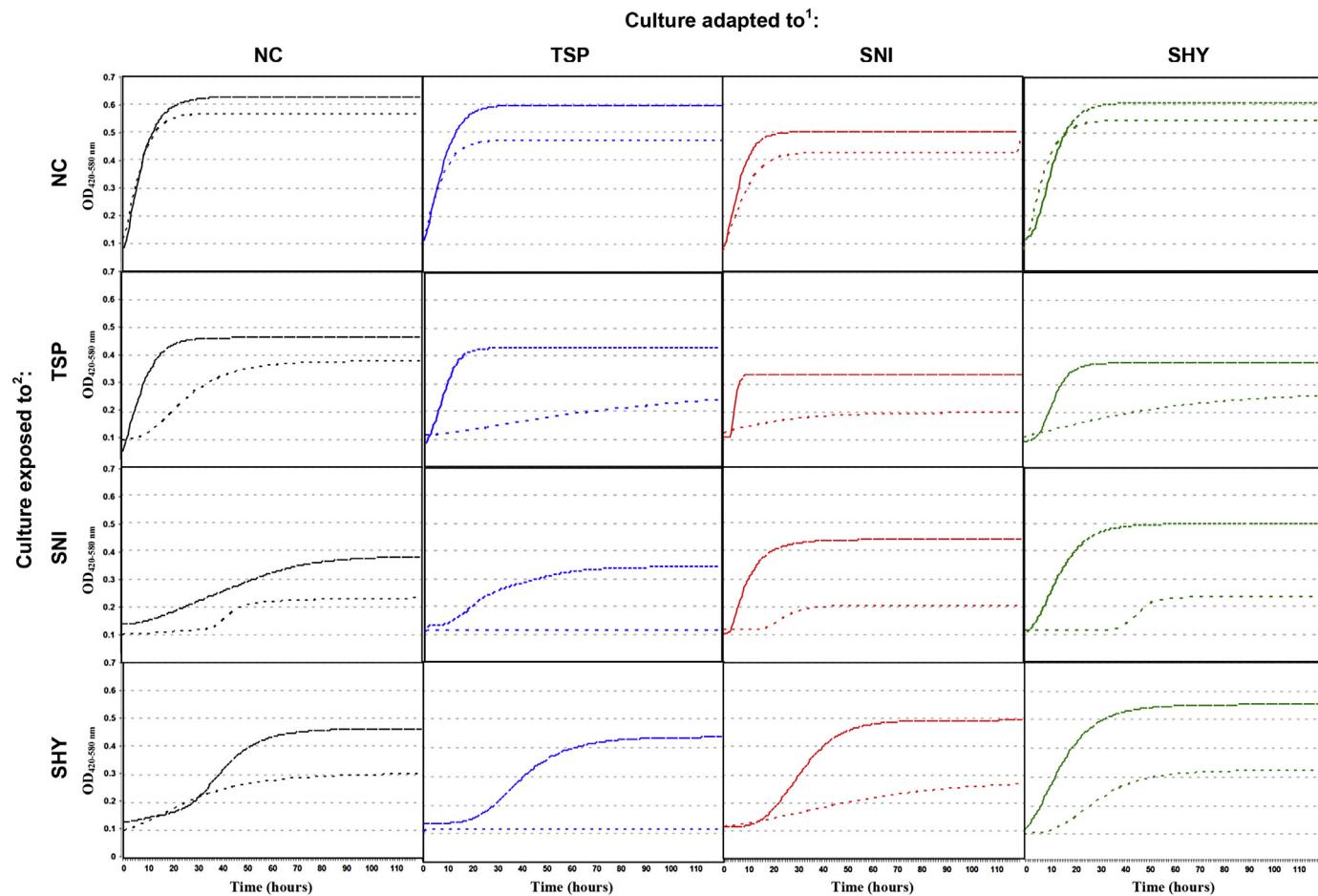
Important differences in hydrophobicity (percentage affinity to xylene ranging from $4.48 \pm 0.31\%$ to $65.32 \pm 3.39\%$) were found between cells depending of the conditions tested (Table 4). Weak (<20%), moderate (21%–50%) or strong (>50%) reactions were observed for 6 (37.5%), 4 (25.0%) and 6 (37.5%) conditions, respectively. The highest values for cell surface hydrophobicity (reflected by a higher percentage of cells moving to the hydrophobic phase of the MATS assay) were shown by cells adapted and/or exposed to SNI, followed by SHY. On the other hand, the lowest figures were observed for cultures adapted and/or exposed to TSP.

4. Discussion

4.1. Adaptation and cross-adaptation

In this paper, one of the first comprehensive investigations of the effect of adaptation of *E. coli* to a variety of food-grade biocides using a long-term culture approach is presented. Trisodium phosphate, sodium nitrite and sodium hypochlorite are biocides commonly used in the Food Industry (Capita & Alonso-Calleja, 2013).

The good agreement ($r = 0.9177$) observed between optical density and viable counts is indicative of a useful relationship. The turbidimetric method gave a linear relationship only in the range of 7.3–8.3 log₁₀ cfu/mL when compared with viable counts. Thus, data from 7.3 to 8.3 log₁₀ cfu/mL were included in the calibration curve, with a maximum limit of 30 h of incubation. These results concur with other studies which showed this method to be able to detect cell concentrations of approximately 10^7 cells/mL (Dalgard, Ross, Kamperman, Neumeyer, & McMeekin, 1994; Díez-García, Capita, & Alonso-Calleja, 2012). On the other hand, after 30 h of incubation, data were no longer linear and they were discarded. This is because towards the end of the exponential phase of growth, cell



¹, for adaptation, cultures were previously exposed to sub-inhibitory increasing concentrations of biocides; ², exposed cultures were grown in the presence of biocides (concentration MIC/2).

NC, no compound; TSP, trisodium phosphate; SNI, sodium nitrite; SHY, sodium hypochlorite; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone.

Solid line, growth in the absence of CCCP; Dashed line, growth in the presence of CCCP (50 μM were added to growth media).

Fig. 2. Comparative growth curves ($n = 3$) for *Escherichia coli* ATCC 12806 tested under differing conditions.

death occurs, with a subsequent decrease in viable counts. However, turbidimetric measurement determines both viable and non-viable cells, and consequently no reductions in optical density are observed as a consequence of cell death.

Results in the present study show the ability of *E. coli* to grow in culture broth in the presence of increasing sub-inhibitory concentrations of biocides. These results are in agreement with previous research, where adaptation of *E. coli* to both chemical and physical

Table 4

Hydrophobicity (percentage of affinity to xylene) results for parent and adapted strains in the absence or the presence of sub-inhibitory concentrations of biocides.

Culture exposed to ^b :	Culture previously adapted to ^a :			
	NC	TSP	SNI	SHY
NC	16.11 ± 1.60Aa	4.48 ± 0.31Ba	66.15 ± 2.42Ca	20.14 ± 2.18Da
TSP	6.31 ± 0.37Ab	6.20 ± 0.55Aa	26.50 ± 3.71Bb	17.89 ± 2.99Ca
SNI	64.53 ± 3.80Ac	65.32 ± 3.59Ab	65.32 ± 3.59Aa	61.99 ± 4.25Ab
SHY	24.82 ± 6.95Ad	17.89 ± 2.99Ac	60.95 ± 2.57Ba	39.50 ± 2.21Cc

Data (mean ± STD) are the average of three replications performed on separate days.

NC, no compound; TSP, trisodium phosphate; SNI, sodium nitrite; SHY, sodium hypochlorite.

Means in the same row with no upper-case letters in common are significantly different ($P < 0.05$). Means in the same column with no lower-case letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

^a For adaptation, cultures were previously exposed to sub-inhibitory increasing concentrations of biocides.

^b Cultures were grown (and growth kinetic parameters determined) in the presence of biocides (concentration MIC/2).

sub-lethal stresses has been previously demonstrated (Braoudaki & Hilton, 2004; Chung et al., 2006). The fact that *E. coli* becomes tolerant to SNI and SHY is of particular concern because these are common biocides, which are often used at sub-inhibitory concentrations. Sub-inhibitory concentrations of biocides could occur as consequence of improper use (erroneous concentration or inadequate distribution), inappropriate storage of the formulations, excessive amounts of organic matter (known to inactivate several biocides) or the use of preservation treatments at low intensities, leading to a "hurdle effect" (Capita & Alonso-Calleja, 2013). It appears possible that food-processing facilities may provide a selective environment for adaptive tolerance to biocides, which may eventually lead to an undesirable situation in which there are resident strains resistant to biocides.

The adaptive resistance of *E. coli* to TSP was lost after seven days of passage of the adapted cells in a biocide-free medium. In the case of cells adapted to SNI or SHY, the reduced sensitivity persisted up to seven generations in the absence of the biocide. Thus, we conclude that adaptive resistance to SNI or SHY was stable. It would appear that the current work is the first to determine the stability of adaptive resistance of *E. coli* to TSP, SNI or SHY. However, the results obtained here support the observations with other microbial groups and chemical compounds (Jones, Herd, & Christie, 1989; To & Griffiths, 2002). Loughlin, Jones, and Lambert (2002) demonstrated that resistance to benzalkonium chloride was acquired when *Pseudomonas aeruginosa* strains were tested for 30 days and was retained in the absence of the disinfectant. Similar findings were reported for Braoudaki and Hilton (2004) when testing the effect of benzalkonium chloride, chlorhexidine and triclosan on the adaptation of *S. enterica* and *E. coli*.

The stability of adaptation after 7 passages in TSB without biocides suggests a chromosomal mutation (Malek & Badran, 2010). Lambert (1992) states that this acquired resistance to antimicrobial agents is due to the emergence of a resistant cell with genetic modifications among a sensitive population. These modifications are sometimes spontaneously reversible when the antimicrobial agent is not present. The consequence of these genetic modifications is a biochemical modification of the strain, mostly in the composition and structure of the outer membrane, which prevents fixation or penetration of the antimicrobial agent (Russell, 1991). However, adaptation and acquired resistance can also be phenotypic, being a consequence of metabolic regulations induced by the presence of biocide (Jones et al., 1989). The experiments reported here were insufficient to discriminate between these hypotheses.

The presence of biocides caused growth inhibition (increase in lag phase and decrease of growth rate) of parent (non-adapted) strains of *E. coli*, marked for SNI, confirming that the biocides tested are effective antibacterial agents. These data are not in agreement with previous reports, where nitrite was not generally considered to be effective for controlling Gram-negative enteric pathogens such as *E. coli* or *Salmonella* (Tompkin, 2005).

Adaptation of the bacteria to the biocides was accompanied by a reduction in the growth rate, observed in the absence of biocides, which is known to accompany adaptation processes (Gilbert & MacBain, 2003). These results suggest that the mechanism of adaptation to the biocides is too damaging to other aspects of bacterial metabolism for the cells to grow fast, as previously reported by other authors (Loughlin et al., 2002).

Adaptation of *E. coli* to SNI or SHY stimulates bacterial growth, relative to non-adapted or TSP-adapted cultures, in presence of SNI or SHY. This finding shows that previous adaptation to SNI and SHY increases the tolerance of *E. coli* to such compounds. In this way, it is important to state here that *E. coli* strains with decreased susceptibility to biocides may survive a non-optimal cleaning regime or

biocide challenge for a longer period, increasing the possibilities for contamination.

The results of tolerance studies showed that adaptation of *E. coli* to SNI increased its tolerance to SHY and vice versa, as suggested by the growth kinetic parameters studied. Other authors have also found that adapted cells were less sensitive to dissimilar compounds, with completely different modes of action, as is the case of quaternary ammonium compounds and trisodium phosphate, chlorine or phenol (Langsrud & Sundheim, 1997; To & Griffiths, 2002). It has been suggested that the possible linkage between tolerances to different biocides might be due to common mechanisms (Suller & Russell, 2000). However, this hypothesis is far from being conclusively proved. It is to be expected that non-specific means (e.g. active efflux pumps or a reduction in cell permeability, which does not allow chemically unrelated molecules into the resistant cells) would be responsible for tolerance to these dissimilar compounds (Braoudaki & Hilton, 2004; Capita & Alonso-Calleja, 2013).

4.2. Modifications of efflux pumps activity and cell surface hydrophobicity after adaptation

To illustrate the potential role of efflux pumps in adaptation of *E. coli* to three biocides widely used in the Food Industry, the growth of parent and adapted cells was examined in the presence of CCCP, a well-established potent inhibitor of efflux pumps. Previous studies had already indicated that efflux pumps were involved in resistance or adaptation of *E. coli* to certain antimicrobials. However, it would appear that TSP, SNI and SHY had not previously been tested for this purpose.

Observations of growth in the presence of CCCP under specific conditions have proved to be a useful way of examining bacterial adaptation to environmental changes. Bacterial efflux pumps are energized by the proton motive force. This is the reason why CCCP, an inhibitor of proton motive force, is widely used to study bacterial efflux pumps. In the present study, CCCP did not decrease bacterial growth in TSB without biocides. This finding demonstrates that, at the concentration used (50 µM), CCCP had no inhibitory effect against *E. coli* ATCC 12806. It has been reported that concentration of CCCP should be optimized to detect efflux systems in *E. coli*, because high concentrations of CCCP must have a harmful effect on cells, since they can collapse the proton gradient (Cho et al., 2001). The collapse of the proton gradient has detrimental effects on bacterial cells, including declines in the rate of proton-coupled ATP synthesis, inability to regulate cytoplasmic pH values, and inhibition of nutrient transport (Gage & Neidhardt, 1993).

Non-adapted and non-exposed cells showed minimal differences in growth kinetics in the presence and in the absence of CCCP. On the other hand, the effect of CCCP on *E. coli* cells adapted and exposed to sub-lethal concentrations of biocides was strong. These results suggest that efflux pumps could play a role in the adaptation of *E. coli* to food-grade biocides. However, the potential genes involved should be studied in order to confirm these findings. Previous studies have also shown that an increase in tolerance to biocides is related to the induction of an active efflux mechanism (To & Griffiths, 2002).

This energy-linked efflux system is not substrate-specific and can be initiated by several chemicals, indicating that different biocides could be substrates for the same efflux system. D'Arezzo, Lanini, Puro, Ippolito, and Visca (2012) reported that biocides may induce the expression of multidrug efflux systems that are relatively non-specific in substrate recognition and enable bacteria to pump out numerous chemically unrelated substances, such as antibiotics and biocides.

As an adaptive response, bacterial cell surfaces may undergo chemical changes to repel water-soluble compounds (e.g. TSP, SNI or SHY). These changes may result in a change in cell surface hydrophobicity. Such changes have been shown to occur in several bacterial species with various chemical compounds, but no studies have been carried out with *E. coli* and TSP, SNI or SHY. In order to examine whether changes in the cell surface characteristics of *E. coli* are associated with adaptation to TSP, SNI or SHY, the microbial adhesion to solvents (MATS) test was conducted with cells before and after adaptation and exposure to sub-inhibitory concentrations of biocides.

In the present research, cells from alkaline challenged cultures (with MIC/2 TSP; pH = 8.78), both adapted and non-adapted, had lower MATS scores than cells from control (pH = 7.35) cultures and than cultures exposed to MIC/2 of SNI (pH = 7.28) or SHY (pH = 7.37). Similar findings have been reported for *L. monocytogenes* by Giotis, Blair, and McDowell (2009), who suggested that exposure to alkaline conditions reduced the MATS values, because high pH values are associated with the solubilization of bacterial surface proteins, resulting in the exposure of hydrophobic sites of adjacent lipids to the extracellular environment. Alkalines may also directly attack the structure of the cell membrane by saponification of membrane lipids or by altering the ratios of membrane fatty acids.

In the work presented here, the contact (adaptation and/or exposure) to SNI or SHY increased the cell surface hydrophobicity of *E. coli*. An explanation could be related to a reduction in the charged (hydrophilic) binding sites for the positive sites of the biocides (Loughlin et al., 2002). This may also explain the increase in the tolerance to SNI and SHY in adapted cells, relative to those not adapted. As *E. coli* cells become more adapted to biocides they "lose" or mask their binding sites for the compounds. These binding sites are charged and so detract from the hydrophobicity of the cells, hence as they are lost or masked the cells increase in hydrophobicity. Thus, results in this study suggest that a change in cell surface hydrophobicity appears to be involved in the adaptation response of *E. coli* to SNI and SHY. Additional studies should be performed in order to determine whether bacterial adaptation is a consequence of cell surface changes or these are unrelated phenomena. On the other hand, we noted that contact with TSP led to significant reductions in cell surface hydrophobicity of *E. coli* cells.

5. Conclusions

This study provides, for the first time, biological evidence to confirm that previous exposure to sub-lethal concentrations of SNI or SHY contributes to biocide adaptation in *E. coli*. The results suggest that adaptation of *E. coli* to both food-grade biocides could be at least partially caused by efflux pumps and changes in cell surface hydrophobicity. However, additional research is needed in order to confirm these findings. These mechanisms of adaptation should be investigated in order to develop strategies for preventing or reducing such adaptations. We concluded that inappropriate use in food environments of food-grade biocides may provide sub-lethal exposure, which represents a real risk for the development of adaptation and cross-adaptation to a range of antimicrobial agents. The underlying hazards associated with prolonged exposure to a low concentration of a single disinfectant should be a focal point in industrial sanitation. Caution must therefore be exercised when sub-lethal concentrations of food preservatives are used, especially in view of the hurdle concept, which holds that many inhibitory factors can be highly efficient at sub-lethal levels when used in combination.

Acknowledgments

We acknowledge the financial contribution of the Ministerio de Economía y Competitividad (Project AGL2011-29645) and the Junta de Castilla y León (Project LE013A10-2).

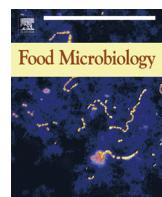
References

- Alanis, A. J. (2005). Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Archives of Medical Research*, 36(6), 697–705.
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2010). Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 130–136.
- Alonso-Hernando, A., Guevara-Franco, J. A., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2013). 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.
- Alonso, A., Sánchez, P., & Martínez, J. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology*, 3(1), 1–9.
- Andrade, A., Girón, J. A., Ahmaz, J. M. K., Trabulsi, L. R., & Martínez, M. B. (2002). Expression and characterization of flagella in nonmotile enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from diarrhea cases. *Infection and Immunity*, 70(10), 5882–5886.
- Boeris, P. S., Domenech, C. E., & Lucchesi, G. I. (2007). Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetracycltrimethylammonium. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 1048–1054.
- Braoudaki, M., & Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 73–78.
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria. A challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11–48.
- Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A., & Alonso-Calleja, C. (2014). Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1268–1280.
- Cho, H., Oh, Y., Park, S., & Lee, Y. (2001). Concentration of CCCP should be optimized to detect the efflux system in quinolone-susceptible *Escherichia coli*. *The Journal of Microbiology*, 39(1), 62–66.
- Chung, H. J., Bang, W., & Drake, M. A. (2006). Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 52–64.
- CLSI. (2008). *Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A3*. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- D'Arezzo, S., Lanini, S., Puro, V., Ippolito, G., & Visca, P. (2012). High-level tolerance to triclosan may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation. *BMC Research Notes*, 5, 43.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., & McMeekin, T. A. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 391–404.
- Davidson, P. M., & Harrison, M. A. (2002). Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers, and other process controls. *Food Technology*, 56(11), 69–78.
- Díez-García, M., Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31(2), 173–180.
- Gage, D. J., & Neidhardt, C. (1993). Adaptation of *Escherichia coli* to the uncoupler of oxidative phosphorylation 2, 4-dinitrophenol. *Journal of Bacteriology*, 175(21), 7105–7108.
- Garthright, W. E. (1991). Refinements in the prediction of microbial growth curves. *Food Microbiology*, 8(3), 239–248.
- Gilbert, P., & MacBain, A. J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 189–208.
- Giotis, E. S., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2009). Effects of short-term alkaline adaptation on surface properties of *Listeria monocytogenes* 10403S. *The Open Food Science Journal*, 3, 62–65.
- IFT (Institute of Food Technologists). (2006). Antimicrobial resistance: Implications for the food system. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 71–137.
- Jones, M. V., Herd, T. M., & Christie, H. J. (1989). Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios*, 58(234), 49–61.
- Kashket, E. R. (1985). The proton motive force in bacteria: a critical assessment of methods. *Annual Reviews in Microbiology*, 39, 219–242.
- Lambert, P. A. (1992). Resistance to non-antibiotic antimicrobial agents. In W. B. Hugo, & A. D. Russell (Eds.), *Pharmaceutical microbiology* (pp. 295–304). Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Langsrød, S., & Sundheim, G. (1997). Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *Journal of Applied Microbiology*, 82(6), 705–712.

- Linton, M., McClements, J. M. J., & Patterson, M. F. (2001). Inactivation of pathogenic *Escherichia coli* in skinned milk using high hydrostatic pressure. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2(2), 99–104.
- Loughlin, M. F., Jones, M. V., & Lambert, P. A. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but not to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 631–639.
- Malek, S. M. A., & Badran, Y. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adapted to 2-phenoxyethanol shows cross-resistance to dissimilar biocides and increased susceptibility to antibiotics. *Folia Microbiologica*, 66(6), 588–592.
- Moorman, M. A., Thelemann, C. A., Zhou, S., Pestka, J. J., Linz, J. E., & Ryser, E. T. (2008). Altered hydrophobicity and membrane composition in stress-adapted *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 71(1), 182–185.
- Norouzi, F., Mansouri, S., Moradi, M., & Razavi, M. (2010). Comparison of cell surface hydrophobicity and biofilm formation among ESBL- and non-ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *African Journal of Microbiology*, 4(11), 1143–1147.
- Potenski, C. J., Gandhi, M., & Matthews, K. R. (2003). Exposure of *Salmonella Enteritidis* to chlorine or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 220(2), 181–186.
- Randall, L. P., Cooles, S. W., Coldham, N. G., Penuela, E. G., Mott, A. C., Woodward, M. J., et al. (2007). Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(6), 1273–1280.
- Romanova, N. A., Wolffs, P. F. G., Brovko, L. Y., & Griffiths, M. W. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3498–3503.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9(1), 29–33.
- Russell, A. D. (1991). Principles of antimicrobial activity and resistance. In S. S. Block (Ed.), *Disinfection, sterilization and preservation* (pp. 29–58). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Stickler, D. J. (2004). Intrinsic resistance of Gram-negative bacteria. In A. P. Fraise, P. A. Lambert, & J.-Y. Maillard (Eds.), *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization* (4th ed.). (pp. 154–168). Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Suller, M. T. E., & Russell, A. D. (2000). Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(1), 11–18.
- Thomas, L., Maillard, J.-Y., Lambert, R. J. W., & Russell, A. D. (2000). Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *Journal of Hospital Infection*, 46(4), 297–303.
- To, M. S., & Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5258–5264.
- Tompkin, R. B. (2005). Nitrite. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), *Antimicrobials in food* (3rd ed.). (pp. 169–236). Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Winder, C. L., Al-Adham, I. S. I., Abdel Malek, S. M. A., Buultjens, T. E. J., Horrocks, A. J., & Collier, P. J. (2000). Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), 289–295.
- Wright, G. D. (2010). Q&A: antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*, 8, 123.

SEGUNDA PUBLICACIÓN

Guerrero-Ramos, E., Cordero, J., Molina-González, D., Poeta, P., Igrejas, G., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2016). Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiology* **53**, 156-164.



Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain



Emilia Guerrero-Ramos ^a, Jorge Cordero ^b, Diana Molina-González ^c, Patrícia Poeta ^{d, e},
Gilberto Igrejas ^{f, g}, Carlos Alonso-Calleja ^{b, c}, Rosa Capita ^{b, c, *}

^a Ministry of Health, Regional Government of Castilla y León, E-47071, Valladolid, Spain

^b Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071, León, Spain

^c Institute of Food Science and Technology, University of León, E-24007, León, Spain

^d Department of Veterinary Science, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-911, Vila Real, Portugal

^e Centre for Animal and Veterinary Science, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-911, Vila Real, Portugal

^f Department of Genetics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-911, Vila Real, Portugal

^g Institute for Biotechnology and Bioengineering, Centre for Genomics and Biotechnology, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-911, Vila Real, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 March 2015

Received in revised form

3 August 2015

Accepted 10 September 2015

Available online 11 September 2015

Keywords:

Game meat

Enterococcus

Antibiotic resistance genes

Virulence genes

Spain

ABSTRACT

A total of 55 enterococci (45 *Enterococcus faecium*, 7 *Enterococcus faecalis*, and three *Enterococcus durans*) isolated from the meat of wild game animals (roe deer, boar, rabbit, pheasant, and pigeon) in North-Western Spain were tested for susceptibility to 14 antimicrobials by the disc diffusion method. All strains showed a multi-resistant phenotype (resistance to between three and 10 antimicrobials). The strains exhibited high percentages of resistance to erythromycin (89.1%), tetracycline (67.3%), ciprofloxacin (92.7%), nitrofurantoin (67.3%), and quinupristin-dalfopristin (81.8%). The lowest values (9.1%) were observed for high-level resistance to gentamicin, kanamycin, and streptomycin. The average number of resistances per strain was 5.8 for *E. faecium* isolates, 7.9 for *E. faecalis*, and 5.7 for *E. durans*. Genes encoding antimicrobial resistance and virulence were studied by polymerase chain reaction. A total of 15 (57.7%) of the 26 vancomycin-resistant isolates harboured the *vanA* gene. Other resistance genes detected included *vanB*, *erm(B)* and/or *erm(C)*, *tet(L)* and/or *tet(M)*, *acc(6')-aph(2')*, and *aph(3')-IIIa* in strains resistant to vancomycin, erythromycin, tetracycline, gentamicin, and kanamycin, respectively. Specific genes of the Tn5397 transposon were detected in 54.8% of the *tet(M)*-positive enterococci. Nine virulence factors (*gelE*, *agg*, *ace*, *cpd*, *frs*, *esp*, *hyl*, *efAfs* and *efAfm*) were studied. All virulence genes, with the exception of the *frs* gene, were found to be present in the enterococcal isolates. At least one virulence gene was detected in 20.0% of *E. faecium*, 71.4% of *E. faecalis* and 33.3% of *E. durans* isolates, with *ace* and *cpd* being the most frequently detected genes (6 isolates each). This suggests that wild game meat might play a role in the spreading through the food chain of enterococci with antimicrobial resistance and virulence determinants to humans.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Enterococci are Gram-positive bacteria of the gastrointestinal tract of humans and most animals (Aarestrup et al., 2000). Although enterococcal species are generally considered to be of low

pathogenic potential, they have emerged as important causes of nosocomial- and community-acquired infections because of the capacity of these bacteria to acquire virulence traits (Silva et al., 2011).

Enterococci are intrinsically resistant to many antimicrobial agents, and have the ability to transfer antibiotic resistance to others via mobile genetic elements (such as plasmids or transposons), or through chromosomal exchange or mutations, posing a challenge in the treatment of infectious diseases (Hegstad et al., 2010). The problem of antimicrobial resistance in enterococci is not restricted to clinical settings alone, but also affects other

* Corresponding author. Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, Campus de Vegazana, s/n, E-24071, León, Spain.

E-mail address: rosa.capita@unileon.es (R. Capita).

environments. *Enterococcus* spp. have developed highly efficient mechanisms for the acquisition and distribution of antibiotic resistance genes. Thus, a high frequency of exchange between unrelated species (including the transfer of resistance genes to virulent strains) is to be expected in the habitats of these bacteria (for instance in the gastrointestinal tract or sewage water). In this way, *Enterococcus* spp., which have been recognized as reservoirs of antimicrobial resistance genes (Aarestrup et al., 2000), are considered important indicators of antibiotic resistance that may be used to track the evolution of antibiotic resistance in different environments (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

Over the past decade, considerable concern has arisen in respect of the increase in antimicrobial resistance among commensal bacteria, including *Enterococcus* spp., in wild animal populations (Santos et al., 2013). Wild animals are of importance to antibiotic resistance in several different ways. Firstly, enterococci strains are sentinels of both livestock and human densities and its impact on the environment. Several human activities (e.g. farms, human and veterinary clinical settings, landfills, or waste-water treatment facilities) may bring about interactions with wildlife, which may have a direct association with the antibiotic resistance profiles of the intestinal bacteria of wild animals in a certain geographic location (Santos et al., 2013). Secondly, wild animals can be a reservoir of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes, with the potential for long-distance dissemination throughout the environment. Lastly, wild animal populations are a possible source of antibiotic-resistant bacteria that may colonize or infect livestock and humans (Allen et al., 2010; Santos et al., 2013). In such a scenario, contact with species of game hunted for their meat which transfer multidrug-resistant enterococci to humans provides a biological mechanism for the increase in antibiotic resistance genes in human populations (Allen et al., 2010). The main concerns with wild game meat, in this context, are the possibility of the bacteria surviving as a consequence of insufficient processing and the potential for cross-contamination to other foods.

Studies of antimicrobial resistance and virulence traits in game animals or game meat have been performed in different countries (Literak et al., 2010; Poeta et al., 2007; Radhouani et al., 2014; Silva et al., 2011; Vargas et al., 2013). Nevertheless, this type of study has been very limited in Spain (Navarro-Gonzalez et al., 2013) and it would appear that no research of this sort has so far been performed in North-Western Spain. The objectives of this study were to determine the prevalence of resistance in *Enterococcus* spp. isolated from game meat in North-Western Spain, and to analyse their content of resistance and virulence genes.

2. Materials and methods

2.1. Samples and strains

Enterococcal isolates were recovered from 55 samples of meat obtained from wild game. These were roe deer (*Capreolus capreolus*; 35 samples), wild boar (*Sus scrofa*; 14 samples), wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*; two samples), pheasant (*Phasianus colchicus*; two samples) and wild pigeon (*Columba palumbus*; two samples) which had been hunted in the autonomous regions of *Castilla y León* and *Galicia* in the North-West of Spain.

The skinless animal legs were used for sampling. Each sample was prepared by excising a piece of 5 cm² in area and approximately 3 mm in thickness from the surface of the meat with a sterile knife blade and a template. The exact surface location for sampling was selected at random. The samples were placed in a sterile stomach bag containing 45 mL of sterile 0.1% (wt/vol) peptone water (Oxoid Ltd., Hampshire, U.K.) and homogenized (Masticator IUL, Barcelona, Spain) for two minutes. Decimal

dilutions in sterile 0.1% (wt/vol) peptone water were prepared from this homogenate, and volumes of 1 mL were pour-plated in duplicate in kanamycin aesculin azide agar (KAA, Oxoid) plates and incubated for 24 h at 42 °C.

For each sample, from three to five typical colonies were identified on the basis of Gram staining, catalase production, growth at 10 °C and at 45 °C and growth in the presence of 6.5% NaCl. Gram-positive cocci able to grow in these conditions were inoculated into microtubes of API 20 Strep (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. Data interpretation was performed using the Analytical Profile Index (API) database (V7.0) with the apiweb™ identification software (bioMérieux). Species identification was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) assays using specific primers and conditions for detection of *ddl*_{E. faecalis} (*Enterococcus faecalis*), *ddl*_{E. faecium} (*Enterococcus faecium*), *vanC1* (*Enterococcus gallinarum*), *vanC2-vanC3* (*Enterococcus casseliflavus*), *murG* (*Enterococcus hirae*) and *mur-2* (*Enterococcus durans*) genes (Table 1).

DNA of the isolates was extracted using the commercial system InstaGene Matrix DNA extraction kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and following the manufacturer's instructions. The DNA purity and concentration was determined using the Nano-Drop™ ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

PCR reactions were performed in a total volume of 25 µL, using 0.5 µM of each primer (Isogen Life Science, Barcelona, Spain), 0.2 mM of deoxynucleoside triphosphates (dNTP's) mix (GeneAmp® dNTP blend, Thermo Scientific), 1× of PCR incomplete buffer (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Germany), 3 mM of MgCl₂ (Bioron), 1.25 U of taq DNA polymerase (Bioron) and 5 µL of extracted solution of enterococcal DNA.

DNA amplifications were performed in a Mastercycler (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, Spain). PCR products were separated by horizontal electrophoresis through 1% (wt/vol) agarose (Bioron) gels in 1× TAE buffer, stained with GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) diluted at 1:10,000, visualized and photographed on a UV transilluminator (Gel Doc™ EZ System; Bio-Rad). The size of each PCR product was estimated using standard molecular weight markers (1-kb DNA ladder; Bioron). Negative controls (samples without DNA template) and positive controls (samples with DNA from the collection of strains of the University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal) were included in all PCR assays. Only one isolate of a given species per positive sample was further studied by means of the tests listed below.

2.2. Antimicrobial susceptibility testing

Enterococcal isolates were screened for susceptibility to a panel of 14 antimicrobial drugs on Mueller-Hinton agar (Oxoid) by a disc diffusion method (CLSI, 2008). The following discs were used: ampicillin (AMP; 10 µg), vancomycin (VA; 30 µg), teicoplanin (TEC; 30 µg), erythromycin (E; 15 µg), tetracycline (TE; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), nitrofurantoin (F; 300 µg), rifampicin (RD; 5 µg), fosfomycin (FOS; 200 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), quinupristin-dalfopristin (QD; 15 µg), gentamicin (CN; 120 µg), kanamycin (K; 120 µg), and streptomycin (S; 300 µg). All the antibiotic discs were obtained from Oxoid with the exception of the kanamycin discs, which were prepared in our laboratory. *E. faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as reference strains for antibiotic disc control. After incubation at 35 °C for 18–24 h, inhibition halos were measured and scored as sensitive, intermediate (reduced susceptibility) or resistant according to the CLSI guidelines. Only the category of high-level resistance (HLR) was considered for gentamicin, kanamycin, and streptomycin (CLSI, 2014).

Table 1

Target genes and primers used in the PCR reactions carried out in this study.

Target gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Annealing T° (°C) (product size, bp)	Reference
<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i> -F	ATCAAGTACAGTTAGTCT	54 (941)	Dutka-Malen et al. (1995)
	<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i> -R	ACGATTCAAAGCTAATG		
<i>ddl</i> <i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <i>E. faecium</i> -F	TAGAGACATTGAATATGCC	54 (550)	Dutka-Malen et al. (1995)
	<i>ddl</i> <i>E. faecium</i> -R	TCGAATGTGCTACAATC		
<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC1</i>)	<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC1</i>)-F	GGTATCAAGGAAACCTC	54 (822)	Dutka-Malen et al. (1995)
	<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC1</i>)-R	CTTCCGCCATCATAGCT		
<i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC2-vanC3</i>)	<i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC2-vanC3</i>)-F	CTCTACGATTCTCTTG	54 (439)	Dutka-Malen et al. (1995)
	<i>E. casseliflavus</i> (<i>vanC2-vanC3</i>)-R	CGAGCAAGCTTAAG		
<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)	<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)-F	GGCATATTATCCAGCACTAG	60 (521)	Arias et al. (2006)
	<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)-R	CTCTGGATCAACTCCATAACTGG		
<i>E. durans</i> (<i>mur-2</i>)	<i>E. hirae</i> (<i>mur-2</i>)-F	CGTCAGTACCCCTCTTGCAGACT	60 (521)	Arias et al. (2006)
	<i>E. hirae</i> (<i>mur-2</i>)-R	GCATTATTACCACTGTTAGTGGTG		
<i>vanA</i>	<i>vanA</i> -F	GGGAAAACGACAATTGC	54 (732)	Dutka-Malen et al. (1995)
	<i>vanA</i> -R	GTACAATGCGGGCGTTA		
<i>vanB</i>	<i>vanB</i> -F	ATGGGAAGCCGATAGTC	54 (635)	Dutka-Malen et al. (1995)
	<i>vanB</i> -R	GATTTCGTTCTCGACC		
<i>vanD</i>	<i>vanD</i> -F	TAAGGCGCTTGATATACCG	54 (461)	Perichon et al. (1997)
	<i>vanD</i> -R	TGCAGCCAAGTATCCGGTAA		
<i>erm(A)</i>	<i>erm(A)</i> -F	TCTAAAAGCAGTAAAGAA	52 (645)	Sutcliffe et al. (1996)
	<i>erm(A)</i> -R	CTTCGATAGTTATAATTAGT		
<i>erm(B)</i>	<i>erm(B)</i> -F	GAAAAGGTAACCAAAATA	52 (639)	Sutcliffe et al. (1996)
	<i>erm(B)</i> -R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTAC		
<i>erm(C)</i>	<i>erm(C)</i> -F	TCAAAACATAATATAGATAAA	52 (642)	Sutcliffe et al. (1996)
	<i>erm(C)</i> -R	GCTAATATTGTTAACATCGTCAAT		
<i>tet(K)</i>	<i>tet(K)</i> -F	TTAGGTGAAGGGTAGGTCC	55 (697)	Aarestrup et al. (2000)
	<i>tet(K)</i> -R	GCAAACCTATTCAGAACGA		
<i>tet(L)</i>	<i>tet(L)</i> -F	CATTGGTCTTATTGGATCG	50 (456)	Aarestrup et al. (2000)
	<i>tet(L)</i> -R	ATTACACTTCGATTTCCG		
<i>tet(M)</i>	<i>tet(M)</i> -F	GTTAAATAGTGTCTTGGAG	55 (576)	Aarestrup et al. (2000)
	<i>tet(M)</i> -R	CTAAGATATGGCTAACAA		
<i>tet(O)</i>	<i>tet(O)</i> -F	ACGGARAGTTATTGTATACC	60 (171)	Aminov et al. (2001)
	<i>tet(O)</i> -R	TGGCGTATCTATAATGTTGAC		
<i>tet(S)</i>	<i>tet(S)</i> -F	GAAAGCTTACTATACAGTAGC	50 (169)	Aminov et al. (2001)
	<i>tet(S)</i> -R	AGGAGTATCTAACATATTAC		
<i>catA</i>	<i>catA</i> -F	GGATATGAAATTATCCCTC	50 (486)	Aarestrup et al. (2000)
	<i>catA</i> -R	CAATCATCTACCCATGAAT		
<i>vat(D)</i>	<i>vat(D)</i> -F	CCGAATCTATGAAAATGTATCC	55 (413)	Robredo et al. (2000)
	<i>vat(D)</i> -R	GCAGCTACTATTGCACCATCCC		
<i>vat(E)</i>	<i>vat(E)</i> -F	ACGTTACCCATCACTATG	55 (282)	Robredo et al. (2000)
	<i>vat(E)</i> -R	GCTCCGATAATGGCACCGAC		
<i>aac(6')-aph(2")</i>	<i>aac(6')-aph(2")</i> -F	CCAAGAGCAATAAGGGCATA	60 (220)	Van de Klundert and Vliegenthart (1993)
	<i>aac(6')-aph(2")</i> -R	CACTATCATAACCACTACCG		
<i>aph(3')-IIIa</i>	<i>aph(3')-IIIa</i> -F	GCCGATGGATTGCGAAAA	60 (292)	Van de Klundert and Vliegenthart (1993)
	<i>aph(3')-IIIa</i> -R	GCTTGATCCCCAGTAAGTC		
<i>ant(6)-la</i>	<i>ant(6)-la</i> -F	ACTGGCTTAATCAATTGGG	58 (577)	Clark et al. (1999)
	<i>ant(6)-la</i> -R	GCCTTTCGCCACCTCACCG		
<i>Tn5397</i>	<i>Tn5397</i> -F	ATGATGGTTGGACAAAGA	53 (1500)	Agersø et al. (2006)
	<i>Tn5397</i> -R	CTTGCTCGATAGGCTTA		
<i>Tn916/Tn1545</i>	<i>Tn916/Tn1545</i> -F	GCGTGAATTGATCTCACT	50 (1046)	Doherty et al. (2000)
	<i>Tn916/Tn1545</i> -R	GACGCTCTGTGCTTCT		
<i>gelE</i>	<i>gelE</i> -F	AGTCATGCTATTTCTCAC	56 (402)	Jurkovič et al. (2006)
	<i>gelE</i> -R	CTTCATTATTACACGTTG		
<i>agg</i>	<i>agg</i> -F	AAGAAAAAGAAGTAGACCAAC	56 (1553)	Eaton and Gasson (2001)
	<i>agg</i> -R	AAACGGCAAGACAAGTAAATA		
<i>ace</i>	<i>ace</i> -F	AAAGTAGAATTAGATCCACAC	56 (320)	Mannu et al. (2003)
	<i>ace</i> -R	TCTATCACATTCCGTTGCG		
<i>cpd</i>	<i>cpd</i> -F	TGGTGGGTATTITTCATTC	47 (782)	Eaton and Gasson (2001)
	<i>cpd</i> -R	TACGGCTCTGGCTACTA		
<i>frs</i>	<i>frs</i> -F	AACCAGAACATGACCAATGAAT	60 (3268)	Pillai et al. (2002)
	<i>frs</i> -R	GCCCCTCATCAACTCAATACC		
<i>esp</i>	<i>esp</i> -F	TTGCTAACATGCTAGTCACGACC	61 (933)	Eaton and Gasson (2001)
	<i>esp</i> -R	GGCTCAACACTGCAATTGCGAA		
<i>hyl</i>	<i>hyl</i> -F	GACTAGAGGAATATCTTACG	50 (661)	Klare et al. (2005)
	<i>hyl</i> -R	AGGCTCAAATCTGT		
<i>efaAfs</i>	<i>efaAfs</i> -F	GACAGACCCACGAATA	55 (705)	Eaton and Gasson (2001)
	<i>efaAfs</i> -R	AGTTCATCATGCTGTAGTA		
<i>efaAfm</i>	<i>efaAfm</i> -F	AACAGATCCGATGAATA	50 (735)	Eaton and Gasson (2001)
	<i>efaAfm</i> -R	CATTTCATCATCTGATAGTA		

2.3. Antimicrobial resistance genes

Genes for resistance to vancomycin [*vanA*, *vanB*, *vanD*], macrolide [*erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*], tetracycline [*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*], chloramphenicol [*catA*], streptogramin [*vat(D)*, *vat(E)*], and aminoglycoside [*aac(6')-aph(2'')*, *aph(3')-IIIa*, *ant(6)-Ia*] were tested by PCR in all enterococcal isolates which showed resistance or reduced susceptibility to these antimicrobials. A PCR assay for the detection of *tdnX* and *int* genes was also used on isolates positive for *tet(M)* so as to detect the presence of the Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons, respectively. The oligonucleotide sequences of primers used and the amplification conditions are given in Table 1.

2.4. Detection of virulence determinants

The presence of genes involved in the expression of gelatinase (*gelE*), aggregation substance (*agg*), accessory colonization factor (*ace*), pheromone determinant (*cpd*), regulator of the expression of *gelE* (*frs*), enterococcal surface protein (*esp*), hyaluronidase (*hyl*), and cell wall adhesins (*efAfs* and *efAfM*) was investigated by PCR (Table 1).

3. Results

3.1. Enterococcal species

Enterococcal isolates were demonstrated in all the 55 samples of game meat tested. One enterococcal isolate per positive sample was obtained and further studied. *E. faecium* was the most prevalent species with 45 isolates, followed by *E. faecalis* (7 isolates) and *E. durans* (three isolates).

3.2. Percentages of antibiotic resistance and phenotypes of resistance

The 55 enterococci were tested for susceptibility to 14 antibiotics by the disc diffusion method. Table 2 shows the distribution of enterococcal species isolated and the percentages of antimicrobial resistance by species and origin. High percentages of resistance were observed for erythromycin (89.1% of strains), tetracycline (67.3%), ciprofloxacin (92.7%), nitrofurantoin (67.3%), and quinupristin-dalfopristin (81.8%). Conversely, a low percentage

(9.1%) of HLR was observed for gentamicin, kanamycin and streptomycin (HLR-CN, HLR-K and HLR-S, respectively). Intermediate levels of resistance (between 10.9% and 47.3% of strains) were identified for the remaining antimicrobial agents.

Table 3 shows the different antimicrobial resistance phenotypes detected among the 55 isolates of enterococci recovered from game meat. It is worth stressing that all strains exhibited a multi-resistant phenotype (resistance to at least three antibiotics). The average numbers of antimicrobial resistances per isolate were 5.8 (*E. faecium*), 7.9 (*E. faecalis*), and 5.7 (*E. durans*).

3.3. Genome of antibiotic resistance

The presence of antibiotic resistance genes was studied by PCR in all enterococcal isolates with resistance or intermediate resistance, and the results are presented in Table 4. The *vanA* and the *vanB* genes were detected in 15 and two of the 26 vancomycin-resistant enterococcal isolates, respectively. No vancomycin-resistant isolates harboured the *vanC1*, *vanC2-vanC3* or *vanD* genes. The 17 VRE isolates that exhibited an acquired mechanism of resistance (with *vanA* or *vanB*) were identified as *E. faecium* (10 isolates), *E. faecalis* (6 isolates), and *E. durans* (one isolate).

The erythromycin-resistant isolates (n = 49) showed *erm(B)* (16 isolates), *erm(C)* (5 isolates), or both genes in association (one isolate). The *erm(A)* gene was not found in any of the isolates in this study. The tetracycline-resistant enterococcal isolates recovered from game meat (n = 37) revealed the presence of *tet(L)* (5 strains), *tet(M)* (23 strains), or a combination of both these tetracycline resistance genes (8 strains). The specific sequence of the Tn5397 transposon was detected in 17 (54.8%) of the thirty-one strains that harboured the *tet(M)* gene.

The presence of *vat(D)* and *vat(E)* genes, associated with streptogramin resistance, was investigated by PCR in all the quinupristin-dalfopristin-resistant *Enterococcus* spp. isolates. However, none of them presented these genes. Similarly, the *catA* gene, encoding a chloramphenicol acetyltransferase, was not found in any of the 11 strains resistant to chloramphenicol.

All enterococcal isolates showing high-level-gentamicin resistance (HLR-CN) and high-level-kanamycin resistance (HLR-K) contained the *acc(6')-aph(2'')* and the *aph(3')-IIIa* genes, respectively. The *ant(6)-Ia* gene, responsible for high-level streptomycin resistance (HLR-S), was not found in any of the 5 high-level streptomycin-resistant *Enterococcus* spp. isolates in this study.

Table 2

Prevalence of antimicrobial resistance (%) in fifty-five enterococci isolates from wild game meat in North-Western Spain.

Antibiotic	Roe deer				Boar			Rabbit		Pheasant	Pigeon	All strains (n = 55)
	<i>E. faecium</i> (n = 31)	<i>E. faecalis</i> (n = 1)	<i>E. durans</i> (n = 3)	Total (n = 35)	<i>E. faecium</i> (n = 10)	<i>E. faecalis</i> (n = 4)	Total (n = 14)	<i>E. faecalis</i> (n = 2)	<i>E. faecium</i> (n = 2)	<i>E. faecium</i> (n = 2)	<i>E. faecium</i> (n = 2)	
AMP	25.8	100	0.0	25.7	30.0	0.0	21.4	0.0	0.0	0.0	0.0	21.8
VA	45.2	100	66.7	48.6	30.0	100	50.0	100	0.0	0.0	0.0	47.3
TEC	16.1	0.0	0.0	14.3	10.0	0.0	7.1	0.0	0.0	0.0	0.0	10.9
E	87.1	0.0	100	85.7	90.0	100	92.9	100	100	100	100	89.1
TE	61.3	100	0.0	57.1	70.0	100	78.6	100	100	100	100	67.3
CIP	96.8	100	33.3	91.4	90.0	100	92.9	100	100	100	100	92.7
F	74.2	0.0	33.3	68.6	100	0.0	71.4	0.0	100	50.0	50.0	67.3
RD	35.5	100	66.7	40.0	0.0	100	28.6	100	0.0	0.0	0.0	36.4
FOS	45.2	0.0	66.7	45.7	60.0	0.0	42.9	0.0	0.0	50.0	50.0	41.8
C	16.1	100	33.3	20.0	10.0	25.0	14.3	0.0	50.0	50.0	50.0	20.0
QD	80.1	100	100	82.9	70.0	100	78.6	50.0	100	100	100	81.8
CN	0.0	100	33.3	5.7	0.0	75.0	21.4	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1
K	0.0	0.0	33.3	2.9	0.0	100	28.6	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1
S	0.0	0.0	0.0	0.0	10.0	100	35.7	0.0	0.0	0.0	0.0	9.1

AMP (ampicillin; 10 µg); VA (vancomycin; 30 µg); TEC (teicoplanin; 30 µg); E (erythromycin; 15 µg); TE (tetracycline; 30 µg); CIP (ciprofloxacin; 5 µg); F (nitrofurantoin; 300 µg); RD (rifampicin; 5 µg); FOS (fosfomycin; 200 µg); C (chloramphenicol; 30 µg); QD (quinupristin-dalfopristin; 15 µg); CN (gentamicin; 120 µg); K (kanamycin; 120 µg); S (streptomycin; 300 µg).

Table 3

Patterns of resistance to antibiotics observed in enterococci isolates from wild game meat in North-Western Spain.

Enterococcal species/Antimicrobial resistance phenotype	Number of isolates with phenotype				
	Roe deer	Boar	Rabbit	Pheasant	Pigeon
<i>E. faecium</i> (n = 45)					
AMP-VA-E-TE-CIP-F-FOS-QD	1				
VA-E-TE-CIP-F-RD-FOS-QD	1				
E-TE-CIP-F-RD-FOS-C-QD	1				
VA-E-TE-CIP-F-C-QD		1			
AMP-VA-E-CIP-RD-FOS-QD	1				
AMP-TEC-E-TE-CIP-F-QD	1				
AMP-E-TE-CIP-F-C-QD	2				
VA-TEC-E-TE-CIP-C-QD	1				
VA-TEC-E-CIP-F-FOS-QD	1		1		
E-TE-CIP-F-RD-FOS-QD	1				
E-TE-CIP-F-FOS-C-QD					1
AMP-TEC-E-CIP-F-QD	1				
AMP-E-TE-CIP-F-FOS		1			
AMP-E-TE-CIP-F-QD		1			
AMP-E-CIP-F-FOS-QD	1		1		
VA-TEC-E-CIP-RD-QD	1				
VA-E-TE-CIP-F-QD	1				
VA-E-CIP-F-RD-QD	2				
E-TE-CIP-F-FOS-QD	5				
E-TE-CIP-F-C-QD				1	
TE-CIP-F-FOS-QD-S		1			
AMP-VA-E-RD-QD	1				
TE-CIP-F-FOS-QD	1				
E-TE-CIP-F-FOS	1		1		
E-TE-CIP-F-C	1				
E-TE-CIP-F-QD		2			1
VA-E-CIP-RD	2				
VA-E-CIP-QD	1				
VA-E-F-FOS		1			
VA-CIP-RD-QD	1				
E-TE-CIP-QD					1
TE-CIP-F	2				
<i>E. faecalis</i> (n = 7)					
VA-E-TE-CIP-RD-C-QD-CN-K-S		1			
VA-E-TE-CIP-RD-QD-CN-K-S		2			
AMP-VA-TE-CIP-RD-C-QD-CN	1				
VA-E-TE-CIP-RD-QD-K-S		1			
VA-E-TE-CIP-RD-QD			1		
VA-E-TE-CIP-RD				1	
<i>E. durans</i> (n = 3)					
VA-E-F-RD-FOS-C-QD-CN-K	1				
VA-E-CIP-RD-QD	1				
E-FOS-QD	1				

For interpretation see Table 2.

3.4. Virulence genes

Table 5 shows the virulence genes detected among the isolates. The *gelE* gene was detected in 4 enterococcal isolates (7.3%), *agg* in three (5.5%), *ace* in 6 (10.9%), *cpd* in 6 (10.9%), *esp* in three (5.5%), *hly* in one (1.8%), *efafS* in one (1.8%), and *efafm* in 5 (9.1%). The *frs* gene was not observed in any strain. Fifteen (27.3%) of the 55 enterococci carried at least one virulence factor gene. Of the *E. faecium* isolates, 20.0% were positive for one or more virulence determinants, compared to 71.4% of the *E. faecalis* and 33.3% of the *E. durans* isolates. Among the various virulence profiles, *efafm* (four *E. faecium* isolates) and the association *gelE* + *ace* + *cpd* (one *E. faecium* and two *E. faecalis* isolates) were the commonest.

4. Discussion

4.1. Enterococcal species

The presence of enterococci in all the samples was a result to be expected, considering that contamination of carcasses with faeces is frequent in game. This is because after being hunted animals are

generally eviscerated and skinned in the field, in conditions that are not very hygienic (Gill, 2007).

In the present study, *E. faecium* and *E. faecalis* were the predominant species in the samples of meat from game. These data concur with reports from other authors, who note that these two enterococcal species are the most prevalent among isolates recovered from wild animals (Santos et al., 2013), domestic animals (Kuhn et al., 2003; Moura et al., 2013; Poeta et al., 2007) and food samples (Aslam et al., 2012; Gomes et al., 2008; Klibi et al., 2013; Pesavento et al., 2014). It should be noted that these two enterococcal species are the members of this genus of greatest relevance to clinical aspects (Gomes et al., 2008). As in the study being reported here, a low prevalence of *E. durans* was also found in most of the above-mentioned reports.

4.2. Percentages of antibiotic resistance and phenotypes of resistance

It is well known that *Enterococcus* spp. are considered a potential reservoir of antibiotic-resistance genes which can be transferred horizontally to other bacteria, including more pathogenic

Table 4

Distribution of antibiotic-resistance genes among enterococci isolates from wild game meat in North-Western Spain.

Species (number of isolates)	Phenotype of resistance		Genes detected by PCR	
	Antibiotics	No. of strains	Resistant genes or genetic elements studied	No. of strains
<i>E. faecium</i> (n = 45)	Vancomycin	17	<i>vanA</i>	8
			<i>vanB</i>	2
			<i>vanC-1</i> and/or <i>vanC2-vanC3</i> and/or <i>vanD</i>	0
	Erythromycin	40	<i>erm(B)</i>	10
			<i>erm(C)</i>	5
			<i>erm(B) + erm(C)</i>	1
	Tetracycline	30	<i>erm(A)</i>	0
			<i>tet(L)</i>	5
			<i>tet(L) + tet(M)</i>	3
			<i>tet(M)</i>	7
<i>E. faecalis</i> (n = 7)			<i>tet(M) + Tn5397</i>	13
			<i>tet(L) + tet(M) + Tn5397</i>	1
			<i>tet(K) and/or tet(O) and/or tet(S)</i>	0
	Chloramphenicol	8	<i>catA</i>	0
	Quinupristin-dalfopristin	36	<i>vat(D)</i> and/or <i>vat(E)</i>	0
	Streptomycin	1	<i>ant(6)-Ia</i>	0
	Vancomycin	7	<i>vanA</i>	6
	Erythromycin	6	<i>vanB</i> and/or <i>vanC-1</i> and/or <i>vanC2-vanC3</i> and/or <i>vanD</i>	0
			<i>erm(B)</i>	5
	Tetracycline	7	<i>erm(A) and/or erm(C)</i>	0
<i>E. durans</i> (n = 3)			<i>tet(M)</i>	1
			<i>tet(M) + Tn5397</i>	2
			<i>tet(L) + tet(M)</i>	3
			<i>tet(L) + tet(M) + Tn5397</i>	1
	Chloramphenicol	2	<i>tet(K) and/or tet(O) and/or tet(S)</i>	0
	Quinupristin-dalfopristin	6	<i>catA</i>	0
	Gentamicin	4	<i>vat(D)</i> and/or <i>vat(E)</i>	0
	Kanamycin	4	<i>acc(6')-aph(2'')</i>	4
	Streptomycin	4	<i>aph(3')-IIIa</i>	4
	Vancomycin	2	<i>ant(6)-Ia</i>	0
	Erythromycin	3	<i>vanA</i>	1
			<i>vanB</i> and/or <i>vanC-1</i> and/or <i>vanC2-vanC3</i> and/or <i>vanD</i>	0
			<i>erm(B)</i>	1
			<i>erm(A) and/or erm(C)</i>	0
	Chloramphenicol	1	<i>catA</i>	0
	Quinupristin-dalfopristin	3	<i>vat(D)</i> and/or <i>vat(E)</i>	0
	Gentamicin	1	<i>acc(6')-aph(2'')</i>	1
	Kanamycin	1	<i>aph(3')-IIIa</i>	1

species (Capita and Alonso-Calleja, 2013). While enterococci from clinical settings and food samples from livestock have been widely studied, there is little knowledge of the antibiotic resistance of enterococci strains from wild environments. To the best of our knowledge, the present study was the first to demonstrate the presence of several antimicrobial resistances in enterococci recovered from game meat in North-Western Spain.

A considerable prevalence of resistance to erythromycin, tetracycline, ciprofloxacin, and quinupristin–dalfopristin was found.

High percentages of resistance to most of these antibiotics have been demonstrated by other authors in wild animals (Guenther et al., 2010; Poeta et al., 2007; Santos et al., 2013; Silva et al., 2010) and in human and livestock populations in Europe (Moura et al., 2013). In contrast, resistance to nitrofurantoin, which was noted in 67.3% of the isolates, was an unexpected result because a ban on the use of this drug in food-producing animals was imposed in the European Union twenty years ago, as a consequence of the toxicological hazards for human consumers. It should be pointed

Table 5

Distribution of virulence genes among enterococci isolates from wild game meat in North-Western Spain.

Enterococcal species/Virulence genes	Number of isolates with genotype				
	Roe deer	Boar	Rabbit	Pheasant	Pigeon
<i>E. faecium</i> (n = 45)					
<i>esp</i>	1				
<i>hyl</i>	1				
<i>agg + ace</i>	1				
<i>efAfm</i>	3		1		
<i>agg + efAfm</i>	1				
<i>gelE + ace + cpd</i>	1				
<i>E. faecalis</i> (n = 7)					
<i>cpd + esp</i>		2			
<i>gelE + ace + cpd</i>			2		
<i>gelE + ace + cpd + efAfs</i>	1				
<i>E. durans</i> (n = 3)					
<i>agg + ace</i>	1				

out that cross-resistance or co-resistance mechanisms (Capita and Alonso-Calleja, 2013) may be the cause of the resistance to this compound observed in the present report and previous research (Álvarez-Fernández et al., 2012). Similar conclusions may be reached for the prevalence of resistance to chloramphenicol (20% of strains in this study), which was also banned in the mid 1990s.

The surprisingly high incidence of antibiotic resistance in game meat in the present study raises the question of where these antibiotic-resistant strains originated. Antimicrobial-resistant bacteria have been detected in different wild animals from locations far removed from human influence, supporting the hypothesis that antibiotic pressures exist in natural environments (Da Costa et al., 2013). However, most studies suggest a strong correlation between human activity and the spread of antibiotic resistance into wildlife (Smith et al., 2014). It has been suggested that the prevalence of antimicrobial resistance in wild animals is related to the presence of farms (Allen et al., 2011) or interactions with farm waste (Cole et al., 2005), livestock density rates (Guenther et al., 2010), human proximity (Wheeler et al., 2012), or human population density (Skurnik et al., 2006). The meat used in the current study was obtained from hunted wild animals which inhabited areas quite close to livestock farms and urban centres, thus having a high likelihood of contact with food-producing animals and humans.

E. faecalis was the enterococcal species that showed the highest average number of antimicrobial resistances per isolate (7.9), as previously demonstrated by other authors in food samples (Gomes et al., 2008; Pesavento et al., 2014; Valenzuela et al., 2008). It has been suggested that *E. faecalis* has a striking ability to acquire and transfer antibiotic resistance genes (McBride et al., 2007).

4.3. Genome of antibiotic resistance

Seventeen isolates (30.9% of the strains analysed) harboured acquired mechanisms of resistance to vancomycin, *vanA* or *vanB* genes, which are generally located on mobile genetic elements. This is a noteworthy finding which highlights the fact that the meat of wild animals can be contaminated with vancomycin-resistant bacteria, and that the potential transfer of vancomycin-resistance genes among different bacteria in food environments cannot be rejected (Capita and Alonso-Calleja, 2013). Other studies have also found *vanA* or *vanB* genes in wild animals (Gonçalves et al., 2010). The detection in meat from game of vancomycin-resistant enterococci (VRE) with the *vanA* gene is a finding of especial relevance in the public health scenario, because *vanA* confers inducible resistance to high levels of vancomycin and teicoplanin, and could potentially be transferred to other human pathogens, such as methicillin-resistant *S. aureus* (López et al., 2009).

The *erm(B)* gene was the most prevalent in erythromycin-resistant strains, and was observed in 17 of the 49 isolates concerned. The predominance of *ermB* gene is a result in accordance with the findings of other authors relating to enterococci isolated from wild animals (Santos et al., 2013). It is suggested that other mechanisms of resistance may be present in those isolates in which the macrolide-resistance genes for which tests were undertaken were not identified.

Thirty-six (97.3%) of the 37 tetracycline-resistant isolates harboured the *tetM* or *tetL* genes, or both. These results are similar to those reported in enterococci isolates from wild rabbits (Silva et al., 2010) and wild birds (Santos et al., 2013). In the present study, the *erm(B)* gene and the tetracycline-resistance genes *tet(M)*, *tet(L)* or both, were frequently identified together in the same isolate. This result was to be expected because tetracycline-resistance genes are frequently found on the same mobile unit as macrolide-resistance genes (Soltani et al., 2000). Additionally, in this study 54.8%

enterococci positive for *tet(M)* carried specific genes of the Tn5397 transposon, although the association of the *tet(M)* gene with this transposon was not further investigated. Similar results have been reported by other authors (Gonçalves et al., 2010; Poeta et al., 2007).

The *Vat(D)* and *Vat(E)* acetyltransferases confer resistance to quinupristin-dalfopristin and are widely distributed in enterococci from different sources (Soltani et al., 2000). Of the 45 enterococcal isolates that showed resistance to quinupristin-dalfopristin, none harboured the *vat(D)* or *vat(E)* genes. Similar results have been observed in enterococci from wild birds (Santos et al., 2013) and from horses (Moura et al., 2013).

The *acc(6')-aph(2")* gene was detected in all the strains with high-level resistance to gentamicin (HLR-CN) and the *aph(3')-IIIa* gene in all those with high-level resistance to kanamycin (HLR-K). These genes have been previously found in enterococcal isolates from foods of animal origin (Choi and Woo, 2013).

The phenotypic resistance to several antimicrobials (such as chloramphenicol, quinupristin-dalfopristin or streptomycin) that was observed could not be explained by the presence of the genes most commonly associated with these resistances. This fact may indicate that other mechanisms of resistance can be present in those isolates in which none of the antibiotic-resistance genes for which tests were undertaken were found (Soltani et al., 2000). Further studies should be performed in order to understand these types of resistance and the mechanisms associated with them.

4.4. Virulence genes

Several virulence factors in enterococci are possibly associated with the colonization and pathogenesis of human disease (Jett et al., 1992). Very few reports exist in which virulence factors have been demonstrated in the enterococci of wild animals (Silva et al., 2011), and it would appear that the current work is the first of this type in Spain.

The virulence factors demonstrated in the study being presented here (*gelE*, *agg*, *ace*, *cpd*, *esp*, *hyl*, *efsaFs*, and *efsaFm*) are often reported in enterococci (Aslam et al., 2012; Gomes et al., 2008; Valenzuela et al., 2008). It should be noted, however, that, in general, enterococci isolated from clinical devices yield a larger amount of virulence factors than do isolates recovered from livestock or wild animals (Silva et al., 2011).

There is particular concern about the *gelE* because of its associations with infections. It has been observed that gelatinase, encoded by the *gelE*, is an extracellular zinc endopeptidase that hydrolyses collagen, gelatine, haemoglobin and other bioactive compounds, and it has been shown to exacerbate endocarditis in animal models (Klibi et al., 2013; Valenzuela et al., 2008).

The endocarditis antigen proteins from *E. faecalis* (*efsaFs* gene) and *E. faecium* (*efsaFm* gene) and the protein Esp (*esp* gene) are involved in the adhesion of enterococci to biotic and abiotic surfaces and the immune system (Silva et al., 2011; Valenzuela et al., 2008). The aggregation protein produced by enterococci (encoded by *agg*) is also involved in adherence to eukaryotic cells besides cell aggregation and conjugation.

Hyaluronidase, which is expressed by the *hyl* gene, acts on hyaluronic acid and increases bacterial invasion. The *ace* gene, which codes for a putative protein with characteristics similar to a collagen-binding protein of *Staphylococcus aureus*, contributes to bacterial adhesion and is apparently expressed during infection in humans. Lastly, sex pheromones, such as those expressed by the *cpd* gene, can induce lateral transfer of conjugative plasmids that encode antibiotic resistance and virulence determinants (Dunny, 2013).

A higher prevalence of virulence factors was detected among

E. faecalis isolates than those found in other enterococcal species, corroborating results from previous reports relating to wild animals (Silva et al., 2011) and food samples (Gomes et al., 2008; López et al., 2009; Valenzuela et al., 2008).

All the virulence genes found in the present study were associated with the presence of genes coding for resistance to clinically important antimicrobials (vancomycin, tetracycline, macrolides and aminoglycosides). A potential linkage of virulence and resistance genes on the same genetic elements has been suggested (Aslam et al., 2012). This fact raises concerns because of the possibility of co-selection of the virulence along with the resistance genes under conditions of selective pressure from antibiotics, and the likelihood of co-transfer of these genetic traits to other bacteria present in the same environment.

5. Conclusions

Enterococcal isolates in meat taken from wild game in North-Western Spain constitute a reservoir of virulence and antimicrobial resistance genes, including the *vanA* gene. These genes or the bacteria containing them could potentially be transmitted to other animals or to humans.

Because it has been suggested that there is a correlation between the prevalence of antimicrobial resistance in bacteria from wild animals and the level of contact of these animals with human populations and farm animals, meat from game provides an opportunity to monitor the impact of the use of antibiotics upon the natural environment and can serve as a sentinel for antibiotic pressure from the surrounding farm and urban environments. Further surveillance studies are needed to gain a better understanding of the emergence and dissemination of antibiotic-resistant bacterial strains in wild ecosystems and to evaluate the potential risk of these bacteria to human and animal health.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Ministerio de Educación (Project PR2010-0603) and the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (Project AGL2011-29645) for the financial support.

References

- Aarestrup, F.M., Agersø, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., Jensen, L.B., 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37 (2), 127–137.
- Agersø, Y., Pedersen, A.G., Aarestrup, F.M., 2006. Identification of Tn5397-like and Tn916-like transposons and diversity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* in enterococci from humans, pigs and poultry. *J. Antimicrob. Ch* 57 (5), 832–839.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat. Rev. Microbiol.* 8 (4), 251–259.
- Allen, S.E., Boerlin, P., Janecko, N., Lumsden, J.S., Barker, I.K., Pearl, D.L., Reid-Smith, R.J., Jardine, C., 2011. Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in southern Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (3), 882–888.
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R., 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *Int. J. Food Microbiol.* 153 (3), 281–287.
- Aminov, R.I., Garrigues-Jeanjean, N., Mackie, R.I., 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (1), 22–32.
- Arias, C.A., Robredo, B., Singh, K.V., Torres, C., Panesso, D., Murray, B.E., 2006. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae* mur-2 gene in *E. durans*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (4), 1567–1570.
- Aslam, M., Diarra, M.S., Checkley, S., Bohaychuk, V., Masson, L., 2012. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int. J. Food Microbiol.* 156 (3), 222–230.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (1), 11–48.
- Choi, J.M., Woo, G.J., 2013. Molecular characterization of high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* from chicken meat in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 165 (1), 1–6.
- Clark, N.C., Olsvik, Ø., Swenson, J.M., Spiegel, C.A., Tenover, F.C., 1999. Detection of a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase gene (*addA*) in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Ch.* 43 (1), 157–160.
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. Approved Standard M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CLSI, 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement (M100-S24). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Cole, D., Drum, D.J.V., Stalknecht, D.E., White, D.G., Lee, M.D., Ayers, S., Sobsey, M., Maurer, J.J., 2005. Free-living Canada geese and antimicrobial resistance. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (6), 935–938.
- Da Costa, P.M., Loureiro, L., Matos, A.J.F., 2013. Transfer of multidrugresistant bacteria between intermingled ecological niches: the interface between humans, animals and the environment. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10 (1), 278–294.
- Doherty, N., Trzciński, K., Pickerill, P., Zawadzki, P., Dowson, ChG., 2000. Genetic diversity of the *tet(M)* gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Ch.* 44 (11), 2979–2984.
- Dunny, G.M., 2013. Enterococcal sex pheromones: signaling, social behavior, and evolution. *Annu. Rev. Genet.* 47, 457–482.
- Dutka-Malen, S., Evers, S., Courvalin, P., 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (1), 24–27.
- Eaton, T.J., Gasson, M.J., 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 (4), 1628–1635.
- Gill, C.O., 2007. Review: microbiological conditions of meats from large game animals and birds. *Meat Sci.* 77 (2), 149–160.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C.V., Darini, A.L.C., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franco, B.D.G.M., De Martinis, E.C.P., 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 25 (5), 668–675.
- Gonçalves, A., Poeta, P., Silva, N., Araujo, C., López, M., Ruiz, E., Uliyakina, I., Direitinho, J., Igrelas, G., Torres, C., 2010. Characterization of vancomycin-resistant enterococci isolated from fecal samples of ostriches by molecular methods. *Foodborne Pathog. Dis.* 7 (9), 1133–1136.
- Guenther, S., Grobbel, M., Heidemanns, K., Schlegel, M., Ulrich, R.G., Ewers, C., Wieler, L.H., 2010. First insights into antimicrobial resistance among faecal *Escherichia coli* isolates from small wild mammals in rural areas. *Sci. Total Environ.* 408 (17), 3519–3522.
- Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T.M., Werner, G., Sundsfjord, A., 2010. Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *Clin. Microbiol. Infect.* 16 (6), 541–554.
- Jett, B.D., Jensen, H.G., Nordquist, R.E., Gilmore, M.S., 1992. Contribution of the pAD1-encoded cytolysin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 60 (6), 2445–2452.
- Jurković, D., Krizková, L., Dušinský, R., Belicová, A., Sojka, M., Krajčovič, J., Ebinger, L., 2006. Identification and characterization of enterococci from bryndza cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 42 (6), 553–559.
- Klare, I., Konstabel, C., Mueller-Bertling, S., Werner, G., Strommenger, B., Kettlitz, C., Borgmann, S., Schulte, B., Jonas, D., Serr, A., Fhor, A.M., Eigner, U., Witte, W., 2005. Spread of ampicillin/vancomycin resistant *Enterococcus faecium* of the epidemic virulent clonal complex-17 carrying the genes *esp* and *hyl* in German hospitals. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24 (12), 815–825.
- Klibi, N., Said, L.B., Jouini, A., Slama, K.B., López, M., Sallem, R.B., Boudabous, A., Torres, C., 2013. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Sci.* 93 (3), 675–680.
- Kuhn, I., Iversen, A., Burman, L.G., Olsson-Liljequist, B., Franklin, A., Finn, M., Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Blanch, A.R., Vilanova, X., Taylor, H., Caplin, J., Moreno, M.A., Domínguez, L., Herrero, I.A., Mollby, R., 2003. Comparison of enterococcal populations in animals, humans, and the environment—a European study. *Int. J. Food Microbiol.* 88 (2–3), 133–145.
- Literak, I., Dolejska, M., Radimersky, T., Klimes, J., Friedman, M., Aarestrup, F.M., Hasman, H., Cizek, A., 2010. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *J. Appl. Microbiol.* 108 (5), 1702–1711.
- López, M., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Martínez, S., del Campo, R., Ruiz-Larrea, F., Zaragoza, M., Torres, C., 2009. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol.* 133 (1–2), 172–178.
- Mannu, L., Paba, A., Daga, E., Comunian, R., Zanetti, S., Dupré, I., Sechi, L.A., 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88 (2–3), 291–304.
- McBride, S.M., Fischetti, V.A., LeBlanc, D.J., Moellering Jr., R.C., Gilmore, M.S., 2007.

- Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. PLoS One 2 (7), e582.
- Moura, I., Torres, C., Silva, N., Somalo, S., Igrelas, G., Poeta, P., 2013. Genomic description of antibiotic resistance in *Escherichia coli* and enterococci isolates from healthy Lusitano horses. J. Equine Vet. Sci. 33 (12), 1057–1063.
- Navarro-Gonzalez, N., Porrero, M.C., Mentaberre, G., Serrano, E., Mateos, A., Dominguez, L., Lavín, S., 2013. Antimicrobial resistance in indicator *Escherichia coli* isolates from free-ranging livestock and sympatric wild ungulates in a natural environment (Northeastern Spain). Appl. Environ. Microbiol. 79 (19), 6184–6186.
- Perichon, B., Reynolds, P., Courvalin, P., 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. Antimicrob. Agents Ch. 41 (9), 2016–2018.
- Pesavento, G., Calonico, C., Ducci, B., Magnanini, A., Lo Nostro, A., 2014. Prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. Food Microbiol. 41, 1–7.
- Pillai, S.K., Sakoulas, G., Gold, H.S., Wennersten, C., Eliopoulos, G.M., Moellering, R.C., Inouye, R.T., 2002. Prevalence of the *frs* locus in *Enterococcus faecalis* infections. J. Clin. Microbiol. 40 (7), 2651–2652.
- Poeta, P., Costa, D., Igrelas, G., Rodrigues, J., Torres, C., 2007. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal enterococci from wild boars (*Sus scrofa*). Vet. Microbiol. 125 (3–4), 368–374.
- Radhouani, H., Silva, N., Poeta, P., Torres, C., Correia, S., Igrelas, G., 2014. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment, and human health. Front. Microbiol. 5 (23) <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00023>.
- Robredo, B., Singh, K.V., Torres, C., Murray, B.E., 2000. Streptogramin resistance and shared pulsed-field gel electrophoresis patterns in *vanA*-containing *Enterococcus faecium* and *Enterococcus hirae* isolated from humans and animals in Spain. Microb. Drug Resist. 6 (4), 305–311.
- Santos, T., Silva, N., Igrelas, G., Rodrigues, P., Micael, J., Rodrigues, T., Resende, R., Gonçalves, A., Marinho, C., Gonçalves, D., Cunha, R., Poeta, P., 2013. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. Anaerobe 24, 25–31.
- Silva, N., Igrelas, G., Figueiredo, N., Gonçalves, A., Radhouani, H., Rodrigues, J., 2010. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Sci. Total Environ. 408 (20), 4871–4876.
- Silva, N., Igrelas, G., Vaz, J., Araújo, C., Cardoso, L., Rodrigues, J., Torres, C., Poeta, P., 2011. Virulence factors in enterococci from partridges (*Alectoris rufa*) representing a food safety problem. Foodborne Pathog. Dis. 8 (7), 831–833.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E., 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Ch. 57 (6), 1215–1219.
- Smith, S., Wang, J., Fanning, S., McMahon, B.J., 2014. Antimicrobial resistant bacteria in wild mammals and birds: a coincidence or cause of concern? Ir. Vet. J. 67 (1), 8. <http://dx.doi.org/10.1186/2046-0481-67-8>.
- Soltani, M., Beighton, D., Philpott-Howard, J., Woodford, N., 2000. Mechanisms of resistance to quinupristin-dalfopristin among isolates of *Enterococcus faecium* from animals, raw meat, and hospital patients in Western Europe. Antimicrob. Agents Ch. 44 (2), 433–436.
- Sutcliffe, J., Grebe, T., Tait-Kamradt, A., Wondrack, L., 1996. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. Antimicrob. Agents Ch. 40 (11), 2562–2566.
- Valenzuela, A., Omar, N.B., Abriouel, H., López, R.L., Ortega, E., Cañamero, M.M., Gálvez, A., 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. Food Chem. Toxicol. 46 (8), 2648–2652.
- Van de Klundert, J.A.M., Vliegenthart, J.S., 1993. PCR detection of genes coding for aminoglycoside-modifying enzymes. In: Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (Eds.), Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications. American Society for Microbiology, Washington, D.C, pp. 547–552.
- Vargas, R.H.M., Reich, F., Klein, G., Atanassova, V., 2013. Bacterial contamination and antibiotic resistance of isolates from packaged game meat. Fleischwirtschaft 93 (4), 179–182.
- Wheeler, E., Hong, P., Bedon, L.C., Mackie, R.I., 2012. Carriage of antibiotic resistant enteric bacteria varies among sites in Galapagos reptiles. J. Wildl. Dis. 48 (1), 56–67.

TERCERA PUBLICACIÓN

Guerrero-Ramos, E., Molina-González, D., Blanco-Morán, S., Igrejas, G., Poeta, P., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat preparations. *Journal of Food Protection*. Accepted for publication (JFP-15-390).

Prevalence, antimicrobial resistance and genotypic characterization of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat preparations

Emilia Guerrero-Ramos^{1,2}, Diana Molina-González³, Sonia Blanco-Morán¹, Gilberto Igrejas^{4,5},
Patrícia Poeta^{6,7}, Carlos Alonso-Calleja^{1,3}, Rosa Capita^{1,3*}

¹ Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, E-24071 León, Spain.

² Ministry of Health, Regional Government of Castilla y León, E-47071 Valladolid, Spain.

³ Institute of Food Science and Technology, University of León, E-24007 León, Spain.

⁴ Department of Genetics and Biotechnology, Functional Genomics and Proteomics Unit, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5000-801, Vila Real, Portugal

⁵ BIOSCOPE Group, REQUIMTE-CQFB Chemistry Department, Faculty of Science and Technology, University NOVA of Lisbon, 2829-516, Monte de Caparica, Portugal

⁶ Department of Veterinary Science, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-911 Vila Real, Portugal.

⁷ Centre for Animal and Veterinary Science, University of Trás-os-Montes and Alto Douro, 5001-911 Vila Real, Portugal.

* AUTHOR FOR CORRESPONDENCE: Rosa Capita, Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León. Campus de Vegazana, s/n, E-24071 León, Spain. E-mail : rosa.capita@unileon.es. Phone: + 34 987 291000 x 5633. Fax: + 34 987 442070.

ABSTRACT

A total of 160 samples of poultry (80), pork (40) and beef (40) preparations (red sausages, white sausages, hamburgers, meatballs, nuggets, minced meat, escalope and crepes) were tested in North-Western Spain to determine the prevalence of vancomycin-resistant enterococci (VRE). VRE were detected in 38 (23.8%) samples (37.5% of poultry, 15.0% of pork and 5.0% of beef samples). One strain per food sample was further characterized. Isolates were identified as *Enterococcus faecium* (14 strains), *E. durans* (10), *E. hirae* (7), *E. gallinarum* (5) and *E. casseliflavus/E. flavescentis* (two). All strains showed resistance or intermediate susceptibility to three or more antimicrobials of clinical significance, in addition to vancomycin. High rates of resistance or intermediate susceptibility were observed for teicoplanin (81.6% of isolates), chloramphenicol (81.6%), erythromycin (100%), quinupristin-dalfopristin (89.5%) and ciprofloxacin (81.6%). A moderate rate of resistance or intermediate susceptibility emerged for ampicillin (34.2%) and tetracycline (36.8%). Genes encoding antimicrobial resistance and virulence were studied by polymerase chain reaction. The *vanA*, *vanB*, *vanC-1* and *vanC-2/vanC-3* genes were identified in 27, one, 5, and two isolates, respectively. Other resistance genes or transposon sequences found were *tet(L)*, *tet(M)*, Tn5397 (tetracycline), *erm(A)*, *erm(B)* (erythromycin), *vat(D)* and *vat(E)* (quinupristin-dalfopristin). Most isolates were free of virulence determinants (*agg*, *hyd*)

and *efAfm* genes were detected in one, one and 5 strains, respectively). Strains were classified as not biofilm producers (crystal violet assay; 4 isolates) or weak biofilm producers (34 isolates). Cluster analysis (*EcoRI* ribotyping) suggested a strong genetic relationship among isolates from different types of meat preparations, animal species and retail outlets. Meat preparations might play a role in the spread through the food chain of VRE with several resistance and virulence genes.

KEY WORDS

VRE, meat preparations, antibiotic-resistance genes, virulence genes, biofilm, ribotyping

INTRODUCTION

Enterococcus species are common inhabitants of the gastrointestinal tract of humans and most animals, and are often used as indicators of faecal contamination of food and water (25). In addition, over the past two decades enterococci have been identified with an increasing frequency as the agent responsible for nosocomial- and community-acquired human infections. They are implicated in a wide diversity of diseases, including urinary tract, intra-abdominal and pelvic infections, bacteraemia, wound and tissue infections, and endocarditis (23), due to the presence of several virulence factors (e.g. aggregation and adhesion substances, gelatinase, extracellular surface proteins and pheromones) (4). *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are the species most commonly isolated from human infections. Clinical cases caused by other species (such as *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* or *E. casseliflavus/E. flavescentis*) have occasionally been described (12, 22).

A specific challenge in human infection is the resistance of *Enterococcus* spp. to a wide variety of antibiotics which can be found intrinsically or acquired via mobile genetic elements such as plasmids, transposons or through chromosomal exchange or mutations (4). In recent years there has been a special concern about the enterococci with high resistance to vancomycin, since this glycopeptide is currently used as a last resort for the treatment of infections caused by multidrug-resistant enterococci (6). A possible explanation for the emergence and spread of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in Europe has been the use in the food-producing animal husbandry of the growth promoter avoparcin, a glycopeptide that induces cross-resistance to vancomycin (10). Because an association between the rates of vancomycin resistance in humans and avoparcin usage in animals was suggested, the use of avoparcin in animals was banned in the European Union in 1997 (28).

Vancomycin inhibits cell-wall synthesis of Gram-positive bacteria by binding to peptidoglycan precursors and blocking the transglycosylation step and subsequently affecting the transpeptidation step also. Both the transglycosylation and transpeptidation steps are essential for cell-wall elongation and cross-linking. The molecular basis of vancomycin resistance in enterococci is the formation of peptidoglycan receptors with reduced glycopeptide affinity. This results in decreased binding of vancomycin and decreased inhibition of cell wall synthesis (40).

Some enterococci present an intrinsic mechanism of vancomycin resistance, mediated by the *vanC* gene that confers low level of vancomycin resistance and is not transferable; this gene is inherent to the species *E. gallinarum* (*vanC-1*), *E. casseliflavus* (*vanC-2*) and *E. flavescentis* (*vanC-3*) (29). Additionally, acquired vancomycin resistance in enterococci can be due to different *van* genes, of which *vanA* and *vanB* are the most common and clinically important. These genes have been identified in strains causing sporadic clinical cases or outbreaks in hospital settings (27, 33, 42). Moreover, strains carrying *vanA* or *vanB* genes have been detected in food-producing animals and food samples both in Spain and worldwide (21, 28, 41). VRE strains containing acquired vancomycin resistance mechanisms represent a worrisome public health problem, due to

their demonstrated capacity of transference (20).

Although out there is little evidence of human infections being directly linked to the consumption or handling of VRE contaminated foods, the presence of VRE in foodstuffs presents a definite risk of resistance genes being transferred to commensal or pathogenic strains throughout the food chain, thus contributing to the dissemination and persistence of antibiotic resistance (10, 34).

Information about the resistance genes found in foods of animal origin is helpful in understanding and controlling antimicrobial resistances. Studies of VRE in meat have been performed in various different countries (5, 9, 12, 23, 26, 31, 34). Nevertheless, very few such studies have been undertaken in Spain (28, 38). The aim of this research was to determine the prevalence and antibiotic resistance patterns of VRE in poultry, pork and beef preparations from retail outlets in North-Western Spain, and to investigate the presence of genes encoding antimicrobial resistance and virulence traits. The genetic diversity of VRE strains was further characterized by ribotyping.

MATERIALS AND METHODS

Sampling procedure. A total of 160 samples (about 300 g each) of raw poultry (chicken and/or turkey; 80 samples), raw pork (40 samples) and raw beef (40 samples) preparations were collected from

24 retail outlets (six to eight samples were taken from each outlet) in the Province of León in North-Western Spain. Three visits were made to each establishment (either two or three samples were collected at each visit). Poultry preparations included red sausages (5 samples), white sausages (9), hamburgers (19), meatballs (10), nuggets (8), minced meat (11), escalope (12) and crepes (6); pork preparations included red sausages (11 samples), white sausages (6), meatballs (1), minced meat (17) and escalope (5); and beef preparations included hamburgers (9), meatballs (10), minced meat (10) and escalope (11). Each sample was placed in a separate sterile plastic bag, transported to the laboratory immediately after collection in an ice chest and tested upon arrival or stored at $3 \pm 1^\circ\text{C}$ for no longer than four hours.

Microbiological analysis. Samples (each weighing 25 g) were homogenized for two minutes in a Masticator (IUL, Barcelona, Spain) with 225 ml buffered peptone water (Oxoid Ltd., Hampshire, England). For sausages, hamburgers, meatballs, nuggets, escalope and crepes, the 25 g samples were taken from two or more pieces in the same lot. After incubation at 37°C for 24 hours, 0.1 ml of the diluted sample was inoculated onto Slanetz-Bartley agar plates (Oxoid) supplemented with 6 µg/ml of vancomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany), and incubated for 48 hours at 37°C .

For each sample, 3 to 5 typical colonies were characterized initially on the basis of Gram staining, catalase production, growth at 10°C and at 45°C and growth in the presence of 6.5% NaCl. For identification of strains at genus level, Gram-positive cocci capable of growing in the above-mentioned conditions were inoculated onto microtubes of API 20 Strep (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. The results were compared with information from the computer-aided database API LAB Plus version 3.2.2. software (bioMérieux). Confirmed enterococci were identified at species level by ribotyping and by polymerase chain reaction (PCR).

The Fisher's exact test was used to compare the prevalence of VRE in meat preparations. Data were analysed using the Statistica® 8.0 software package (Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, U.S.A.).

Ribotyping. Isolated colonies from freshly subcultured (18 to 20 hours) trypticase soy agar (Oxoid) plates were used for ribotyping. The automated RiboPrinter® microbial characterization system (Dupont Qualicon, Wilmington, Delaware, U.S.A.) performed ribotyping in accordance with the manufacturers' instructions. Lyses of target cells with release of cellular DNA, EcoRI digestion of the chromosomal DNA, separation of the resulting fragments by agarose gel electrophoresis, and hybridization with a

chemoluminiscent-labelled DNA probe containing the *E. coli* ribosomal RNA operon were carried out in eight hours.

The number, position and relative intensities of rRNA operon-specific DNA fragments were estimated automatically by RiboPrinter® analysis software, and a digital record (256 numerical values) for each sample was achieved. Linkage distances between patterns were estimated by means of Pearson's correlation coefficient and isolates were clustered by means of the Ward's method by using the Statistica® 8.0 software package (Statsoft). Groupings were formed and populated by isolates with ≤ 0.25 linkage distance (1-Pearson r). This threshold was established from a cluster analysis of ribotyping profiles for three *Enterococcus* spp. collection strains in three different gels.

PCR identification. PCR was performed for detection of *ddl_{E. faecalis}* (*E. faecalis*), *ddl_{E. faecium}* (*E. faecium*), *vanC-1* (*E. gallinarum*), *vanC-2/vanC-3* (*E. casseliflavus/E. flavesiensis*), *murG* (*E. hirae*) and *mur-2_{ed}* (*E. durans*) genes (Table 1).

DNA of the isolates was extracted using the commercial system InstaGene Matrix DNA extraction kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, U.S.A.) and following the manufacturer's instructions. The DNA purity and concentration was determined using the NanoDrop™ ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, USA).

To prepare 25 µL of master mix for each sample, 2.5 µL of 10× PCR incomplete buffer (Bioron GmbH, Ludwigshafen, Germany), 0.75 µL of 100 mM MgCl₂ (Bioron), 0.5 µL of 10 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTP's) mix (GeneAmp® dNTP blend, Thermo Scientific), 0.5 µL of each primer in 25 µM concentration (Isogen Life Science, Barcelona, Spain) and 0.25 µL of 5 U/µL Taq DNA polymerase (Bioron) were mixed in a sterile microtube. Sufficient amount of sterile distilled water was added to this mixture to reach the total volume of 20 µL and then 5 µL of the extracted DNA was added to the mixture.

DNA amplifications were performed in a Mastercycler (Eppendorf Ibérica S.L.U., Madrid, Spain). PCR products were separated by horizontal electrophoresis through 1% (w/v) agarose (Bioron) gels in 1x TAE buffer, stained with GelRed (Biotium Inc., Hayward, California, USA) diluted at 1:10,000, visualized and photographed on a UV transilluminator (Gel Doc™ EZ System; Bio-Rad). The size of each PCR product was estimated using standard molecular weight markers (1-kb DNA ladder; Bioron). Negative controls (samples without DNA template) and positive controls (samples with DNA from the collection of strains of the University of Trás-os-Montes and Alto Douro, Vila Real, Portugal) were included in all PCR assays. Only one isolate of a given species per positive sample was further studied by means of the tests listed below.

Table 1. Target genes and primers used for PCR identification of *Enterococcus* spp.

Target gene	Primer name	Sequence (5'-3')	Annealing T ^a (°C) (product size, bp)	Reference
<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i>	<i>ddl</i> <i>E. faecalis</i> -F <i>ddl</i> <i>E. faecalis</i> -R	ATCAAGTACAGTTAGTCT ACGATTCAAAGCTAACTG	54 (941)	18
<i>ddl</i> <i>E. faecium</i>	<i>ddl</i> <i>E. faecium</i> -F <i>ddl</i> <i>E. faecium</i> -R	TAGAGACATTGAATATGCC TCGAATGTGCTACAATC	54 (550)	18
<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>)	<i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>)-F <i>E. gallinarum</i> (<i>vanC-1</i>)-R	GGTATCAAGGAAACCTC CTTCCGCCATCATAGCT	54 (822)	18
<i>E. casseliflavus/E. flavescentis</i> (<i>vanC-2/vanC-3</i>)	<i>E. casseliflavus/E. flavescentis</i> (<i>vanC-2/vanC-3</i>)-F <i>E. casseliflavus/E. flavescentis</i> (<i>vanC-2/vanC-3</i>)-R	CTCCTACGATTCTTGC CGAGCAAGACCTTAAG	54 (439)	18
<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)	<i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)-F <i>E. hirae</i> (<i>murG</i>)-R	GGCATATTATCCAGCACTAG CTCTGGATCAAGTCCATAAGTGG	55 (521)	3
<i>E. durans</i> (<i>mur-2_{ed}</i>)	<i>E. durans</i> (<i>mur-2_{ed}</i>)-F <i>E. durans</i> (<i>mur-2_{ed}</i>)-R	AACAGCTTACTTGACTGGACGC GTATTGGCGCTACTACCCGTATC	55 (177)	3

Antimicrobial susceptibility testing.

Enterococcus spp. isolates were screened for susceptibility to a panel of 11 antimicrobials on Mueller-Hinton agar (Oxoid) by a disk diffusion method (14). The following disks were used: vancomycin (VA; 30 µg), teicoplanin (TEC; 30 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), gentamicin (CN; 120 µg), kanamycin (K; 120 µg), streptomycin (S; 300 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), tetracycline (TE; 30 µg), erythromycin (E; 15 µg), quinupristin-dalfopristin (QD; 15 µg), and ciprofloxacin (CIP; 5 µg). All the antibiotic disks were obtained from Oxoid with the exception of the kanamycin disks, which were prepared in the laboratory. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as reference strains for the antibiotic disk control. After incubation (35 °C, 18-24 h) the inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediate susceptibility and resistant in accordance with CLSI guidelines. The isolates with resistance or intermediate susceptibility to

one or more antibiotics were separated for characterization of antibiotic resistance genes. Only the category of high-level resistance (HLR) was considered for gentamicin, kanamycin and streptomycin (15).

Antimicrobial-resistance genes.

Specific PCRs were performed with all VRE isolates using specific primers and conditions for amplification of the *vanA*, *vanB*, *vanD* (for detection of acquired mechanisms of resistance), *vanC-1* and *vanC-2/vanC-3* (for demonstration of intrinsic mechanisms of resistance) genes. The presence of genes encoding resistance to chloramphenicol [*catA*], tetracycline [*tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*], erythromycin [*erm(A)*, *erm(B)* and *erm(C)*] and quinupristin/dalfopristin [*vat(D)* and *vat(E)*] was analysed by PCR in all enterococcal isolates which showed resistance or intermediate susceptibility to these antimicrobials. A PCR assay for detection of *tdhX* and *int* genes were also used in *tet(M)*-positive isolates, to

demonstrate the presence of the Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons, respectively. The oligonucleotide sequences of primers used and the amplification conditions have been previously reported (20).

Virulence factor genes. The presence of genes related to virulence factors [*gelE* (gelatinase), *agg* (aggregation substance), *ace* (accessory colonization factor), *cpd* (pheromone determinant), *frs* (regulator of the expression of *gelE*), *esp* (enterococcal surface protein), *hyl* (hyaluronidase), *efaAfs* and *efaAfm* (cell wall adhesins)] was also investigated by PCR using previously described primers and reaction conditions (20).

Biofilm formation. Biofilm production was determined using the crystal violet assay previously described (17). The optical density (OD) of adhered cells was measured at 580 nm in 100-well polystyrene micro-well plates using a Bioscreen C MBR (Oy Growth Curves Ab Ltd., Finland) after staining with crystal violet and rinsing.

The cut-off OD (OD_c) was defined as three standard deviations above the mean OD of the negative controls. Strains were classified as not biofilm producers, when $OD \leq OD_c$, weak biofilm producers, when $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$, moderate biofilm producers, when $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$, or strong biofilm producers, when $(4 \times OD_c) < OD$. All experiments were replicated four times on separate days.

RESULTS

VRE detection and identification. A total of 38 (23.8%) of the 160 samples analysed were positive for VRE, with a higher ($P<0.01$) prevalence in poultry (30 of 80 samples; 37.5%) than in pork (6 of 40 samples; 15.0%) or beef (2 of 40 samples; 5.0%) preparations. VRE were detected in samples from 11 (45.8%) retail outlets. The percentages of positive samples were 37.5% (red sausages), 26.7% (white sausages), 39.3% (hamburgers), 4.8% (meatballs), 12.5% (nuggets), 18.4% (minced meat), 25.0% (escalope) and 16.7% (crepes). Prevalence in meatball samples was lower than those observed in red sausages ($P<0.05$) or hamburgers ($P<0.01$).

A complete agreement between both identification methods (ribotyping and PCR) was observed. The most prevalent species was *E. faecium* (14 isolates), this being detected in 8.8% of the samples, followed by *E. durans* (10 isolates; 6.3% of the samples), *E. hirae* (7 isolates; 4.4% of the samples), *E. gallinarum* (5 isolates; 3.1% of the samples) and *E. casseliflavus/E. flavescentis* (2 isolates; 1.3% of the samples). The characteristics of each strain are shown in Figures 1-5.

Antimicrobial susceptibility of VRE isolates. Table 2 shows the susceptibility of the 38 VRE strains to the antimicrobials tested by the disk diffusion method, according to the enterococcal species and source of isolation. All strains showed

resistance to vancomycin in the disk-diffusion test. A high frequency of resistance or intermediate susceptibility (between 81.6% and 100% of isolates) was observed to teicoplanin, chloramphenicol, erythromycin, quinupristin-dalfopristin and ciprofloxacin. Moderate levels of resistance or intermediate susceptibility were obtained for ampicillin (34.2% of strains) and tetracycline (36.8%). Percentages of resistant strains (excluding isolates showing intermediate susceptibility) varied from 5.3% (tetracycline) to 47.4% (erythromycin). No HLR was observed to aminoglycosides.

Resistance or intermediate susceptibility to multiple antibiotics (at least four antibiotics including vancomycin) was observed in all strains, with a remarkable degree of variability in the resistance profiles (Figures 1-5). The average numbers of resistances and intermediate susceptibility reactions per strain were 5.9 (*E. faecium*), 6.4 (*E. durans*), 6.1 (*E. hirae*), 6.0 (*E. gallinarum*), and 5.5 (*E. casseliflavus/E. flavesrens*). Considering exclusively antibiotic resistances, these values were 2.8, 2.8, 3.1, 2.6, and 2.5 for *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus/E. flavesrens*, respectively.

The presence of antibiotic-resistance genes was studied by PCR in all isolates which showed resistance or intermediate susceptibility. All 38 isolates (each isolate was taken from a different sample) were tested for the presence of *van* resistance

genes. VRE with acquired mechanisms of resistance (VRE_{ar}) were detected in 28 (17.5%) of the 160 meat preparations analysed. Considering separately each type of meat, VRE_{ar} were present in 23 (28.8%), 4 (10.0%) and one (2.5%) poultry, pork and beef samples, respectively.

The *vanA* gene was identified in 27 isolates (10 *E. faecium*, 10 *E. durans*, and 7 *E. hirae*). The *vanA*-containing *E. faecium* strains were isolated from poultry (7 strains), pork (two strains) and beef (one strain) preparations (Figure 1). All *E. durans* (9 isolates from poultry and one isolate from pork) and all *E. hirae* (6 isolates from poultry and one isolate from pork) strains harboured the *vanA* gene (Figures 2 and 3). The *vanB* gene was found in one *E. faecium* isolate from poultry red sausages.

VRE with intrinsic mechanisms of resistance (VRE_{ir}) were identified in seven (4.4%) of the 160 samples analysed. The *vanC-1* gene was observed in five *E. gallinarum* isolates from poultry (3 strains), pork (one strain) and beef (one strain) preparations (Figure 4). The *vanC-2/vanC-3* gene was demonstrated in two *E. casseliflavus/E. flavesrens* isolates from poultry hamburgers (Figure 5).

None of the 31 strains with resistance or intermediate susceptibility to chloramphenicol presented the *catA* gene. The 14 strains showing resistance or intermediate susceptibility to tetracycline were studied for the presence of *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(M)*, *tet(O)* and *tet(S)* genes. The

tet(M) gene was found in three strains, in two of which was associated with the *tet(L)* gene, the specific sequence of the Tn5397 transposon being detected in the third strain.

The *erm(A)* or *erm(B)* genes (alone or in association) were detected in 33 out of the 38 enterococcal isolates which showed resistance or intermediate susceptibility to erythromycin. Twenty-five isolates harboured only the *erm(B)* gene, while the gene *erm(A)* and the association *erm(A)* + *erm(B)* were found in one strain and 7 strains, respectively. The *erm(C)* gene was not found in any of the strains in this study.

The genes associated with resistance to quinupristin-dalfopristin were found in one [*vat(D)*] and two [*vat(E)*] of the 34 isolates with resistance or intermediate susceptibility to these compounds.

Detection of virulence factors and biofilm production. Virulence factors were detected in seven (18.4%) of the 38 VRE isolates; *agg*, *hyl* and *efaAfm* were demonstrated in one, one and 5 isolates, respectively. None of the VRE strains carried the *gelE*, *ace*, *cpd*, *frs*, *esp* or *efaAf* genes (Figures 1-5).

The optical density of adhered cells in polystyrene micro-well plates ranged from 0.117 ± 0.025 to 0.184 ± 0.098 . A cut-off value of three standard deviations above the mean OD of the negative controls, in this case 0.126, was used for strain classification. Strains were classified as not

biofilm producers (*E. faecium* strains 7, 13, 25 and 33; average OD = 0.121 ± 0.003) or weak biofilm producers (34 isolates; average OD = 0.145 ± 0.014). The average OD produced by the 38 tested strains tested was 0.143 ± 0.016 .

Ribotyping. Figures 1-4 show the dendrogram analysis applied to the riboprint patterns of *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae* and *E. gallinarum*, respectively. Using automated ribotyping with *EcoRI*, the 14 vancomycin-resistant *E. faecium* isolates were grouped into 5 clusters (I to V). One ribotyping profile (III) included a single strain (36), and the remaining isolates fell into 4 genomic clusters. The predominant cluster (II) consisted of 5 isolates, whereas the other three clusters comprised two or three strains each.

The 10 *E. durans* isolates were grouped into 4 clusters, which comprised between one (clusters III and IV) and 5 strains (cluster I) (Figure 2). The *E. hirae* isolates were gathered in two clusters, which consisted of 4 and three strains, respectively (Figure 3). Similarly, the *E. casseliflavus/E. flavescentis* strains were grouped into two genetic clusters, which comprised three and two strains, respectively (Figure 4).

Overall, with minimal exceptions, strains were grouped into the same clusters regardless of the meat preparation, animal species, retail outlet, and antibiotic-resistance pattern.

Table 2. Antimicrobial resistance and intermediate susceptibility reactions in 38 vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolated from meat preparations in North-Western Spain.

Antibiotic	Poultry						Pork						Beef			Average (n=38)
	<i>E. faecium</i> (n=10)	<i>E. durans</i> (n=9)	<i>E. hirae</i> (n=6)	<i>E. gallinarum</i> (n=3)	<i>E. casseliflavus/E. flavescens</i> (n=2)	Total (n=30)	<i>E. faecium</i> (n=3)	<i>E. durans</i> (n=1)	<i>E. hirae</i> (n=1)	<i>E. gallinarum</i> (n=1)	Total (n=6)	<i>E. faecium</i> (n=1)	<i>E. gallinarum</i> (n=1)	Total (n=2)		
TEC	2 (7)*	1 (8)	1 (3)	0 (2)	0 (1)	4 (21)	0 (2)	0 (1)	0 (1)	0 (5)	0 (0)	0 (0)	1 (0)	1 (0)	5 (26)	
AMP	4 (0)	3 (0)	3 (0)	0 (0)	0 (0)	10 (0)	2 (0)	0 (0)	1 (0)	3 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	13 (0)	
CN	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
K	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
S	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
C	3 (4)	4 (5)	3 (3)	1 (1)	1 (1)	1 (0)	12 (13)	0 (2)	0 (1)	1 (0)	1 (0)	2 (3)	0 (0)	1 (0)	15 (16)	
TE	1 (3)	0 (3)	1 (1)	0 (1)	0 (1)	2 (9)	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (2)	0 (0)	0 (1)	0 (1)	2 (12)	
E	5 (5)	6 (3)	3 (3)	1 (2)	1 (1)	16 (14)	0 (3)	0 (1)	0 (1)	1 (5)	0 (1)	1 (0)	1 (0)	1 (1)	18 (20)	
QD	1 (7)	3 (6)	1 (5)	0 (2)	1 (1)	6 (21)	1 (1)	0 (1)	0 (1)	1 (4)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (2)	7 (27)	
CIP	5 (3)	1 (7)	2 (3)	0 (2)	0 (2)	8 (17)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	1 (3)	0 (1)	0 (1)	0 (1)	0 (2)	9 (22)	

* number of resistant strains (number of strains with intermediate susceptibility).

TEC, teicoplanin; AMP, ampicillin; CN, gentamicin; S, streptomycin; K, kanamycin; C, chloramphenicol; TE, tetracycline; E, erythromycin; QD, quinupristin-dalfopristin; CIP, ciprofloxacin.

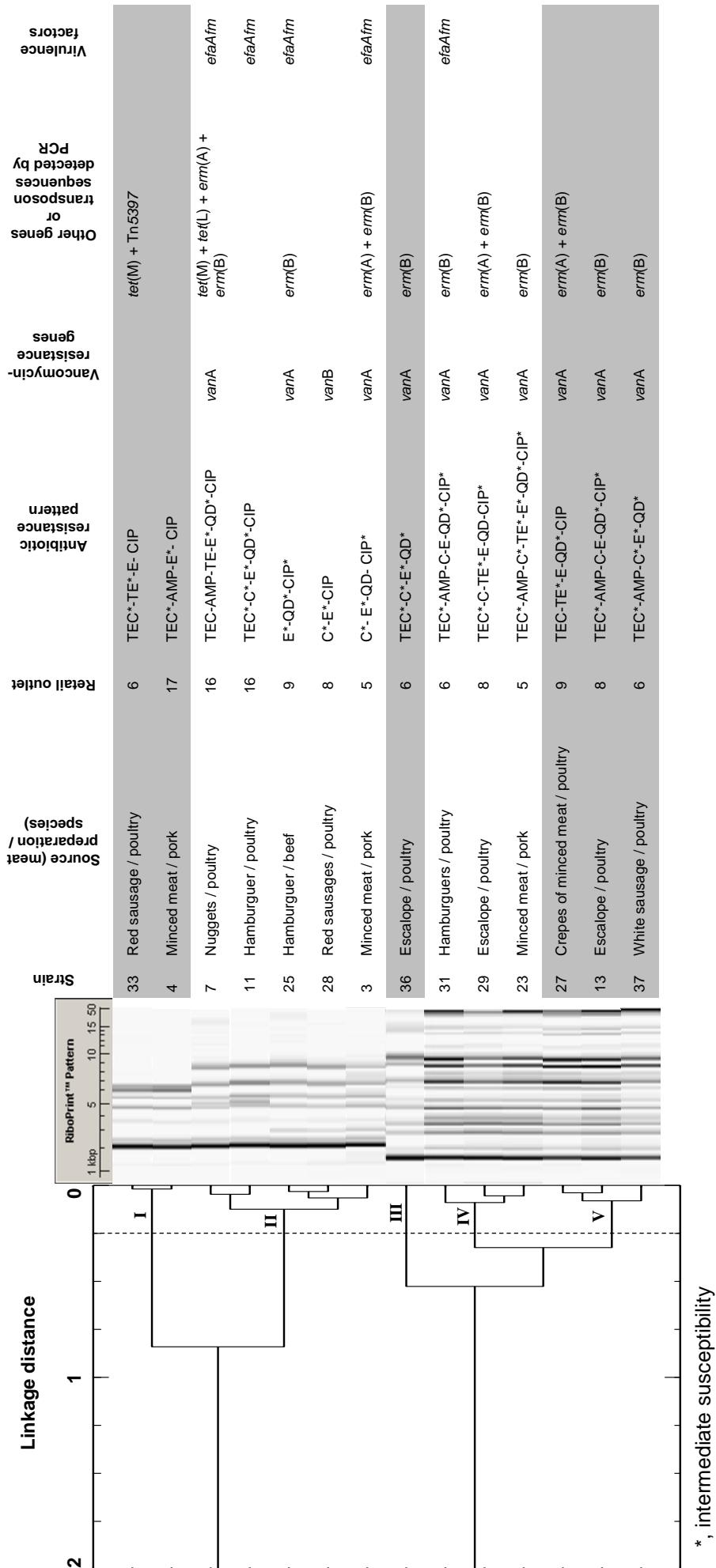
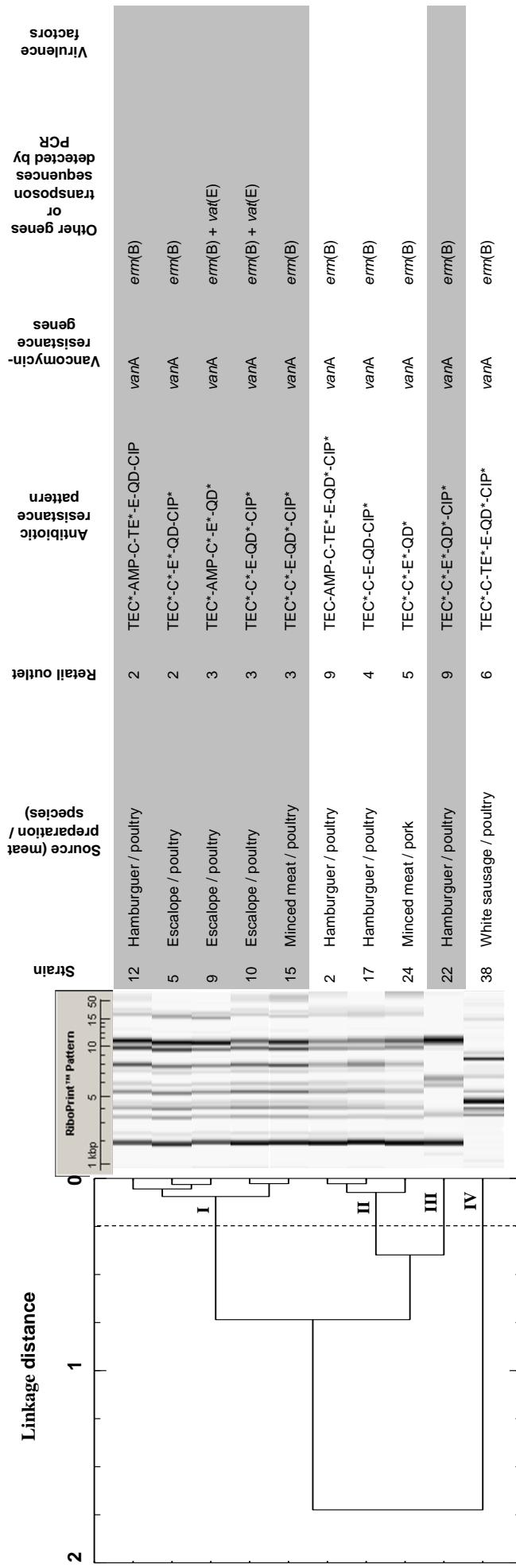


Figure 1. Dendrogram showing cluster analysis of Riboprint® fingerprints from 14 vancomycin-resistant *E. faecium* isolates from meat preparations. This was produced using Pearson's correlation coefficient and Ward's clustering method. For interpretation of resistance patterns, see Table 2.



* , intermediate susceptibility

Figure 2. Dendrogram showing cluster analysis of RiboPrinter® fingerprints from 10 vancomycin-resistant *E. durans* isolates from meat preparations. This was produced using Pearson's correlation coefficient and Ward's clustering method. For interpretation of resistance patterns, see Table 2.

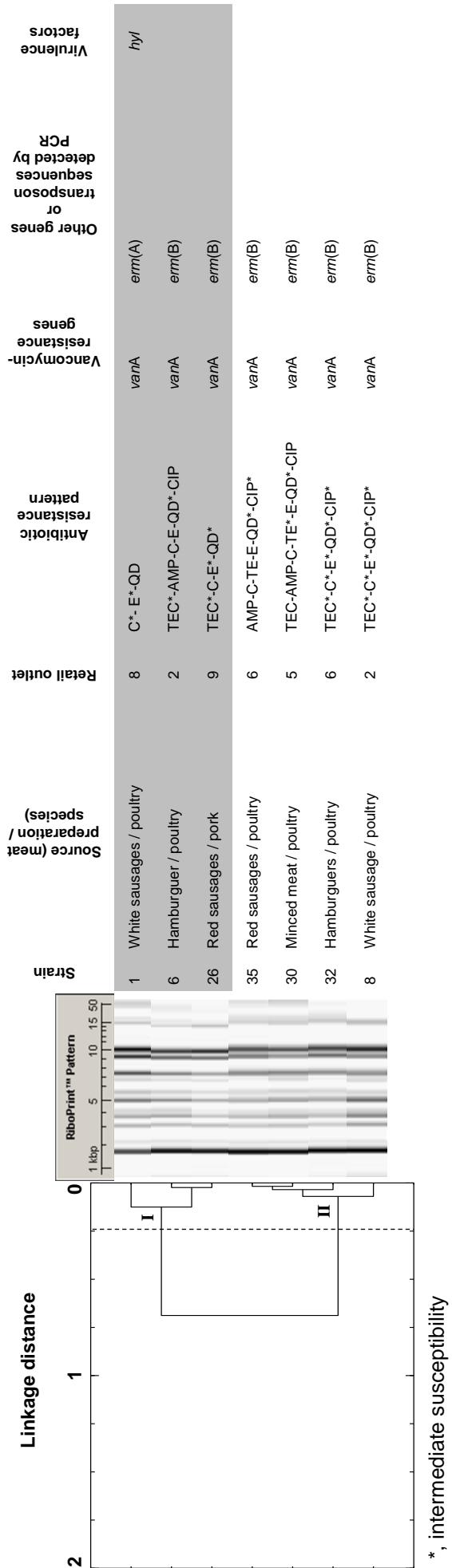
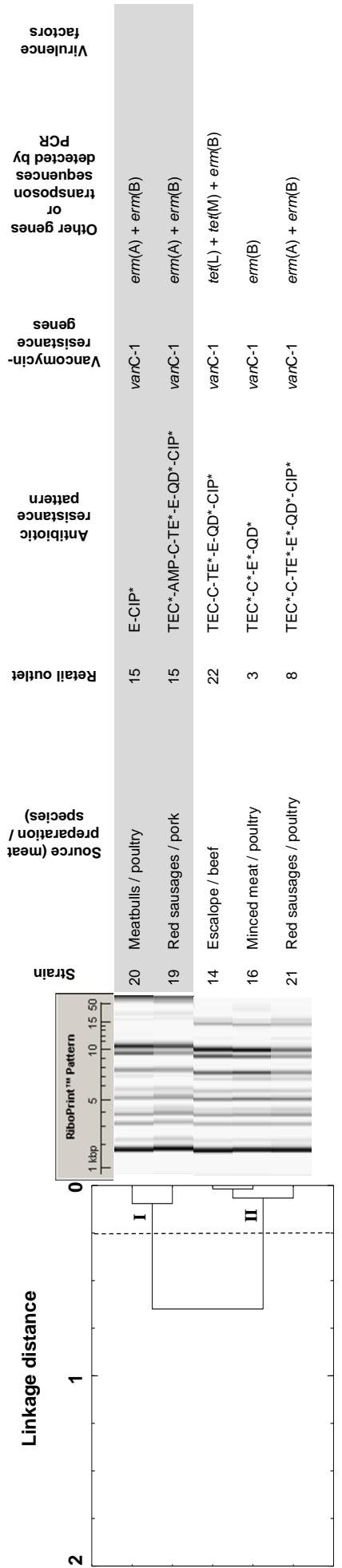


Figure 3. Dendrogram showing cluster analysis of RiboPrinter® fingerprints from 7 vancomycin-resistant *E. hirae* isolates from meat preparations. This was produced using Pearson's correlation coefficient and Ward's clustering method. For interpretation of resistance patterns, see Table 2.



, intermediate susceptibility

Figure 4. Dendrogram showing cluster analysis of RiboPrinter® fingerprints from 5 vancomycin-resistant *E. gallinarum* isolates from meat preparations. This was produced using Pearson's correlation coefficient and Ward's clustering method. For interpretation of resistance patterns, see Table 2.



* , intermediate susceptibility

Figure 5. RiboPrinter® patterns and characteristics of two vancomycin-resistant *E. casseliflavus*/*E. flavescentis* isolates from meat preparations.
For interpretation of resistance patterns, see Table 2.

DISCUSSION

VRE detection and identification.

VRE were detected in 23.8% of the samples, which is a substantially higher prevalence than found in other studies performed in European countries in recent years (12, 23, 25, 34). In fact, after the ban on the use of avoparcin for growth promotion in food-producing animals, there has been a significant decrease in the prevalence of VRE in retail meats (28).

VRE isolates were more likely to be found in retail preparations of poultry than in those made from pork or beef. These findings concur with reports by other authors (12), and underscore the importance of poultry products as a reservoir of VRE and their potential transfer to humans through handling, cross-contamination or after consumption of contaminated undercooked poultry preparations.

The enterococcal species detected (*E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. gallinarum* and *E. casseliflavus/E. flavescentis*) have frequently been detected in raw meat (4, 22, 23, 24, 38). Interestingly, *E. faecalis* was not identified among the VRE strains. This result is in agreement with data obtained by other authors (5, 12, 22) in foodstuffs. In contrast, the presence of *E. faecalis* has been reported by most researchers in meat samples (20).

Antimicrobial susceptibility of VRE isolates.

The multi-resistance phenotype observed in VRE suggests that enterococci are frequently and increasingly becoming resistant to multiple antibiotics, as indicated by other authors (6).

The detection of *vanA*-containing enterococci in 27 (16.9%) meat preparations is of special relevance because this gene mediates a high level of resistance to vancomycin and teicoplanin, which is of clinical concern (both agents are considered as "critically important" for human medicine, 44), and could be transferred to other more virulent and potentially pathogenic bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (28). It should be noted that *vanA*-positive *E. faecium* is the most prevalent VRE in hospital environments in Europe (42). The prevalence of the *vanA* gene observed in the present study is higher than those found recently in food samples both in Spain (28) and in other European countries (23, 31).

One *E. faecium* isolate from poultry harboured the *vanB* gene, which confers various levels of resistance to vancomycin (11). This is a highly remarkable result because there have been several outbreaks and individual clinical cases related to *vanB*-containing *E. faecium* and *E. faecalis* isolates in the last years in Spain (27, 33).

The reason of the persistence of VRE_{ar} in meat in the absence of

glycopeptide pressure selection in animals (avoparcin has been banned for animal growth production in the European Union since 1997) remains unclear, but it could be a consequence of co-selection due to the use of other antimicrobial agents, mainly macrolides and tetracycline, in food production (10, 22). Thus, macrolide resistance, mediated by the *erm(B)* gene, has been linked to the same conjugative plasmid harbouring *vanA* genes, and therefore both genes are co-transferred (29). In the present report 26 (68.4%) isolates harboured the *vanA* and *erm(B)* genes.

It should be noted that seven strains (5 *E. gallinarum* and two *E. casseliflavus/E. flavescentis*) showed intrinsic mechanisms of resistance mediated by *vanC* genes. This intrinsic resistance is chromosome located, and consequently non-transferable to other bacteria. The *vanC* genes are associated with low levels of resistance against vancomycin and sensitivity to teicoplanin (11). However, in the study being presented here, resistance or intermediate susceptibility to teicoplanin was observed in four *E. gallinarum* and one *E. casseliflavus/E. flavescentis* isolates classified as non-*vanA* and non-*vanD*. These results are coincident with findings from other authors (1), and suggest the ability of these species to acquire and develop a distinct system for teicoplanin resistance. Such mechanisms require further study for the collected VRE strains.

Thus, it has been suggested that new *van* genes, such as *vanM*, which confers high level of resistance to both vancomycin and teicoplanin, should be tested in VRE isolates (13).

All strains in the present study showed a phenotype of multi-resistance, with resistance to ampicillin, tetracycline, erythromycin, and ciprofloxacin being frequently observed. These drugs are commonly used in the EU in animal husbandry (8), which could contribute to the percentages of resistance to these agents, data that are in correlation with those found in other studies (9, 24). These four compounds are considered as veterinary "critically important" antimicrobial agents according to the Office International des Epizooties (OIE) (45), being in the World Health Organization (WHO) list tetracycline "highly important", and ampicillin, erythromycin and ciprofloxacin "critically important" antimicrobials for human medicine (44). It is also noteworthy the high prevalence of resistance observed for quinupristin-dalfopristin, which are classified as "highly important" antimicrobials (44).

VRE isolates were all resistant to erythromycin, suggesting a strong association between vancomycin and erythromycin resistance genetic determinants, as previously suggested (9). Most strains (68.4%) harboured the *erm(B)* gene, being detected the *erm(A)* gene in eight (21.1%) isolates (4 *E. faecium*, one *E.*

hirae and three *E. gallinarum*). This gene is part of transposon Tn554 in staphylococci (32). Thus, a horizontal gene transfer to enterococci is suggested from our findings. However, further investigations are required to prove this thesis. Other authors have also found the *erm(A)* gene in enterococci isolates from meat (43).

Resistance to chloramphenicol (recognized as a "highly important" antimicrobial, 44), which was shown by 81.6% of isolates, is an unexpected result because, as a consequence of the toxicological hazard for human consumers, a ban on the use of chloramphenicol in food-producing animals was imposed in the EU in the mid-1990s. It should be pointed out that cross-resistance or co-resistance mechanisms could be the cause of the resistance observed to this compound (2, 10).

None of the VRE strains exhibited HLR to gentamicin, kanamycin or streptomycin. Similar observations were made by other authors in VRE isolates from food samples (12, 19). These results indicate that aminoglycosides are likely to be effective against enterococcal infections, as previously suggested (39).

Antibiotic resistance genes were not detected in numerous enterococcal isolates with resistance to such compounds. This finding indicates that further mechanisms of resistance may be present in antibiotic-resistant strains in which no tested

resistance genes were found, as is also indicated by other authors (35, 39).

Detection of virulence factors and biofilm production. One of the main concerns about enterococci is the presence of virulence factors that may contribute to the severity of infections caused by these bacteria. The virulence genes detected in the present work (*agg*, *hyl* and *efaAfm*) have been previously detected in food-producing animals and foodstuffs derived from them (4, 30, 37).

The low prevalence rate of virulence determinants found in the research reported here (18.4% of strains) is coincident with the findings of other authors, who showed that virulence factors appear most commonly in clinical enterococcal isolates (37). In agreement with previous reports (24), no correlation was observed between the prevalence of virulence genes and antibiotic resistance in enterococcal isolates.

Biofilm formation is a matter of concern for both food processing environments and clinical settings (17). In the present study, none of the isolates presented a moderate or strong ability to form biofilm on polystyrene surfaces; rather, VRE strains showed a weak ability to form biofilm (10.5% of isolates) or were not biofilm producers (89.5%). According to Di Rosa *et al.* (16), biofilm formation can be modulated by the presence of *esp* gene, which was not detected in the present study. It has been suggested that the

acquisition of vancomycin resistance may result in a lessened ability to form biofilms (36).

Ribotyping. Although only a limited number of species were identified during this study, there was a diversity of isolates, as indicated by the number of clusters into which the strains were grouped using ribotyping and tree-diagram analysis (Figures 1-4), suggesting that ribotyping might be useful in the epidemiological surveillance of VRE. These results agree with the findings of other authors, who noted that automated *EcoRI* ribotyping has an adequate discriminatory power for enterococcal isolates, and could be the method of choice to determine rapidly whether strains were related (7).

The fact that strains from different types of meat preparations, animal species and retail outlets were grouped into the same clusters suggests a strong genetic relationship among the VRE isolates from meat preparations in North-Western Spain.

In conclusion, it is suggested that meat preparations, especially those based on poultry, remain a potential source of multi-resistant VRE, leading to a need to undertake epidemiological and molecular studies so as better to define the role of these foodstuffs in the maintenance and transfer of resistance determinants, and assess their potential risk for human health.

The high prevalence of VRE with acquired mechanisms of resistance (VRE_{ar})

observed in meat preparations is highly remarkable. Because avoparcin was banned in the EU for animal growth promotion seventeen years before this study was undertaken, it is suggested that other factors could be contributing to the maintenance of these basal levels of VRE_{ar} in foods of animal origin. The possible selective pressure of other antimicrobial agents in food-animals for multi-resistant VRE_{ar} cannot be discarded.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the financial contribution of the Spanish *Ministerio de Educación* (Project PR2010-0603) and the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad* (Project AGL2011-29645).

REFERENCES

1. Ahmed, M. O., P. D. Clegg, N. J. Williams, K. E. Baptiste, and M. Bemet. 2011. Vancomycin resistant enterococci (VRE) in equine-fecal samples, p. 357-362. In A. Mendez-Vilas (ed.), Science and Technology Against Microbial Pathogens. Research, Development and Evaluation. World Scientific Publishing Company Pte. Ltd., London.
2. Álvarez-Fernández, E., C. Alonso-Calleja, C. García-Fernández, and R. Capita. 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and

2006. *Int. J. Food Microbiol.* 153 (3):281-287.
3. Arias, C. A., B. Robredo, K. V. Singh, C. Torres, D. Panesso, and B. E. Murray. 2006. Rapid identification of *Enterococcus hirae* and *Enterococcus durans* by PCR and detection of a homologue of the *E. hirae mur-2* gene in *E. durans*. *J. Clin. Microbiol.* 44 (4):1567-1570.
4. Aslam, M., M. S. Diarra, S. Checkley, V. Bohaychuk, and L. Masson. 2012. Characterization of antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus* spp. isolated from retail meats in Alberta, Canada. *Int. J. Food Microbiol.* 156 (3):222-230.
5. Borgen, K., M. Sørum, Y. Wasteson, and H. Kruse. 2001. VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. *Int. J. Food Microbiol.* 64 (1-2):89-94.
6. Borhani, K., A. Ahmadi, F. Rahimi, M. R. Pourshafie, and M. Talebi. 2014. Determination of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* diversity in Tehran sewage using plamid profile, biochemical fingerprinting and antibiotic resistance. *Jundishapur J. Microbiol.* 7 (2):e8951.
7. Brisse, S., V. Fussing, B. Ridwan, J. Verhoef, and R. J. L. Willem. 2002. Automated ribotyping of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 40 (6):1977-1984.
8. Briyne, N. de, J. Atkinson, L. Pokludová, and S. P. Borriello. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Rec.* 175 (13):325.
9. Busani, L., M. del Grosso, C. Paladini, C. Graziani, A. Pantosti, F. Biavasco, and A. Caprioli. 2004. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-susceptible and -resistant enterococci isolated in Italy from raw meat products, farm animals, and human infections. *Int. J. Food Microbiol.* 97 (1):17-22.
10. Capita, R., and C. Alonso-Calleja. 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 (1):11-48.
11. Cattoir, V., and R. Leclercq. 2012. Twenty-five years of shared life with vancomycin-resistant enterococci: is it time to divorce? *J. Antimicrob. Chemother.* 68 (4):731-42.
12. Çetinkaya, F., T. E. Muş, G. E. Soyutemiz, and R. Çibik. 2013. Prevalence and antibiotic resistance of vancomycin-resistant enterococci in animal originated foods. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 37 (5):588-593.
13. Chen, Ch., J. Sun, Y. Guo, D. Lin, Q. Guo, F. Hu, D. Zhu, X. Xu, and M. Wand. 2015. High prevalence of *vanM* in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* In press. Doi:10.1128/AAC.01732-15.
14. CLSI. 2013. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals, 4rd Ed. Approved Standard VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.

15. CLSI. 2014. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania.
16. Di Rosa, R., R. Creti, M. Venditti, R. D'Amelio, C. R. Arciola, L. Montanaro, and L. Baldassarri. 2006. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp), and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 256 (1):145-150.
17. Díez-García, M., R. Capita, and C. Alonso-Calleja. 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiol.* 31 (2):173-80.
18. Dutka-Malen, S., S. Evers, and P. Courvalin. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33 (1): 24-27.
19. Gomes, B. C., C. T. Esteves, I. C. V. Palazzo, A. L. C. Darini, G. E. Felis, L. A. Sechi, B. D. G. Franco, and E. C. P. de Martins. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 25 (5):668-675.
20. Guerrero-Ramos, E., J. Cordero, D. Molina-González, P. Poeta, G. Igrelas, C. Alonso-Calleja, and R. Capita. 2016. Antimicrobial resistance and virulence genes in enterococci from wild game meat in Spain. *Food Microbiol.* 53:156-164.
21. Hammerum, A. M. 2012. Enterococci of animal origin and their significance for public health. *Clin. Microbiol. Infect.* 18 (7):619-625.
22. Jung, W. K., J. Y. Lim, N. H. Kwon, J. M. Kim, S. K. Hong, H. C. Koo, S. H. Kim, and Y. H. Park. 2007. Vancomycin-resistant enterococci from animal sources in Korea. *Int. J. Food Microbiol.* 113 (1):102-107.
23. Kasimoglu-Dogru, A., Y. E. Gencay, and N. D. Ayaz. 2010. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Enterococcus* species in chicken at slaughter level; absence of vanA and vanB in *E. faecalis* and *E. faecium*. *Res. Vet. Sci.* 89 (2):153-158.
24. Klibi, N., L. B. Said, A. Jouini, K. B. Slama, M. López, R. B. Sallem, A. Boudabous, and C. Torres. 2013. Species distribution, antibiotic resistance and virulence traits in enterococci from meat in Tunisia. *Meat Sci.* 93 (3):675-680.
25. Kolumn, A., L. S. Akan, and F. P. Çakiroğlu. 2009. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control* 20 (3):281-283.
26. Lemcke, R., and M. Bülte. 2000. Occurrence of the vancomycin-resistant genes vanA, vanB, vanC1, vanC2 and vanC3 in *Enterococcus* strains isolated from poultry and pork. *Int. J. Food Microbiol.* 60 (2-3):185-194.
27. López, M., A. Rezusta, C. Seral, C. Aspiroz, C. Marne, M. J. Aldea, I. Ferrer,

- M. J. Revillo, F. J. Castillo, and C. Torres. 2012. Detection and characterization of a ST6 clone of *vanB2-Enterococcus faecalis* from three different hospitals in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (3): 257-260.
28. López, M., Y. Sáenz, B. Rojo-Bezares, S. Martínez, R. del Campo, F. Ruiz-Larrea, M. Zaragoza, and C. Torres. 2009. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol.* 133 (1-2):172-178.
29. Lozano, C., D. González-Barrio, M. C. Camacho, J. F. Lima-Bargero, J. de la Puente, U. Höfle, and C. Torres. 2015. Characterization of fecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. *Microb. Ecol.* PMID: 26194421.
30. Mannu, L., A. Paba, E. Daga, R. Comunian, S. Zanetti, I. Duprè, and L. A. Sechi. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. *Int. J. Food Microbiol.* 88 (2-3):291-304.
31. Messi, P., E. Guerrieri, S. de Niederhäusern, C. Sabia, and M. Bondi. 2006. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in meat and environmental samples. *Int. J. Food Microbiol.* 107 (2):218-222.
32. Millán, L., P. Goñi, P. Cerdá, M. C. Rubio, R. Gómez-Luz. 2007. Novel 10-bp deletion in the translational attenuator of a constitutively expressed *erm(A)* gene from *Staphylococcus epidermidis*. *Int. Microbiol.* 10 (2):147-150.
33. Nebreda, T., J. Oteo, C. Aldea, C. García-Estébanez, J. Gastelu-Iturri, V. Bautista, S. García-Cobos, J. Campos. 2007. Hospital dissemination of a clonal complex 17 *vanB2*-containing *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59 (4):806-807.
34. Petternel, C., H. Galler, G. Zarfel, J. Luxner, D. Haas, A. J. Grisold, F. F. Reinthaler, and G. Feierl. 2014. Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiol.* 44:41-46.
35. Poeta, P., D. Costa, J. Rodrigues, and C. Torres. 2006. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27 (2):131-137.
36. Ramadhan, A. A., and E. Hegedus. 2005. Biofilm formation and *esp* gene carriage in enterococci. *J. Clin. Pathol.* 58 (7):685-686.
37. Ramos, S., G. Iglesias, J. Rodrigues, J. L. Capelo-Martínez, and P. Poeta. 2012. Genetic characterization of antibiotic resistance and virulence factors in *vanA*-containing enterococci from cattle, sheep and pigs subsequent to the discontinuation of the use of avoparcin. *Vet. J.* 193 (1):301-303.
38. Robredo, B., K. V. Singh, F. Baquero, B. E. Murray, and C. Torres. 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *Int. J. Food Microbiol.* 54 (3):197-204.

39. Santos, T., N. Silva, G. Igrejas, P. Rodrigues, J. Micael, T. Rodrigues, R. Resende, A. Gonçalves, C. Marinho, D. Gonçalves, R. Cunha, and P. Poeta. 2013. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe* 24:25-31.
40. Sujatha, S., and I. Praharaj. 2012. Glycopeptide resistance in Gram-positive cocci: A review. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2012:ID 781679.
41. Torres, C., C. Tenorio, A. Portillo, M. García, C. Martínez, R. del Campo, F. Ruiz-Larrea, and M. Zaragaza. 2003. Intestinal colonization by *vanA*- or *vanB*-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. *Microb. Drug Resist.* 9:S47-52.
42. Werner, G., T. M. Coque, A. M. Hammerum, R. Hope, W. Hryniewicz, A. Johnson, I. Klare, K. G. Kristinsson, R. Leclercq, C. H. Lester, M. Lillie, C. Novais, B. Olsson-Liljequist, L. V. Peixe, E. Sadowy, G. S. Simonsen, J. Top, J. Vuopio-Varkila, R. J. Willems, W. Witte, and N. Woodford. 2008. Emergence and spread of vancomycin resistance among enterococci in Europe. *Euro Surveill.* 13(47):pii 19046.
43. Werner, G., T. M. Coque, Ch. M. A. P. Franz, E. Grohmann, K. Hegstad, L. Jensen, W. van Schaik, and K. Weaver. 2013. Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker. *Int. J. Food Microbiol.* 303 (6-7):360-379.
44. World Health Organization. 2011. WHO list of critically important antimicrobials. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf. Date last accessed: October 26, 2015.
45. World Organisation of Animal Health (OIE). 2015. OIE list of antimicrobial agents of veterinary importance. Available at: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf. Date last accessed: October 26, 2015.

