



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“PREVALENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS EN PRODUCTOS AVÍCOLAS: INFLUENCIA DE
DIFERENTES FACTORES Y CONSECUENCIAS PARA LA
SEGURIDAD ALIMENTARIA”**

Elena María Álvarez Fernández

León, 2013



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“PREVALENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A
ANTIBIÓTICOS EN PRODUCTOS AVÍCOLAS: INFLUENCIA DE
DIFERENTES FACTORES Y CONSECUENCIAS PARA LA
SEGURIDAD ALIMENTARIA”**

Elena María Álvarez Fernández

León, 2013

El trabajo recogido en la presente Memoria ha sido subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (AGL2011-29645), por la Junta de Castilla y León (Consejería de Educación, LE013A10-2) y por la Universidad de León (ULE 2009-1).



INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS¹
(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)

Los Dres. Dña. ROSA MARÍA CAPITA GONZÁLEZ y D. CARLOS ALONSO CALLEJA como Directores² de la Tesis Doctoral titulada “PREVALENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN PRODUCTOS AVÍCOLAS: INFLUENCIA DE DIFERENTES FACTORES Y CONSECUENCIAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA” realizada por Dña. ELENA MARÍA ÁLVAREZ FERNÁNDEZ en el programa de doctorado CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmamos, en León a 25 de febrero de 2013

Fdo.: Rosa Capita González

Fdo.: Carlos Alonso Calleja

¹ Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.

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



ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA TESIS DOCTORAL¹
(R.D. 99/2011, de 28 de enero y Normativa de la ULE)

El órgano responsable del programa de doctorado CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS en su reunión celebrada el día 14 de marzo de 2013 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada "PREVALENCIA DE BACTERIAS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS EN PRODUCTOS AVÍCOLAS: INFLUENCIA DE DIFERENTES FACTORES Y CONSECUENCIAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA", dirigida por la Dra. Dña. ROSA MARÍA CAPITA GONZÁLEZ y el Dr. D. CARLOS ALONSO CALLEJA, elaborada por Dña. ELENA MARÍA ÁLVAREZ FERNÁNDEZ y cuyo título en inglés es el siguiente "PREVALENCE OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA IN AVIAN PRODUCTS: INFLUENCE OF SEVERAL FACTORS AND CONSEQUENCES FOR FOOD SAFETY".

Lo que firmo, en León a 14 de marzo de 2013.

El Secretario del Departamento

Fdo.: Bernardo Prieto Gutiérrez

CONFORMIDAD
El Director del Departamento

Fdo.: Andrés Otero Carballeira

¹ Este impreso solamente se cumplimentará para los casos de tesis depositadas en papel.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Capita González y al Dr. Carlos Alonso Calleja por haberme dado la maravillosa oportunidad de realizar un trabajo de investigación tan interesante. Les agradezco la confianza, la dedicación y el tiempo invertidos y, en especial, la paciencia ante las interrupciones surgidas de compatibilizar estos experimentos con mi quehacer diario. Su asesoramiento y ayuda han sido claves para que siguiera adelante con este proyecto.

A todos los investigadores del Laboratorio de Control Microbiológico y del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTAL) de la Universidad de León, que me han acompañado a lo largo de estos años. Por tantos momentos compartidos, por su ayuda y por su amistad.

A la Universidad de León, por estar abierta al conocimiento que está por venir, por dar aliento al alma de científicos que necesitan creer en la carrera de investigador en España.

Al Ministerio de Economía y Competitividad y a la Junta de Castilla y León, por hacer posible la investigación en nuestro país.

Al Laboratorio Nacional de Referencia para *Salmonella* y *Shigella* de España (LNRSSSE, Majadahonda, Madrid) por su ayuda con la tipificación de las cepas de *Salmonella*.

A todas aquellas personas que de una u otra forma han contribuido a que esta Tesis Doctoral haya llegado a su fin.

Finalmente, gracias a los lectores que muestran interés por el extraordinario mundo de aprender.

A **mi padre**, que en su viaje definitivo nos dejó
una soledad doliente pero ya sonora de su
bondad inmortal.

A **mi madre**, que mirando siempre a mi padre
se transparenta y sale a mi encuentro.

A **Víctor**, que tanto quiere a su sobrina.

A **mis abuelos Paco y Chon**, que hacían de un
no hay nada una ilusión.

A **Luis y Pili**, un nuevo sol de poniente.

A **Carlos y Mari**, a los que el corazón se les
pierde entre nosotros tres.

A **Dani**, sólo miré un momento y quedaste, como
una montaña nueva.

Y a **Carla**, mi niña, un libro de amor y rosas
tempranas. Quiero siempre jugar contigo.

Yo solo vivo dentro de Carla y de Dani.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1. LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA	3
1.1. HISTORIA Y TENDENCIAS DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	4
1.2. CONSECUENCIAS DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	6
1.2.1. Aspectos relacionados con la Salud Pública	6
1.2.2. Aspectos económicos.....	9
2. GENERACIÓN, DISEMINACIÓN Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	9
2.1. GENERACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	9
2.2. DISEMINACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	11
2.3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	13
3. PAPEL DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA EN LA EMERGENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.....	14
3.1. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS USADOS A LO LARGO DE LA CADENA ALIMENTARIA. 15	
3.1.1. Antibióticos	15
Uso de antibióticos en producción animal.....	15
Antibióticos en acuicultura	22
Antibióticos en agricultura	23
3.1.2. Fungicidas	24
3.1.3. Biocidas	25
Aditivos de piensos	28
Descontaminantes	28
Aditivos alimentarios	30
Desinfectantes	30
4. INTERÉS DEL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS AVÍCOLAS	33
4.1. CARNE DE AVE	33
4.2. HUEVOS	37
5. INTERÉS DEL ESTUDIO DE <i>Salmonella</i>.....	39
6. INTERÉS DEL ESTUDIO DE <i>Escherichia coli</i>	42
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	61
JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO	63
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
OBJETIVOS	69

CAPÍTULO I.

PREVALENCIA Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN SEROTIPOS DE <i>Salmonella</i> AISLADOS DE CARNE DE AVE EN ESPAÑA: COMPARACIÓN ENTRE 1993 Y 2006.....	71
RESUMEN.....	73
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	74
MATERIAL Y MÉTODOS	76
MUESTRAS.....	76
PROCEDIMIENTO DE AISLAMIENTO	76
SEROTIPIA Y FAGOTIPIA.....	77
EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS	77
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	77
RESULTADOS.....	79
PREVALENCIA DE <i>Salmonella</i>	79
SEROTIPOS Y FAGOTIPOS	79
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	79
DISCUSIÓN.....	83
PREVALENCIA DE <i>Salmonella</i>	83
SEROTIPOS Y FAGOTIPOS	84
SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS.....	86
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90

CAPÍTULO II.

LOS TRATAMIENTOS DE DESCONTAMINACIÓN PUEDEN INCREMENTAR LA PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN POBLACIONES NATURALES DE <i>Escherichia coli</i> en carne de ave	97
RESUMEN.....	99
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	100
MATERIAL Y MÉTODOS	103
MUESTRAS.....	103
TRATAMIENTOS ANTIMICROBIANOS	103
ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	103
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>E. coli</i>	104
PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS	104
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	105
RESULTADOS	106
RECUENTOS MICROBIANOS.....	106
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.....	108
DISCUSIÓN.....	112
RECUENTOS MICROBIANOS.....	112
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.....	112
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	117

CAPÍTULO III.

INFLUENCIA DEL SISTEMA DE ALOJAMIENTO EN LA CARGA MICROBIANA Y EN LOS PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE AISLAMIENTOS DE <i>Escherichia coli</i> DE HUEVOS DE MESA	121
RESUMEN.....	123
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	124
MATERIAL Y MÉTODOS	127

MUESTRAS.....	127
RECUENTOS MICROBIANOS.....	127
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i>	128
DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LAS CEPAS DE <i>E. coli</i>	129
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	129
RESULTADOS.....	130
RECUENTOS MICROBIANOS.....	130
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.....	132
DISCUSIÓN.....	135
RECUENTOS MICROBIANOS.....	135
RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS.....	136
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

CAPÍTULO IV.

RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLAMIENTOS DE <i>E. coli</i> PROCEDENTES DE CARNE DE AVE CONVENCIONAL Y ECOLÓGICA: COMPARACIÓN ENTRE LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN POR DISCO Y EL SISTEMA MINIATURIZADO <i>SENSI TEST GRAM-NEGATIVE</i>.....	143
RESUMEN.....	145
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	146
MATERIAL Y MÉTODOS	148
MUESTRAS.....	148
RECUENTOS MICROBIANOS.....	148
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>E. coli</i>	148
DETERMINACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>E. coli</i>	149
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	149

RESULTADOS	151
RECUENTOS MICROBIANOS	151
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	151
COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE <i>E. coli</i>	154
DISCUSIÓN	157
RECUENTOS MICROBIANOS	157
RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	158
COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE <i>E. coli</i>	162
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	164
CONCLUSIONES	169
ANEXO I. PUBLICACIONES	173

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (EEA, 2010; IFT, 2006; OJEC, 1998a; SCENIHR, 2009)	16
Tabla I.1. Perfiles de resistencia a antibióticos de los 40 aislamientos de <i>Salmonella</i> procedentes de aves en 1993.....	80
Tabla I.2. Perfiles de los 19 aislamientos de <i>Salmonella</i> resistentes a antibióticos procedentes de aves en 2006.....	80
Tabla II.1. Recuentos de microbiota aerobia viable (\log_{10} ufc/g de piel) en muslos de pollo sumergidos en agua o en soluciones acuosas de descontaminantes antes y después del almacenamiento durante 5 días a $7\pm 1^\circ$ C	107
Tabla II.2. Recuentos de coliformes fecales (\log_{10} ufc/g de piel) en muslos de pollo sumergidos en agua o en soluciones acuosas de descontaminantes antes y después del almacenamiento durante 5 días a $7\pm 1^\circ$ C	107
Tabla II.3. Número (porcentaje) de cepas de <i>Escherichia coli</i> susceptibles, resistentes y multi-resistentes aisladas a partir de grupos de muslos de pollo control o tratados con soluciones acuosas de descontaminantes y no almacenadas o almacenadas durante 5 días a $7\pm 1^\circ$ C	109
Tabla III.1. Medios de cultivo, tiempos y temperaturas usados para la realización de los análisis microbiológicos	128
Tabla III.2. Recuentos microbianos (\log ufc/cm ²) en la cáscara de huevos recogidos de diferentes establecimientos de venta al público en el noroeste de España.....	131
Tabla III.3. Susceptibilidad, resistencia y multi-resistencia a antibióticos en cepas de <i>E. coli</i> presentes en la cáscara de huevos recogidos en diferentes establecimientos de venta al público del noroeste de España	132
Tabla III.4. Frecuencia de resistencia a agentes antimicrobianos en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de la cáscara de huevos de mesa adquiridos en establecimientos de venta al público del noroeste de España	133

Índice de Tablas

Tabla III.5. Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i> resistentes o multi-resistentes aisladas de la superficie de huevos de mesa en el noroeste de España	134
Tabla IV.1. Porcentaje de cepas de <i>E. coli</i> susceptibles, resistentes y multi-resistentes en cada tipo de muestra	153
Tabla IV.2. Tabla IV.2. Porcentaje de pruebas positivas (resistencias).....	154
Tabla IV.3. Evaluación del sistema miniaturizado (<i>Sensi Test Gram-negative</i>) para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de <i>E. coli</i>	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Distribución de las cepas de <i>Salmonella</i> aisladas de aves según el número de antibióticos a los que fueron resistentes	81
Figura I.2. Porcentaje de cepas de <i>Salmonella</i> resistentes a cada antibiótico analizado.....	82
Figura II.1. Porcentajes de aislamientos de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos procedentes de muslos de pollo sumergidos en agua (control) o en soluciones de descontaminantes químicos y almacenados durante 5 días a $7\pm 1^{\circ}$ C.....	110
Figura IV.1. Definición y cálculo de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo y coeficiente kappa	150
Figura IV.2. Recuentos microbianos obtenidos en piel de diferentes especies de aves	152

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS COMO PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA

Desde su descubrimiento hace más de 80 años, los antibióticos y compuestos relacionados han permitido mantener la tasa de letalidad por enfermedades infecciosas en niveles bajos, a la vez que han contribuido sustancialmente al incremento de la esperanza de vida producido durante la segunda mitad del siglo XX. Sin embargo, en las últimas décadas, estos logros se están viendo amenazados por la emergencia y diseminación de microorganismos resistentes a los antibióticos. Así, la resistencia a los antibióticos, que involucra a los principales agentes patógenos y compuestos antimicrobianos, es percibida como un peligro para la Salud Pública mundial, que afectará especialmente a las futuras generaciones (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

La preocupación por el incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha aumentado en los últimos años y así ha sido reconocido en diferentes documentos tanto en el ámbito nacional como internacional (Campos y Baquero, 2002; EASAC, 2007). En este sentido, la resistencia a antibióticos ha sido definida como una pandemia global (EASAC, 2007), una de las mayores amenazas para la Salud Pública y uno de los principales desafíos sanitarios del siglo XXI (WHO, 2009), una potencial catástrofe mundial (European Parliament, 2006), y uno de los principales problemas de los Sistemas de Salud en Europa (ECDC/EMEA, 2009). En base a las tendencias actuales en lo que a tasas de mortalidad se refiere, y usando modelos logísticos de predicción, es esperable que a lo largo del siglo XXI las infecciones vayan ganando el protagonismo que tuvieron hace un siglo (Ausubel *et al.*, 2001). El problema es tan severo que muchos expertos vaticinan la escasa efectividad que los antibióticos tendrán dentro de varias décadas (Rosenblatt-Farrell, 2009).

A lo largo de esta Memoria de Tesis Doctoral el término “antimicrobiano” se usará de manera general para referirse a todos los compuestos, incluyendo antibióticos y biocidas, que ejercen un efecto inhibitorio o letal sobre los microorganismos. El término “antibiótico” se empleará para hacer referencia a compuestos naturales, sintéticos o semisintéticos que a bajas concentraciones ejercen una acción sobre los microorganismos sensibles (toxicidad selectiva). Los antibióticos se emplean para tratar, controlar o prevenir las enfermedades infecciosas en seres humanos, animales o plantas, así como (en algunas áreas geográficas)

para mejorar la eficiencia en la utilización del pienso y la ganancia diaria de peso (promotores del crecimiento). Los “biocidas” son compuestos químicos (descontaminantes, aditivos o desinfectantes) habitualmente de amplio espectro, usados para destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un efecto de control sobre cualquier microorganismo nocivo (SCENIHR, 2009).

1.1. Historia y tendencias de la resistencia a antibióticos

El descubrimiento de los antibióticos fue un hallazgo casual, que se produjo cuando Sir Alexander Fleming, al regresar de sus vacaciones de verano en septiembre de 1928, observó que la presencia de un moho contaminante había inhibido el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en una placa de medio de cultivo. Dicho moho fue posteriormente identificado como *Penicillium notatum* y el compuesto químico responsable de la inhibición denominado penicilina. La purificación, producción en suficientes cantidades y uso de la penicilina como agente terapéutico se llevó a cabo en 1940 por un grupo de investigadores de la Universidad de Oxford (particularmente Ernst Boris Chain y Howard Walter Florey). Los tres científicos mencionados recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1945 (Monnet, 2005).

La resistencia a los antibióticos fue descrita poco tiempo después y en una entrevista publicada en el diario New York Times en 1945, Fleming advirtió que el uso inapropiado de la penicilina podría provocar la selección de células resistentes de *Staphylococcus aureus*, que podrían causar infecciones más severas que las cepas sensibles. Las afirmaciones de este científico fueron corroboradas con el hecho de que solo unos años después del empleo masivo de la penicilina como agente terapéutico, más del 50% de las cepas de *Staphylococcus aureus* habían adquirido resistencia al antibiótico (Alanis, 2005).

Los datos de resistencia a antibióticos en bacterias aisladas de infecciones nosocomiales invasivas (principalmente infecciones sanguíneas) están disponibles en el *European Antimicrobial Resistance Surveillance System* (EARSS) para los Estados Miembros de la Unión Europea, Islandia y Noruega. El porcentaje de resistencia a antibióticos en varias especies aisladas de pacientes con septicemia, especialmente bacterias Gram-negativas (por ejemplo *Escherichia coli* resistente a cefalosporinas), no ha dejado de crecer en los últimos años y así, en la Unión Europea, la resistencia a antibióticos

entre las bacterias responsables de infecciones severas en humanos afecta a más del 25% de las cepas en algunos estados miembros (EARSS, 2007; ECDC/EMEA, 2009). Un motivo especial de preocupación lo constituyen las cepas multi-resistentes, que son responsables de aproximadamente la mitad de los 27.000 fallecimientos anuales provocados por las infecciones nosocomiales en los 27 estados miembros de la Unión Europea (Watson, 2008). Otros sistemas de vigilancia disponibles en la Unión Europea ponen también de manifiesto la tendencia al incremento en la prevalencia de resistencia a antibióticos para la mayoría de las bacterias entéricas responsables de enfermedades transmitidas por alimentos (ECDC/EFSA/EMEA/SCENIHR, 2009; European Commission, 2006a; HPA, 2008).

En los EE.UU., la prevalencia de resistencia a antibióticos ha aumentado también de forma marcada en los últimos años, tanto en el caso de bacterias de origen intestinal transmitidas por alimentos (NARMS, 2006) como en las responsables de infecciones nosocomiales (CDC, 2009). Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*; MRSA), un microorganismo responsable de infecciones hospitalarias que puede transmitirse también por el consumo y manipulación de alimentos contaminados (EFSA, 2009a), fue descrito por primera vez en los EE.UU. en 1968. A comienzos de los años 1990s, se adscribían al grupo MRSA entre el 20% y el 25% de las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes hospitalizados. Diez años después este porcentaje había ascendido al 60%. Algo parecido ha ocurrido con los enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*; VRE). Estos microorganismos provocan con frecuencia infecciones nosocomiales, que pueden también ser transmitidas a partir de los animales, bien por ingestión de alimentos de origen animal o por contacto directo (ECDC/EFSA/EMEA/SCENIHR, 2009; Peters *et al.*, 2003). Desde 1990 hasta 2003, la prevalencia de VRE en aislamientos de pacientes hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs) se incrementó desde menos del 1% hasta el 28,5%. Por lo que respecta a las bacterias Gram negativas resistentes a beta-lactamasas de amplio espectro (*extended spectrum beta-lactamases*; ESBLs), fluoroquinolonas, carbapenems, y aminoglucósidos, éstas han aumentado también su prevalencia de forma considerable. Por ejemplo, en 1997, el *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* puso de manifiesto que entre los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* realizados en los EE.UU., las tasas de resistencia a ceftacídima y otras cefalosporinas de tercera generación fueron 6,6%, 9,7%,

5,4%, y 3,6% para infecciones de la sangre, neumonías, infecciones cutáneas y del tracto urinario, respectivamente. En el año 2003, el 20,6% de todas las cepas de *K. pneumoniae* procedentes de UCIs fueron resistentes a estos fármacos, y en el periodo comprendido entre 1994 y 2000, en un estudio realizado en 43 estados de los EE.UU. se observó que la susceptibilidad a la ciprofloxacina decreció desde un 86% a un 76% en el caso de las bacterias Gram negativas aisladas de pacientes ingresados en UCIs, hecho que fue asociado al incremento del empleo de fluoroquinolonas en esa área geográfica (CDC, 2006).

Recientemente están recibiendo una gran atención las bacterias resistentes a todos los antibióticos conocidos, denominadas pan-resistentes, descritas por primera vez en la última década (European Parliament, 2006).

1.2. Consecuencias de la resistencia a antibióticos

Las infecciones causadas por bacterias resistentes a los antibióticos responden con dificultad a los tratamientos farmacológicos, lo que se traduce en consecuencias negativas en relación con la morbilidad y mortalidad, así como en un incremento de los costes económicos asociados (Rice, 2009).

1.2.1. Aspectos relacionados con la Salud Pública

Las bacterias resistentes a los antibióticos están asociadas con consecuencias negativas para la salud humana principalmente por dos motivos. En primer lugar porque provocan infecciones que de otra forma no ocurrirían y, en segundo, porque los fallos en el tratamiento aumentan la severidad de dichas infecciones.

Es difícil cuantificar con precisión el impacto total de la resistencia a antibióticos en términos de morbilidad y mortalidad, puesto que la resistencia constituye un problema adicional a la infección inicial. Sin embargo, es un hecho universalmente aceptado que la resistencia a antibióticos incrementa la probabilidad de fallecimiento, el coste de las terapias, la duración de la enfermedad y la probabilidad de requerir hospitalización. Así, se ha estimado que las infecciones por bacterias multi-resistentes (aproximadamente 386.000 casos en 2007) causan más de 25.000 fallecimientos anuales en la Unión Europea, Islandia y Noruega. Con el objeto de interpretar adecuadamente este dato, cabe señalar que cada año se producen unos 48.000 fallecimientos por accidentes de tráfico en la misma área geográfica (EARSS, 2007; ECDC/EMEA, 2009). Las infecciones causadas por bacterias

resistentes a antibióticos se asocian con una calidad de vida reducida, con infecciones bacterianas en otras localizaciones y con un incremento en las tasas de recidiva (respecto a las infecciones causadas por cepas sensibles), cronificación y posteriores infecciones oportunistas con microorganismos resistentes.

Los fallos en el tratamiento de las infecciones por cepas resistentes incrementan sustancialmente el riesgo de complicaciones. Las personas inmunodeprimidas, incluyendo los pacientes con cáncer, los niños con malnutrición o las personas con el síndrome de inmunodeficiencia (VHI positivo), son más vulnerables. En estos grupos de población la existencia de terapias antimicrobianas efectivas resulta esencial para su supervivencia. Además de complicar el tratamiento de las infecciones, la resistencia a antibióticos dificulta la realización de procedimientos médicos complejos, como el trasplante de órganos o los implantes de prótesis, donde los antibióticos desempeñan un papel crucial para la seguridad del paciente, previniendo complicaciones (Cars y Nordberg, 2004).

El fallo de una terapia antimicrobiana conduce al dilema de cual es la pauta de actuación correcta, si administrar una terapia empírica, por ejemplo utilizando antibióticos de amplio espectro, o bien esperar a recibir los resultados del antibiograma, retrasando el comienzo del tratamiento. Generalmente el empleo de una terapia empírica no suele ser efectivo en estas infecciones, puesto que existe una dificultad incrementada de predecir las resistencias. Un estudio llevado a cabo en UCIs puso de manifiesto tasas de mortalidad significativamente superiores entre los pacientes que recibían una terapia empírica inadecuada que en aquéllos que recibían el antibiótico adecuado (42% vs 17%) (Kollef *et al.*, 1999). Además, si bien es comprensible que algunos profesionales opten por la administración de antibióticos de amplio espectro en las etapas iniciales de las infecciones severas, hay que señalar que este hecho provoca un círculo vicioso, ya que existe una relación directamente proporcional entre el uso de antibióticos de amplio espectro y el riesgo de selección de bacterias resistentes (Patterson y Rice, 2003). En cualquier caso, y como consecuencia de un tratamiento inadecuado o retardado, los tiempos durante los cuales puede producirse la infección se prolongan, incrementando el número de personas infectadas en la comunidad, y exponiendo a la población general al riesgo de contraer una infección por una cepa resistente (WHO, 2002).

Como se ha indicado con anterioridad, los fallos en el tratamiento de estas infecciones se asocian con una mayor tasa de letalidad. Por ejemplo, en el caso de septicemias por MRSA, la mortalidad es entre dos y tres veces superior a la que se asocia con infecciones por cepas de *Staphylococcus aureus* no resistentes (Cosgrove *et al.*, 2003). De igual forma, las infecciones por cepas resistentes de *Salmonella* (Helms *et al.*, 2004), *Campylobacter* (Helms *et al.*, 2005) y VRE (Edmond *et al.*, 1996) son más problemáticas y se asocian a mayores tasas de letalidad que las infecciones por cepas sensibles de estos grupos microbianos. En una serie de registros llevados a cabo en Dinamarca con el objeto de determinar la mortalidad asociada con infecciones gastrointestinales por *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium entre 1995 y 1999, se comprobó que 28 de un total de 953 pacientes infectados con cepas pan-susceptibles (susceptibles a todos los antibióticos) fallecieron, siendo la mortalidad 2,3 veces superior a la observada para la población general, mientras que la infección por cepas multi-resistentes (ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfonamidas, tetraciclina y ácido nalidíxico) (40 pacientes; 5 fallecimientos) se asoció con una mortalidad 13,1 veces mayor que la de la población general de Dinamarca (Mølbak, 2004).

En los últimos años se han encontrado vínculos entre resistencia a antibióticos y virulencia. Los genes de virulencia, por ejemplo aquéllos asociados con la producción de enterotoxinas o la quelación del hierro, que incrementan la capacidad de invasión en sus hospedadores, y los genes de resistencia a antibióticos pueden estar presentes en los mismos elementos genéticos móviles, transfiriéndose y expresándose de forma conjunta (Carlson *et al.*, 2007; Doyle y Erickson, 2006). Asimismo, se han descrito algunos genes que participan tanto en la virulencia como en la resistencia a antibióticos (por ejemplo bombas de expulsión en el caso de *Campylobacter*) (EFSA, 2008a). Hay que señalar aquí que cualquier potenciación de la virulencia en las bacterias patógenas puede afectar de forma adversa al éxito de un tratamiento con antibióticos.

Finalmente, cabe mencionar que ninguno de los cálculos señalados en los párrafos precedentes incluye estimaciones de los costes que la resistencia a antibióticos tendrá para las futuras generaciones, que muy probablemente serán superiores a los que están siendo experimentados en la actualidad. En este contexto es necesario también destacar el enorme impacto económico y sanitario que la resistencia a antibióticos tiene en los países en vías de

desarrollo, dadas las generalmente precarias condiciones de sus sistemas de salud y los bajos ingresos económicos, que se traducen en una escasa disponibilidad y un suministro irregular de los fármacos, conllevan un empleo inapropiado de los antibióticos (Cars y Nordberg, 2004).

1.2.2. Aspectos económicos

Las infecciones por bacterias resistentes causan pérdidas económicas a los hospitales, a los sistemas de salud y a la sociedad en general, sin olvidar los costes para el paciente, como consecuencia de la severidad y duración de la enfermedad y el incremento de las probabilidades de hospitalización. En este sentido, las estimaciones sugieren que los costes para el sistema sanitario ascienden a 4.000-5.000 millones de dólares al año en los EE.UU. En Europa, los costes anuales debidos al incremento del gasto en antibióticos ascienden a 9.000 millones de euros, excluyendo los costes asociados a las prescripciones llevadas a cabo en hospitales (European Parliament, 2006). Recientemente se han llevado a cabo algunas estimaciones más modestas (1.300 a 2.700 millones de dólares en los EE.UU. y 1.500 millones de euros en la Unión Europea), si bien se supone que la mayor parte de las estimaciones están subestimadas (ECDC/EMEA, 2009).

2. GENERACIÓN, DISEMINACIÓN Y MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

2.1. Generación de resistencia a antibióticos

Si bien en algunos casos se ha descrito la inducción de mecanismos de resistencia como consecuencia de la acción de un antibiótico, el desarrollo de resistencia a antibióticos es principalmente un proceso de selección Darwiniano (Rosenblatt-Farrell, 2009). Existen poblaciones microbianas en distintos ambientes (seres humanos, animales, alimentos, superficies, ambiente). Cuando un factor de estrés (por ejemplo un compuesto antimicrobiano) actúa sobre estas poblaciones, las células susceptibles se inactivarán, pero no así aquellas que son resistentes. Por presión selectiva, estas bacterias resistentes serán capaces de sobrevivir y multiplicarse, produciendo una progenie resistente. Tras un periodo de tiempo, la población susceptible original habrá sido reemplazada por una población resistente. Cuando los antimicrobianos se usan de forma incorrecta (por ejemplo tiempo

demasiado corto, cantidad demasiado baja o concentración inadecuada) las probabilidades de que las bacterias se adapten y multipliquen aumentan considerablemente (WHO, 2002).

La resistencia a los antibióticos puede ser innata (intrínseca), relacionada con la fisiología o estructura del microorganismo (por ejemplo ausencia de lugar diana para el agente antimicrobiano, escasa permeabilidad de las cubiertas celulares, producción de enzimas que inactivan el antimicrobiano o presencia de bombas de expulsión que disminuyen la concentración intracelular del compuesto). La resistencia intrínseca es un aspecto inherente a ciertas especies bacterianas (denominadas insensibles) y no se ve afectada por el uso de antibióticos. Así, por ejemplo, la membrana externa de las bacterias Gram-negativas hace a estos microorganismos relativamente impermeables a los compuestos hidrofóbicos, como es el caso de los antibióticos macrólidos. Algunas bacterias pueden asimismo usar estrategias temporales en las que diferentes genes son expresados o inhibidos para permitir la supervivencia en la presencia de antibióticos (sistemas de respuesta al estrés) (Rosenblatt-Farrell, 2009). Sin embargo, la resistencia intrínseca no es el principal motivo de preocupación en el contexto de la Salud Pública y la sanidad animal, y la gran mayoría de los microorganismos resistentes a antibióticos han emergido como resultado de cambios genéticos, adquiridos por mutación (evolución vertical), o por la captación de material genético por transferencia horizontal a partir de otras células bacterianas (FVE, 2002). La expresión de estos cambios genéticos en la célula conlleva modificaciones de uno o más mecanismos biológicos de la bacteria afectada y determina en última instancia el tipo específico de resistencia que desarrolla la bacteria (Alanis, 2005).

La resistencia adquirida por mutación se desarrolla como resultado de un cambio espontáneo en un locus del cromosoma microbiano que controla la susceptibilidad a un antibiótico determinado. Las mutaciones espontáneas habitualmente provocan modificaciones en un lugar diana del antimicrobiano (por ejemplo cambios cromosómicos que provocan resistencia a quinolonas) y que se transmiten de forma vertical. Las mutaciones pueden contribuir también a la resistencia a antibióticos causando la superproducción de bombas de expulsión (Beinlich *et al.*, 2001) o lugares diana (Flensburg y Sköld, 1984). Las mutaciones son relativamente raras y ocurren con una probabilidad baja, de aproximadamente 1 por cada 10^7 a 10^{10} células (Mulvey y Simor, 2009). La extremadamente elevada tasa de replicación de las bacterias posibilita la aparición de estas

mutaciones. No obstante, el mayor motivo de preocupación en relación con la resistencia a antibióticos se asocia con la existencia de sistemas de transferencia de genes extracromosómicos entre bacterias, tanto de forma horizontal como vertical. La transferencia horizontal de genes juega un papel relevante en la diseminación de resistencias, que puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre diferentes especies o géneros presentes en el mismo nicho ecológico. Este hecho es enormemente preocupante ya que posibilita que los determinantes de resistencia a antibióticos pasen de bacterias no patógenas a bacterias patógenas. En este sentido, la comunidad científica asume que hay un reservorio de genes de resistencia en las distintas poblaciones microbianas (microbiota humana o animal, alimentos, superficies y ambiente). Cuanto mayor sea la cuantía de este reservorio, mayor será la probabilidad de que estos genes sean adquiridos por las bacterias patógenas. Los genes que codifican para la producción de enzimas que modifican la estructura del antibiótico (por ejemplo penicilinasas), así como los genes que provocan modificaciones en los lugares diana o que incrementan la síntesis de bombas de expulsión son habitualmente transferibles.

Finalmente, cabe señalar que la adquisición de nuevos determinantes de resistencia puede ser beneficiosa para la bacteria bajo determinadas condiciones de estrés, si bien suele tener un coste importante en ausencia de presión selectiva. Sin embargo, las bacterias pueden adaptarse a las diferentes condiciones ambientales, con el objetivo de reducir este coste, mediante mutaciones compensatorias o la regulación de la expresión de esa resistencia. Estos mecanismos compensatorios permiten a la bacteria persistir incluso en ausencia de la presión selectiva producida por antibióticos (Kempf y Zeitouni, 2009).

2.2. Diseminación de las resistencias a antibióticos

La selección de bacterias resistentes se traduce en la selección de genes de resistencia que pueden diseminarse y propagarse a otras bacterias. Las bacterias son particularmente eficientes en el mantenimiento y diseminación de estas resistencias dada su habilidad para multiplicarse con rapidez, pasando los genes de resistencia a su progenie durante la multiplicación celular (transmisión vertical). Por otro lado, y como se ha indicado en los párrafos precedentes, las bacterias pueden también diseminar los genes de resistencia mediante mecanismos de transferencia horizontal (conjugación, transducción y transformación). La estrategia más común y eficiente de transferencia de genes consiste en

el paso de plásmidos (fragmentos circulares de ácido desoxirribonucleico -ADN- extracromosómico que se pueden replicar independientemente del cromosoma) a través de estructuras tubulares proteicas, denominadas *pili*, que conectan de forma temporal las bacterias donantes y receptoras y permiten el paso de estos fragmentos de ADN a su través, dejando siempre una copia de la información en la bacteria donante, y multiplicando así la resistencia a antibióticos a lo largo de las sucesivas generaciones de una población. Los plásmidos pueden transferirse tanto vertical como horizontalmente, estimándose que la mayor parte de la resistencia adquirida está mediada por plásmidos (Alanis, 2005).

Las bacterias pueden también adquirir genes de resistencia por la difusión de transposones o integrones. Los transposones son fragmentos de ADN especializados que pueden portar diferentes genes de resistencia. No tienen la capacidad de autorreplicarse pero pueden moverse dentro del genoma, facilitando la migración de los genes de resistencia (por ejemplo del cromosoma al plásmido). Así, la resistencia codificada en el cromosoma puede diseminarse horizontalmente ya que los genes de resistencia están habitualmente localizados en los transposones. Los integrones pueden también portar diferentes genes de resistencia. Los integrones no pueden moverse, pero codifican para mecanismos que les permiten tanto la captura como la escisión de genes de resistencia a antibióticos, incrementando así la movilidad horizontal de estos genes. Los integrones se encuentran habitualmente en plásmidos, pero pueden también estar integrados en los cromosomas, como ocurre en el caso de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium DT 104 (SCENIHR, 2009).

La transducción es otra forma de transmisión de genes de resistencia a antibióticos y ocurre con la ayuda de un "vector", generalmente un virus (bacteriófago) capaz de infectar a la bacteria. La transformación es un tercer mecanismo de transferencia genética y tiene lugar cuando se produce el paso directo de ADN de una bacteria (generalmente inactivada que presenta soluciones de continuidad y que se encuentra próxima a la bacteria receptora) a otra. La bacteria receptora incorpora el ADN libre en su propio genoma de forma estable (Alanis, 2005).

La probabilidad de transferencia horizontal varía ampliamente entre grupos bacterianos. Así, las especies del género *Enterococcus* y de la familia *Enterobacteriaceae* han desarrollado mecanismos altamente eficientes de transferencia de genes, de forma que

en los hábitats habituales de estos grupos (intestino humano y animal) es esperable una elevada frecuencia de intercambio de genes entre especies no relacionadas (incluyendo el paso de genes a cepas de microorganismos patógenos). Por ello, *Enterococcus* spp. y *Escherichia coli* son considerados como indicadores o centinela de resistencia a antibióticos. Por otro lado, el riesgo de transferencia horizontal de genes de resistencia es medio o bajo en el caso de, por ejemplo, *Lactococcus* spp. y *Bacillus* spp., respectivamente (SCENIHR, 2009).

La cuestión de la transferencia horizontal de genes de resistencia se considera un riesgo tanto directo como indirecto en la Industria Alimentaria. El riesgo directo está en relación con la presencia en los alimentos de bacterias patógenas (responsables de enfermedades transmitidas por alimentos) resistentes a antibióticos, que pueden transmitirse al consumidor por ingestión o contacto y causar enfermedad (EFSA, 2008a; Hald *et al.*, 2007). El riesgo indirecto para la salud humana consiste en la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (plásmidos, transposones o integrones con genes de resistencia a antibióticos) desde bacterias no patógenas (comensales, probióticas o tecnológicas) hasta bacterias patógenas. Esta transferencia horizontal puede ocurrir en diferentes puntos relacionados con la cadena alimentaria: en el ambiente (por ejemplo efluentes), en las superficies de las instalaciones y equipos de las industrias alimentarias, en los alimentos o en el cuerpo de las personas y animales (por ejemplo tracto intestinal o piel) (Lester *et al.*, 2006). Habitualmente ambos riesgos coexisten. La contribución relativa de cada etapa de la cadena alimentaria al riesgo indirecto no ha sido bien determinada hasta el momento, si bien los investigadores enfatizan la importancia que parecen tener tanto las aguas residuales como el tracto intestinal de los animales de abasto y seres humanos en la transferencia de genes de resistencia (Hunter *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). De hecho, se ha sugerido que un bajo nivel de cepas resistentes en el cuerpo humano debería ser un objetivo de Salud Pública, de la misma manera que lo son los niveles de tensión arterial o de colesterol plasmático (Nijsten *et al.*, 1994).

2.3. Mecanismos de resistencia a antibióticos

Los compuestos antimicrobianos presentan varios mecanismos de actuación, por ejemplo dificultando o inhibiendo la síntesis de la pared celular (penicilinas), actuando sobre diferentes partes de las células bacterianas (inhibiendo su síntesis), como el ADN o el ácido

ribonucleico –ARN- (quinolonas), las proteínas (tetraciclinas) o modificando algunas rutas metabólicas (sulfonamidas) (Rosenblatt-Farrell, 2009). Las estrategias microbianas para resistir los efectos de los antimicrobianos incluyen la formación de biopelículas o *biofilms*, cambios en la permeabilidad de la superficie celular, expulsión o inactivación enzimática de los compuestos antes de que alcancen los *targets* o lugares diana, modificación o sobreproducción de los lugares diana y adquisición de rutas metabólicas alternativas a aquellas inhibidas por el compuesto (IFT, 2006; Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Al contrario que los antibióticos, los biocidas tienen varios lugares diana en las células microbianas. Así, la emergencia de susceptibilidad reducida a estos compuestos está a menudo mediada por mecanismos inespecíficos que provocan un descenso en la concentración intracelular de los biocidas (por ejemplo cambios en la permeabilidad celular o bombas de expulsión), y es poco probable que sea causada por la modificación de los lugares diana o de determinadas rutas metabólicas. La modificación de los lugares diana ha sido descrita en raras ocasiones como mecanismo de resistencia a los biocidas (por ejemplo resistencia al triclosán cuando se usa a bajas concentraciones) y no parece ser un mecanismo ampliamente difundido en las bacterias, si bien es cierto que son escasos los datos existentes al respecto (Gómez-Escalada *et al.*, 2005; SCENIHR, 2009). Lo más habitual es que varios mecanismos de resistencia participen de forma simultánea en el caso de los biocidas (EFSA, 2008b).

3. PAPEL DE LA INDUSTRIA ALIMENTARIA EN LA EMERGENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

La presión selectiva provocada por el consumo de antibióticos, tanto en medicina humana como en producción animal, es el principal factor de riesgo para la emergencia de resistencia a antibióticos. A mayor consumo de antibióticos (especialmente cuando su uso es inapropiado) mayores son las probabilidades de desarrollo de resistencia a antibióticos (Daikos *et al.*, 2008). Además, recientemente, está siendo estudiado el papel de la Industria Alimentaria en la emergencia de bacterias resistentes a antibióticos, y es un motivo importante de preocupación la posibilidad de transmisión de bacterias resistentes a lo largo de la cadena alimentaria.

Existen cuatro vías principales que pueden favorecer la generación de resistencia a antibióticos en la Industria Alimentaria: uso de antimicrobianos a lo largo de la cadena alimentaria, cultivos genéticamente modificados, microorganismos empleados en la producción de alimentos con finalidad probiótica o tecnológica y tratamientos tecnológicos aplicados en condiciones subletales. En esta Introducción se tratará ampliamente la primera de estas vías (uso de antimicrobianos) por su relación con la presente Tesis Doctoral. El resto de factores que pueden favorecer la emergencia y diseminación de resistencia a antibióticos en la Industria Alimentaria han sido recientemente revisados (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

3.1. Compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria

Durante la producción de alimentos se utilizan diferentes compuestos antimicrobianos con el fin de mejorar la eficiencia de los sistemas y de garantizar la calidad y seguridad de los productos. En la Tabla 1 se muestran los principales compuestos antimicrobianos empleados en la Industria Agroalimentaria.

3.1.1. Antibióticos

3.1.1.1. Uso de antibióticos en producción animal. Los antibióticos han sido empleados en animales productores de alimentos desde hace más de 60 años para tratar, controlar o prevenir enfermedades infecciosas, así como para mejorar la eficiencia de utilización del pienso y la ganancia media diaria. Tanto en los países de Norteamérica como en Europa, se estima que el 50%, en peso, de los antibióticos consumidos se destinan a los animales productores de alimentos (WHO, 2002). Algunos datos más concretos se refieren a 1997, año en que se consumieron aproximadamente 11.000 toneladas de antibióticos en la Unión Europea, la mitad en cría animal (54 mg/kg para tratamiento, profilaxis y metafilaxis, y 31 mg/kg como promotores del crecimiento) y la mitad en medicina humana (241 mg/kg) (Ungemach, 2000). Más recientemente, Kools *et al.* (2008) estimaron el uso de antibióticos en medicina veterinaria en 25 países de la UE en 5.393 toneladas, siendo los más empleados los antibióticos de las familias de las tetraciclinas y beta-lactámicos, así como las sulfamidas. En los Estados Unidos se usaron en 2007 aproximadamente 12.650 toneladas de antibióticos en medicina veterinaria (40% tetraciclinas), siendo aproximadamente el 13% del total consumidos como promotores del crecimiento (AHI, 2008).

Tabla 1. Definición de los principales compuestos antimicrobianos usados a lo largo de la cadena alimentaria (EEA, 2010; IFT, 2006; OJEC, 1998a; 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 (por ejemplo penicilina), semisintético (por ejemplo metilicina) o sintético (por ejemplo sulfonamidas). Los antibióticos se emplean también en animales productores de alimentos con el objetivo de prevenir 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 (por ejemplo carbendazim, difenoconazol, fludioxonil o 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 preservar los piensos del deterioro causado por microorganismos (por ejemplo ácido cítrico, ácido láctico, benzoato sódico o sorbato sódico).
 - 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 (por ejemplo fosfato trisódico, nitrito sódico, ácido benzoico o ácido láctico).
 - 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 (por ejemplo fosfato trisódico, clorito sódico acidificado, dióxido de cloro, peroxiácidos o ácido láctico).
 - 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 y rodaluvios localizados a la entrada de las explotaciones ganaderas, desinfección de materiales durante los brotes de enfermedades infecciosas), 3) desinfectar la superficie de los animales (baños de pezones o limpieza de ubres) y 4) preservar productos específicos, como huevos de peces o semen. Algunos ejemplos de desinfectantes incluyen hipoclorito sódico, compuestos de amonio cuaternario, etanol o formaldehído.
-

La emergencia en la última década de microorganismos patógenos para el hombre con resistencias múltiples ha dirigido la atención, entre otros aspectos, al uso veterinario de estos fármacos. Así, la Organización Mundial de la Salud ha reconocido que el empleo de antibióticos en animales tiene probablemente un impacto importante en la incidencia de la resistencia a antibióticos en microorganismos de origen humano, y ha publicado numerosos documentos enfatizando esta circunstancia (WHO, 2004, 2009). Diversos estudios realizados hasta el momento ponen de manifiesto que el uso de antibióticos en cría animal provoca la aparición de nuevos determinantes de resistencia entre las bacterias presentes en los animales tratados y conduce a un incremento de la frecuencia de estos determinantes una vez que han aparecido.

El principal motivo de preocupación derivado del uso de antimicrobianos en producción animal radica en la posibilidad de que se produzca selección de resistencia a estos agentes en bacterias zoonóticas de origen intestinal y que estos microorganismos se transmitan al hombre a través de los alimentos, provocando infecciones de difícil tratamiento. Además, las bacterias comensales presentes en el intestino humano o animal pueden transferir horizontalmente sus genes de resistencia a microbiota previamente susceptible. De hecho, los genes involucrados en resistencia a antibióticos de uso exclusivo en veterinaria se han aislado no solo de cepas de origen animal, sino también de microorganismos de origen humano, tanto microbiota comensal como patógenos zoonóticos (por ejemplo *Salmonella*) e incluso patógenos estrictamente humanos (por ejemplo *Shigella*). Este hecho pone de manifiesto que entre seres humanos y animales se produce el paso no solo de cepas resistentes, sino también de genes de resistencia (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que el uso inadecuado de antibióticos es un factor crítico en la selección de resistencia. En cría animal hay numerosos ejemplos de lo que puede ser un uso inadecuado de antibióticos (por ejemplo el empleo de antibióticos a dosis subterapéuticas como promotores del crecimiento). Además, al contrario de lo que ocurre en medicina humana, donde cada paciente recibe de forma individual la dosis de antibiótico correspondiente, la administración de antibióticos en las explotaciones ganaderas suele hacerse de forma conjunta a todos los animales. La medicación en masa es un procedimiento que favorece la emergencia y la selección de resistencia a antibióticos. Este hecho ha sido reconocido y abordado en diferentes informes (WHO, 2009). Por otro

lado, en producción primaria de alimentos existen condiciones que favorecen la diseminación de las bacterias, como es la elevada densidad de animales en las explotaciones. Además, los antibióticos se administran en ocasiones sin haber realizado un diagnóstico previo y, puesto que el tratamiento es empírico, suelen usarse compuestos de amplio espectro. Se ha demostrado que a mayor uso de antibióticos de amplio espectro, mayores son las probabilidades de desarrollo de resistencia a antibióticos (Alanis, 2005). Finalmente, hay que señalar la posibilidad de que los veterinarios pueden dispensar antibióticos a los granjeros de forma directa, lo que podría permitir a éstos el empleo de dichos compuestos con un escaso control.

Por otro lado, y puesto que una vez administrados los antibióticos se liberan al ambiente como consecuencia de su uso, la posible adquisición de resistencia por parte de los microorganismos patógenos presentes en el ambiente supone un motivo adicional de preocupación. Tanto los antibióticos de uso en medicina humana como en veterinaria se excretan a menudo sin sufrir ningún tipo de modificación. Los fármacos excretados pueden persistir en el ambiente, creando así la oportunidad para la selección de resistencia en las poblaciones bacterianas expuestas (Rosenblatt-Farrell, 2009). En este sentido se ha observado, por ejemplo, que la microbiota bacteriana recogida de las zonas que rodean una explotación de producción avícola presentan patrones de resistencia a antibióticos consistentes con los tipos de antibióticos que se usan en dicha explotación (Graham *et al.*, 2009).

Si bien está perfectamente demostrado que algunas bacterias resistentes a antibióticos llegan a los consumidores a lo largo de la cadena alimentaria (por ejemplo *multidrug-resistant* [MDR] *Salmonella* Newport), la magnitud y consecuencias clínicas de esa circunstancia permanecen inciertas (EFSA, 2008a; Varma *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la contribución media de las fuentes animales a la resistencia a antibióticos observada en seres humanos es de aproximadamente un 5% (Bywater y Casewell, 2000). Además, las infecciones zoonóticas humanas (por ejemplo *Salmonella* y *Campylobacter*) requieren solo en escasas ocasiones de terapia antibiótica, por lo que el impacto del uso de antibióticos en animales sobre la resistencia a antibióticos en infecciones humanas parece ser mínimo. En este sentido existe cierto grado de controversia, y hay quien argumenta que el impacto que tiene el empleo de antibióticos en animales es escaso en comparación con el uso en

medicina humana, debiendo concentrarse los esfuerzos en limitar el empleo inadecuado de antibióticos en seres humanos. Otros investigadores, por el contrario, ponen de relieve los peligros del uso innecesario de antibióticos en producción animal, sobre todo los promotores del crecimiento.

Antibióticos de uso terapéutico

Los antibióticos se emplean en el tratamiento, prevención y control de muchos tipos de infecciones en animales de abasto. Su uso se asocia con la selección de microorganismos resistentes a antibióticos, que es un fenómeno indeseable pero inevitable. Puesto que muchos antibióticos se emplean tanto en medicina humana como en producción animal, el impacto de estas resistencias es un motivo de gran preocupación. Desde una perspectiva de Salud Pública, las clases de antibióticos que merecen especial atención en este contexto son las quinolonas, las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los macrólidos (WHO, 2007). Con el objetivo de minimizar la aparición de resistencia y maximizar la efectividad terapéutica de los antibióticos, se han publicado diversas recomendaciones para un uso responsable y adecuado de estos compuestos en medicina veterinaria (FVE, 2002; OIE, 2010; WHO, 2000, 2001, 2009).

Además de los peligros señalados en párrafos precedentes, el uso de antibióticos en producción animal se asocia al riesgo de la presencia de residuos en los alimentos de origen animal. Así, el informe de 2007 sobre presencia de residuos en alimentos de origen animal en la UE (European Commission, 2008) incluye un 0,27% de las muestras (especialmente carne, leche y miel) con resultados no satisfactorios por la presencia de compuestos antimicrobianos. En el informe de 2008 del RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*), el 3,4% (107 de 3.139) de las notificaciones de alertas e informaciones se debieron a residuos de productos usados en medicina veterinaria (especialmente nitrofuranos, cloranfenicol, sulfamidas y eritromicina) en alimentos de origen animal (principalmente miel/jalea real y pescados) (European Commission, 2009a). Las posibles consecuencias de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos están en relación con reacciones tóxicas o alérgicas en los consumidores, así como con la emergencia de cepas resistentes a antibióticos en el tracto gastrointestinal. Con el objetivo de minimizar estos riesgos, las autoridades de la Unión Europea han tomado diversas medidas legislativas a lo largo de las últimas décadas, incluyendo, entre otras, el desarrollo de programas de control para

monitorizar la presencia de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal (OJEC, 1996), el establecimiento de criterios para los productos médicos veterinarios (OJEC, 2001a; OJEU, 2009a) y de límites máximos de residuos para estos compuestos en los alimentos de origen animal (OJEC, 1990), así como la creación de diversas instituciones (*European Medicines Agency*, EMEA; *Committee for Veterinary Medicinal Products*) (OJEU, 2004a; Companyó *et al.*, 2009).

Antibióticos promotores del crecimiento (APC)

El efecto promotor del crecimiento de los antibióticos fue descubierto en los años 1940s, cuando se observó que los animales que consumían pienso con micelio de *Streptomyces aureofaciens* que contenía residuos de clortetraciclina mejoraban su velocidad de crecimiento (Castanon, 2007). Los mecanismos de acción de los antibióticos promotores del crecimiento están principalmente relacionados con su efecto sobre la microbiota del tracto gastrointestinal. Así, se produce un descenso en la competición por los nutrientes y una reducción de los metabolitos microbianos que deprimen el crecimiento. Un efecto adicional es la reducción del grosor de la pared gastrointestinal, que favorece la absorción de los nutrientes. Finalmente, se ha observado también una reducción en los niveles de microorganismos patógenos oportunistas y de las infecciones subclínicas (Dibner y Richards, 2005).

La FDA (*Food and Drug Administration*) de los EE.UU. aprobó en 1951 el uso de antibióticos promotores del crecimiento, como aditivos, sin necesidad de prescripción veterinaria. En las décadas de 1960s y 1970s cada miembro de la UE aprobó su propia normativa nacional en relación con el uso de antibióticos en piensos animales. Posteriormente se publicó la Directiva del Consejo 70/524, y modificaciones posteriores, con la intención de armonizar las normas existentes en relación con los aditivos en piensos. Como resultado de las recomendaciones del Informe Swann en 1969 (que alertaba del uso indiscriminado de los antibióticos promotores del crecimiento), dejaron de usarse como promotores del crecimiento, en la mayoría de los estados miembros, moléculas empleadas en medicina humana o veterinaria. No obstante, siguieron usándose durante años como promotores del crecimiento moléculas análogas estructurales de algunos antibióticos de importancia clínica, con el consiguiente riesgo de resistencia cruzada (Van den Bogaard y Stobberingh, 2000).

El posible riesgo asociado con la presencia de residuos de los APC en los alimentos de origen animal que pudiese producir reacciones alérgicas o tóxicas está minimizado por el hecho de que solamente los antibióticos que no pueden absorberse en el tracto digestivo se usan como promotores del crecimiento (Donoghue, 2003). Otra cosa es la posibilidad de emergencia de resistencia a antibióticos y transferencia de genes de resistencia desde la microbiota animal a la humana, que ha sido objeto de preocupación durante años. La evidencia obtenida en los países nórdicos (principalmente Suecia y Finlandia, donde el uso en piensos de aditivos de diferentes grupos de antibióticos fue prohibido con anterioridad a la entrada de estos países en la Unión Europea, en 1995), junto con las conclusiones de la Organización Mundial de la Salud (*World Health Organization*; WHO, 1997) y el Comité Económico y Social de la Unión Europea (*Economic and Social Committee of the European Union*, 1998) han conducido a la prohibición progresiva de los APC en la Unión Europea.

En la década de 1990s, se puso de manifiesto que el APC avoparcina, perteneciente, al igual que la vancomicina, a la familia de los glucopéptidos, provoca la selección en animales de cepas de *Enterococcus faecium* resistentes no solo a la avoparcina, sino también a la vancomicina. Este hallazgo provocó preocupación entre la comunidad científica, puesto que el uso de la avoparcina podría crear un reservorio animal de enterococos resistentes a la vancomicina (*vancomycin-resistant enterococci*; VRE), representando un riesgo potencial para la Salud Pública, puesto que los VRE son una causa frecuente de infecciones nosocomiales (WHO, 2003) y pueden asimismo ser transmitidos por alimentos contaminados (ECDC/EFSA/EMEA/SCENIHR, 2009; Peters *et al.*, 2003). En los países donde la avoparcina no ha sido nunca usada (por ejemplo Suecia y los EE.UU.) se han encontrado bajos niveles de VRE tanto en heces de animales de abasto como de humanos sanos fuera del ámbito hospitalario (Bager *et al.*, 1997; Coque *et al.*, 1996). El argumento en contra del uso de la avoparcina es que su empleo continuado en producción animal podría facilitar la diseminación de resistencia a vancomicina en seres humanos. Así, la avoparcina fue eliminada del mercado de la Unión Europea como medida de precaución para preservar la utilidad clínica de la vancomicina (OJEC, 1997).

En los meses de julio y septiembre de 1999, otros APC fueron prohibidos por las autoridades de la UE al pertenecer a clases de antimicrobianos usados también en medicina humana: bacitracina de zinc (un polipéptido), espiramicina y fosfato de tilosina (macrólidos) y

virginiamicina (una estreptogramina) (OJEC, 1998b), o bien por representar un riesgo toxicológico ocupacional inaceptable (olaquinox y carbadox) (OJEC, 1998c). En el año 2006, y en base al Principio de Precaución, los últimos cuatro APC que se estaban usando en la UE fueron prohibidos (OJEU, 2003a): avilamicina (oligosacárido), flavofosfolipol (fosfoglicolípido), monensina y salinomycin (poliéteres). Desde enero de 2006, solo los coccidiostáticos e histomonostatos se permiten como aditivos de piensos en la Unión Europea. Actualmente se está estudiando la posibilidad de utilizar diferentes sustancias, como enzimas, prebióticos, probióticos o ácidos como alternativas a los APC (Castanon, 2007; Rosen, 2004).

En el momento actual resulta complicado estimar las consecuencias que la prohibición de APC tendrá en la UE. En los países nórdicos, parece que la prohibición de estos compuestos, hace ya algunos años, no ha logrado el efecto deseado de disminuir la prevalencia de infecciones humanas por bacterias resistentes a antibióticos. Algunos autores incluso resaltan los posibles efectos negativos de esta prohibición, relacionados con un incremento en el uso terapéutico de antibióticos, que ha conllevado consecuencias negativas para la salud y el bienestar animal e incluso repercusiones económicas para los ganaderos (Casewell *et al.*, 2003; Phillips, 2007; Wierup, 2001). Los principales efectos de la prohibición de los APC en los países nórdicos han sido ampliamente revisados recientemente (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

3.1.1.2. Antibióticos en acuicultura

La producción de especies acuáticas (pescados, mariscos y otros) se ha incrementado sustancialmente en la última década, pasando de 10 millones a 50 millones de toneladas, lo que supone casi el 50% del consumo de especies acuáticas (Cole *et al.*, 2009). Este incremento en la producción se ha acompañado por un aumento de la preocupación por las enfermedades en especies acuáticas, incluyendo enfermedades infecciosas. Algunas estimaciones indican que la cantidad de antibióticos usados por tonelada de producto varía entre 2 g (Noruega) y 40-100 g (Dinamarca, Francia o Grecia). Fuera de la Unión europea se han recogido valores tan elevados como 200 g (Chile) ó 700 g (Vietnam) (WHO, 2006).

Ningún antibiótico se ha desarrollado específicamente para ser aplicado en acuicultura, y los que se usan en este ámbito han sido desarrollados para el tratamiento de infecciones

en seres humanos o animales terrestres. Los antibióticos de mayor uso en acuicultura son oxitetraciclina, trimetoprim-sulfadiacina (o bien ormetoprim-sulfadimetoxina en los países del continente americano), ácido oxolínico y/o flumequine y florfenicol (WHO, 2006). Tanto en la UE como en los EE.UU., los antibióticos en acuicultura están únicamente autorizados para tratar enfermedades y no pueden usarse como profilácticos o promotores del crecimiento. A la hora de tratar las enfermedades infecciosas, los antibióticos se incorporan en los piensos, no pudiendo añadirse directamente al agua.

El impacto que para la Seguridad Alimentaria y la Salud Pública podría tener el empleo de antibióticos en acuicultura incluye: 1) la emergencia y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos, 2) la diseminación de genes de resistencia y 3) la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos. Las bacterias resistentes pueden causar infecciones en seres humanos por el consumo de productos de acuicultura contaminados o de agua de bebida, o bien por el contacto directo con agua, organismos acuáticos o productos de acuicultura. Hay que señalar, no obstante, que este riesgo se considera relativamente bajo ya que la mayoría de los microorganismos patógenos de origen acuático no causan infecciones en animales terrestres o seres humanos debido a su incapacidad para multiplicarse a nuestra temperatura corporal (IFT, 2006).

Por lo que respecta a los genes de resistencia a antibióticos, su diseminación desde microorganismos de origen acuático a patógenos humanos ha sido ampliamente documentada. Así, por ejemplo, se ha puesto de manifiesto la transferencia de plásmidos de resistencias múltiples a *Escherichia coli* desde *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella tarda*, *Citrobacter freundii*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio salmonicida* (Sørum, 2006).

Por último, por lo que hace referencia a la presencia de residuos de antibióticos, según el informe del RASFF de 2008, el 59% de las notificaciones de residuos de productos de medicina veterinaria se asociaron con crustáceos (55%, cloranfenicol y nitrofurantoína) y pescado (4%, verde malaquita) (European Commission, 2009a).

3.1.1.3. Antibióticos en agricultura

La cuantía de antibióticos que se emplean en cultivos vegetales es mínima en relación con su uso en seres humanos y animales. En la Unión Europea, no hay antibióticos

autorizados para su aplicación en plantas (European Commission, 2009b). Sin embargo en los EE.UU., la estreptomicina y la oxitetraciclina se han usado durante décadas como tratamientos preventivos para el control de bacterias en diferentes alimentos de origen vegetal, principalmente *Erwinia amylovora*, el agente causal del fuego bacteriano, y *Pseudomonas syringae*, responsable de las manchas bacterianas en las manzanas. Los árboles frutales (principalmente los productores de tres tipos de frutas: manzana, pera y melocotón) reciben la mayor parte de los antibióticos de empleo en cultivos vegetales en los EE.UU. Los antibióticos son aplicados únicamente cuando los árboles están en flor, por lo que las frutas no contactan con los compuestos. Algunas estimaciones indican que entre el 0,1% y el 0,5% del uso total de antibióticos en los EE.UU. se usa en cultivos vegetales (McManus *et al.*, 2002; Vidaver, 2002). La gentamicina se ha usado en México y América Central durante años para el control del fuego bacteriano. Sin embargo, se trata de un antibiótico de gran importancia clínica, por lo que su uso ha sido prohibido en los EE.UU.

Por lo que respecta a los residuos de antibióticos, su presencia en las plantas no ha sido tradicionalmente considerada preocupante por lo que respecta a la posibilidad de incrementar la resistencia a antibióticos (Vidaver, 2002). Por otro lado, la resistencia a antimicrobianos en microorganismos patógenos de plantas plantea cierta inquietud respecto a la posibilidad de que pueda comprometer el uso de estos compuestos en el tratamiento de infecciones humanas. Sin embargo, la mayor preocupación en relación con el uso de antimicrobianos en cultivos vegetales se debe a la diseminación de los compuestos en el medio ambiente, que podría favorecer la aparición de genes de resistencia. Así, en ciertas bacterias patógenas de las plantas se ha detectado resistencia a compuestos antimicrobianos, especialmente estreptomicina (McManus, 2000). Como conclusión a este punto, cabe señalar que no existen datos que indiquen que, en condiciones naturales, pueda producirse transferencia de determinantes de resistencia a antibióticos desde bacterias patógenas de las plantas hasta bacterias responsables de enfermedad humana (McManus *et al.*, 2002).

3.1.2. Fungicidas

La mayoría de los antimicrobianos empleados en producción vegetal son fungicidas. Actualmente los fungicidas usados para tratar micosis en medicina humana o veterinaria son diferentes a los empleados en cultivos vegetales. Sin embargo, en algunos casos ambos

grupos de compuestos presenten los mismos lugares diana, por lo que existe cierta preocupación en relación con el uso de fungicidas en agricultura (Hof, 2001; IFT, 2006).

En la Unión Europea, los residuos de antimicrobianos en frutas y vegetales son monitorizados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (OJEU, 2005a). En el informe anual sobre residuos de pesticidas de los 27 Estados Miembros, Noruega y Finlandia del año 2007 (EFSA, 2009b) se incluyeron un total de 74.305 muestras analizadas (frutas y vegetales, cereales, muestras de comidas para bebés y de comidas preparadas). Un total del 3,99% de las muestras excedían los límites legales, particularmente en el grupo de frutas y verduras y de comidas preparadas. Los fungicidas (incluyendo tiabendazol y tebuconazol) fueron los pesticidas más frecuentemente encontrados en las muestras de frutas y vegetales.

Con respecto al informe RASFF del año 2008, se incluyeron 178 notificaciones (5,6% del total) en relación con residuos de pesticidas (European Commission, 2009a), siendo las frutas y vegetales los productos involucrados. Hay que señalar que acaricidas e insecticidas supusieron la mayor proporción de las notificaciones.

3.1.3. Biocidas

Evidencias científicas obtenidas recientemente sugieren que la presión selectiva ejercida por el uso de biocidas, incluyendo aquellos compuestos ampliamente usados en la Industria de Alimentos, podría contribuir a la expresión y diseminación de mecanismos de resistencia a antibióticos. Parece razonable asumir esta posibilidad puesto que los biocidas y antibióticos puede compartir *targets* o lugares diana en las bacterias, y ambos tipos de antimicrobianos pueden desencadenar mecanismos de resistencia frente a ellos (Sheldon, 2005). El uso de biocidas podría contribuir a incrementar la resistencia a antibióticos a través de cuatro mecanismos diferentes, que se mencionan a continuación.

- **Resistencia cruzada.** Este fenómeno ocurre cuando un compuesto antimicrobiano selecciona (presión selectiva) un gen que expresa mecanismos de resistencia comunes a diferentes grupos de antimicrobianos. Los principales mecanismos implicados en la resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos son la impermeabilidad de las cubiertas celulares y la expresión de bombas de expulsión (Thorrold *et al.*, 2007; Tkachenko *et al.*, 2007). Si bien algunos autores han descrito

la formación de *biofilms* como mecanismo de resistencia cruzada entre biocidas y antibióticos, hay muy poca información disponible en relación con este fenómeno en las bacterias sésiles. Por ejemplo, Potenski *et al.* (2003) han observado en cepas de *Salmonella* resistencia cruzada entre aditivos (nitrato sódico) y tetraciclinas, como consecuencia de la expresión incrementada de bombas de expulsión inespecíficas. 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 tiene como resultado una disminución temporal en la susceptibilidad a varios antimicrobianos no relacionados (biocidas y/o antibióticos) (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a, b; IFT, 2006; Mah y O'Toole, 2001).

- **Co-resistencia.** Este fenómeno tiene lugar cuando un antimicrobiano selecciona un gen que codifica para resistencia a dicho compuesto, y este gen está físicamente unido a otro gen que expresa resistencia a otros antimicrobianos. Ambos genes están incluidos en elementos genéticos mayores (plásmidos, transposones, integrones) y son transferidos y expresados de forma conjunta. Esto ocurre, por ejemplo, el caso de la tolerancia a los compuestos de amonio cuaternario y la resistencia a los antibióticos beta-lactámicos en las bacterias Gram-positivas (Sidhu *et al.*, 2002).
- El empleo de un biocida puede seleccionar **clones** que son resistentes tanto a biocidas como a antibióticos, 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). En este sentido, señalar que en un estudio recientemente realizado utilizando cepas de *Salmonella* de origen avícola se puso de manifiesto una relación directa y significativa entre la resistencia al clorito sódico acidificado (CSA), medida como valores D o tiempos de reducción decimal, y la resistencia a antibióticos, cuantificada en función del número de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes (Capita, 2007).

- Las situaciones de estrés, incluyendo la exposición a antimicrobianos, pueden aumentar la capacidad de las bacterias para reparar su ADN mediante la activación de la **respuesta SOS**. Esta respuesta SOS es un mecanismo de regulación muy distribuido encaminado a corregir el daño a los ácidos nucleicos (por ejemplo el causado por un biocida o un antibiótico) reparando o evitando las regiones lesionadas (Erill *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que la respuesta SOS controla la activación de los integrones. Los integrones son fragmentos complejos de ADN capaces de integrar y regular la expresión de diferentes genes de resistencia a antibióticos, siendo así capaces de conferir resistencias múltiples (Guerin *et al.*, 2009).

La cantidad total de biocidas consumidos en la Unión Europea ha aumentado a un ritmo del 4-5% cada año en la última década. 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 y, recientemente, diferentes comités científicos de la Unión Europea (European Commission, 1999, 2001, 2006b; EFSA, 2008a, b; SCENIHR, 2009; SCHER-SCENIHR, 2008) han publicado informes enfatizando este tema. Estos informes plantean dudas sobre la inocuidad de los biocidas, especialmente cuando se usan de forma inadecuada.

A pesar de su interés, la resistencia bacteriana a los antibióticos como consecuencia del uso de biocidas está siendo estudiada y caracterizada desde hace poco tiempo y las investigaciones realizadas hasta el momento son muy escasas, limitándose a un grupo reducido de moléculas y grupos bacterianos. Por ello, en este momento, parece difícil valorar correctamente el riesgo de resistencia a antibióticos inducida por el uso de biocidas. Además, los estudios realizados hasta la fecha presentan amplias diferencias en la metodología utilizada para realizar los experimentos, así como diferentes resultados, por lo que existen grandes controversias sobre la probabilidad real de que el empleo de biocidas a dosis subinhibitorias pueda, además de reducir la efectividad de estos compuestos, alterar los patrones bacterianos de susceptibilidad a antibióticos. La escasez de datos disponibles hace imposible cuantificar el impacto que el uso de biocidas puede tener en el desarrollo, selección, supervivencia y diseminación de cepas resistentes a antibióticos y, en este

sentido, diferentes autoridades sanitarias señalan la necesidad de realizar nuevos estudios para determinar qué biocidas y qué condiciones de uso están asociados con un mayor riesgo de generar resistencia a antibióticos (SCENIHR, 2009).

3.1.3.1. Aditivos de piensos

Diversos compuestos antimicrobianos pueden añadirse a los piensos para reducir la carga microbiana y controlar el crecimiento de microorganismos alterantes. En la Unión Europea, los aditivos de piensos se consideran “aditivos tecnológicos” (OJEU, 2003a). Con anterioridad a su autorización deben ser sometidos a una evaluación de su seguridad por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*, EFSA). La mayoría de los productos autorizados con esta finalidad son ácidos orgánicos (SCENIHR, 2009).

3.1.3.2. Descontaminantes

La prevalencia y/o niveles de microorganismos en los alimentos frescos (por ejemplo carne y productos vegetales) puede controlarse aplicando un sistema de control integrado a lo largo de toda la cadena alimentaria (“*de la granja a la mesa*”). Además, y como medida complementaria, pueden aplicarse a esos alimentos tratamientos físicos, químicos o biológicos con el objetivo de mejorar su seguridad y su estabilidad mediante la inactivación o inhibición del crecimiento de los microorganismos patógenos o alterantes presentes.

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 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, 2004b), 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. Puesto que la autorización de estos tratamientos debe ir precedida por una demostración de que son seguros, teniendo en cuenta la microbiota patógena potencialmente implicada, varios Comités Científicos de la Unión Europea han examinado el posible desarrollo de resistencia a antibióticos ligada al uso de cuatro sustancias usadas para descontaminar la carne de aves (fosfato trisódico, clorito sódico acidificado, dióxido de cloro y peroxiácidos),

concluyendo que la información científica disponible es insuficiente para evaluar la potencialidad de estos tratamientos para provocar tolerancia a dichos compuestos y resistencia incrementada a antibióticos (EFSA, 2008b; SCHER/SCENIHR, 2008). En mayo de 2008, la Comisión Europea preparó una propuesta de Reglamento en relación con la autorización de estos tratamientos en carne de ave. El 16 de junio de 2008, el Parlamento Europeo adoptó una resolución no vinculante en contra de la autorización de estos tratamientos. El Principio de Precaución estuvo detrás de esta resolución, ante la falta de datos científicos en la materia. La propuesta de la Comisión fue posteriormente (el 18 de diciembre de 2008) rechazada por el Consejo de Ministros de Agricultura de la UE, con 26 votos en contra y la abstención del Reino Unido (OJEU, 2009b). En su Decisión, el Consejo puso de manifiesto la necesidad de continuar recopilando nuevos datos sobre la efectividad de estos tratamientos y las posibilidades de desarrollo de resistencia a antibióticos, así como su posible impacto para el medio ambiente. En el año 2010, la EFSA publicó una guía con los requisitos que deben cumplir las solicitudes de autorización de estos tratamientos (EFSA, 2010a).

En un estudio reciente, varias cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* se expusieron a concentraciones crecientes subinhibitorias de cinco descontaminantes de carne de ave (fosfato trisódico, clorito sódico acidificado, ácido cítrico, dióxido de cloro y peroxiácidos), calculándose las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) antes y después de la exposición. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que: 1) la exposición a los descontaminantes redujo la susceptibilidad de las cepas, con incrementos en la MIC de los distintos compuestos (adaptación y adaptación cruzada), marcada en el caso del clorito sódico acidificado (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a); 2) la resistencia a varios antibióticos aumentó en las cepas de *L. monocytogenes* y *S. enterica* tras la exposición a los compuestos (especialmente clorito sódico acidificado) (Alonso-Hernando *et al.*, 2009b); 3) la exposición a los descontaminantes ácidos (por ejemplo ácido cítrico) aumentaba el porcentaje de células de *L. monocytogenes* supervivientes tras exposición a estrés ácido (Alonso-Hernando *et al.*, 2009c). Estos hallazgos tienen importantes implicaciones para la Seguridad Alimentaria y la Industria Alimentaria, y plantean dudas sobre la inocuidad de los tratamientos descontaminantes, como han sugerido otros autores con anterioridad (Rajkovic *et al.*, 2009).

En otro estudio realizado con cepas de *Salmonella enterica* de origen avícola, se observó una relación entre el número de antibióticos a los que las cepas eran resistentes y su tolerancia a los descontaminantes (se estudiaron los valores D, tiempo necesario para conseguir la reducción de una unidad logarítmica en el número de bacterias) (Capita, 2007). En los estudios señalados se puso de manifiesto la asociación entre tolerancia a descontaminantes y resistencia a antibióticos, si bien se trata de estudios realizados *in vitro* con las cepas crecidas en caldo de cultivo, y parece que los descontaminantes no han sido hasta el momento ensayados en un sistema más real, como la carne, con el objeto de investigar la selección de poblaciones resistentes a antibióticos.

3.1.3.3. Aditivos alimentarios

Los aditivos alimentarios se añaden a los alimentos con la intención de inhibir el crecimiento de los microorganismos alterantes y prolongar la vida útil, así como para ejercer un control sobre los microorganismos patógenos responsables de infecciones alimentarias (Davidson y Zivanovic, 2003). El Reglamento (CE) 1333/2008 regula el uso de estos antimicrobianos en la Unión Europea (OJEU, 2008). Según este Reglamento, la EFSA debe evaluar la seguridad de los aditivos alimentarios con anterioridad a su autorización.

En relación con el efecto de los aditivos alimentarios sobre la resistencia a antibióticos, Potenski *et al.* (2003) describieron células mutantes de *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis seleccionadas tras exposición única a cloro o a aditivos alimentarios de forma individual (nitrito sódico, benzoato sódico o ácido acético) que mostraban resistencia a múltiples antibióticos (tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina). Estos autores sugirieron que una mutación en el operon *mar* (*multiple antibiotic resistance*) fue responsable de la resistencia cruzada a los antibióticos en estas células mutantes. Esta mutación en el operon *mar* se asoció con la expresión incrementada de las bombas de expulsión. En base a los resultados obtenidos, los autores enfatizaron la importancia de monitorizar el uso de los compuestos antimicrobianos para asegurar el empleo de concentraciones adecuadas que permitan la inactivación de los microorganismos diana.

3.1.3.4. Desinfectantes

Los desinfectantes son biocidas que se emplean para reducir los niveles de microorganismos en diferentes etapas a lo largo de la cadena alimentaria. Se usan para la

limpieza y desinfección de equipos, superficies y aire, así como para el tratamiento de las aguas residuales en las plantas procesadores de alimentos. En cría animal los desinfectantes se usan también para la descontaminación de productos de piscifactorías (por ejemplo huevos) y para la desinfección de los vehículos y jaulas usados para el transporte de los animales. Asimismo se emplean en los pediluvios y rodaluvios presentes en la entrada de las explotaciones, y a veces se aplican directamente a la superficie de los animales (por ejemplo baño de pezones o limpieza de ubres). Cuando la aplicación de un desinfectante es objeto de un acto clínico, estos compuestos son considerados productos de medicina veterinaria y deben ser usados únicamente cuando cumplen las consideraciones de la Directiva 2001/82/EC sobre productos de medicina veterinaria (OJEC, 2001a). La Directiva 98/8/EC regula el uso de los desinfectantes en la Unión Europea (OJEC, 1998a). Esta Directiva introduce un periodo de transición de 10 años, durante el cual las sustancias activas existentes deben ser revisadas por lo que respecta a la seguridad de su uso para la salud humana y el ambiente. La potencialidad de estas sustancias para el desarrollo de resistencia a antibióticos no había sido considerada hasta ahora.

Los desinfectantes (principalmente compuestos clorados) son usados también en el agua destinada a consumo humano para mantener su calidad microbiológica (Directiva 98/83/EC; OJEC, 1998d). La aplicación de desinfectantes con esta finalidad está regulada por la Directiva 98/8/EC. Se ha relacionado la cloración del agua a concentraciones bajas con la selección de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (un microorganismo patógeno oportunista) resistentes a antibióticos (Rosenblatt-Farrell, 2009).

Los diferentes estudios publicados aportan perspectivas muy diferentes sobre la emergencia de resistencia a antibióticos debida al uso de desinfectantes. Así, por ejemplo, Randall *et al.* (2007) observaron que el uso de ciertos tipos de desinfectantes incrementaba la resistencia a varios desinfectantes y a antibióticos. Estos autores expusieron ocho cepas de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium a diferentes desinfectantes de uso ganadero (aceite de alquitrán, compuesto oxidante, desinfectante a base de aldehído o compuesto de amonio cuaternario). Los resultados obtenidos fueron diferentes dependiendo del desinfectante y la cepa examinados. Así, la exposición a compuestos oxidantes disminuyó notablemente la susceptibilidad a la ciprofloxacina y a varios desinfectantes al inducir la expresión del sistema de expulsión AcrAB-TolC. Estos autores concluyeron que la

potencialidad de estos compuestos para provocar resistencia a la ciprofloxacina es un problema real y que la aplicación de compuestos oxidantes puede provocar una presión selectiva para la selección y/o mantenimiento de cepas resistentes a este antibiótico en ausencia del mismo. Otros estudios muestran que el uso de un determinado desinfectante podría incrementar la resistencia a varios desinfectantes diferentes pero no a antibióticos. Así, se observó resistencia estable en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sometidas a concentraciones crecientes de diacetato de clorhexidina (Thomas *et al.*, 2000). No se observó resistencia cruzada a ninguno de los antibióticos examinados, si bien algunos de los cultivos mostraron resistencia cruzada a cloruro de benzalconio. La presencia de un sistema de expulsión activa y/o cambios en la permeabilidad de la membrana constituyen los mecanismos potencialmente responsables de esta resistencia cruzada entre desinfectantes, según los autores mencionados. Ledder *et al.* (2006) expusieron 40 cepas de bacterias a concentraciones crecientes subinhibitorias de triclosán. La exposición disminuyó la susceptibilidad a este compuesto (marcada en el caso de *Escherichia coli*) pero no afectó a la susceptibilidad de las cepas a otros compuestos químicamente no relacionados.

Por otro lado, algunos autores no han observado modificaciones en la resistencia bacteriana tras la exposición a desinfectantes. Gradel *et al.* (2005) pusieron de manifiesto que la exposición de 286 cepas de *Salmonella* de granjas de pollos en Dinamarca a cinco desinfectantes de uso común no modificó las MICs de los compuestos. Finalmente, en un estudio reciente, Cottell *et al.* (2009) observaron que las cepas de *E. coli* tolerantes al triclosán incrementaron su susceptibilidad a los antibióticos aminoglucósidos. Estos autores sugieren que las modificaciones en la membrana externa, o la pérdida de plásmidos, pueden ser responsables de esta relación entre tolerancia al desinfectante y susceptibilidad a antibióticos. Debería señalarse aquí que la gran variabilidad observada en los estudios señalados pone de manifiesto la necesidad de nuevas investigaciones encaminadas a evidenciar el impacto del uso de biocidas en la emergencia de resistencia a antibióticos.

En un informe reciente, el SCENIHR (2009) clasificó los biocidas en base a su potencial intrínseco para generar resistencia/tolerancia. Algunos biocidas, dada la naturaleza de sus interacciones con las bacterias, tienen una mayor tendencia a la generación de resistencia/tolerancia. En este grupo de biocidas de alto riesgo se encuentran los compuestos de amonio cuaternario, las biguanidas, los compuestos fenólicos y las sales

metálicas. Otros biocidas, donde se encuentran los compuestos oxidantes, presentan un bajo riesgo de generar resistencia a antibióticos y, cuando aparece, ésta se debe a un uso inapropiado. Finalmente, otros biocidas (isotiazolonas, anilidas, diaminidas, ácidos inorgánicos y sus ésteres y alcoholes) se clasifican dentro del grupo de biocidas con riesgo intermedio de generar resistencia a antibióticos.

Tal y como se ha indicado en párrafos previos es razonable asumir que, en ciertas circunstancias, la exposición a los desinfectantes (así como a otros biocidas) puede contribuir a la expresión de mecanismos de resistencia a antibióticos. La probabilidad de que esto ocurra está principalmente relacionada con dos situaciones particulares (Cerf *et al.*, 2010; SCENIHR, 2009). La primera es la aplicación frecuente de uno o más desinfectantes a concentraciones subinhibitorias como consecuencia, por ejemplo, de un uso inadecuado (concentración errónea) o almacenamiento incorrecto de los compuestos. Cuando los desinfectantes se usan a gran escala (por ejemplo cuando los alojamientos de los animales se someten, en su conjunto, a procedimientos de limpieza y desinfección), las superficies pueden no recibir niveles óptimos de las sustancias activas, siendo altas las probabilidades de que se seleccionen bacterias con resistencia. Algo parecido ocurre cuando los compuestos se aplican a los pediluvios o rodaluvios existentes a la entrada de las explotaciones, donde los niveles de desinfectantes pueden verse reducidos como consecuencia de la dilución provocada por la lluvia. Además, es común que estas estructuras contengan grandes cantidades de material biológico, que inactiva muchos compuestos activos, aumentando el riesgo de aparición de bacterias resistentes. En segundo lugar hay que señalar que algunos biocidas presentan una elevada persistencia medioambiental, pudiendo alcanzar una concentración residual por debajo de la concentración mínima inhibitoria, manteniendo una presión selectiva que incrementa el riesgo de selección de bacterias resistentes.

4. INTERÉS DEL ESTUDIO DE LOS PRODUCTOS AVÍCOLAS

4.1. Carne de ave

La carne de ave ocupa el segundo puesto por lo que respecta a la producción anual del sector cárnico, tanto en el ámbito mundial como en la Unión Europea, superando así a la

carne de vacuno, y situándose por debajo de la carne de porcino, que ocupa el primer lugar. Por lo que respecta al año 2008, la producción mundial de carne de ave se estimó en 79,3 millones de toneladas (FAO, 2010), siendo en la Unión Europea (UE-27 países) de unos 11,6 millones de toneladas (t), aproximadamente un 27% del total de carne (unos 43 millones de t) producidos en esta región geográfica el citado año (EUROSTAT, 2010). El resto de la producción se corresponde con la carne de cerdo (52-55%), la de vacuno (17-19%) y, de forma minoritaria, la de ovino y caprino (2,3-3,5%) y la carne de conejo (1,5%), con cifras variables según la fuente consultada (MERCASA, 2009; FAO, 2010; EUROSTAT, 2010).

La producción industrial de carne de pollo de la especie *Gallus gallus*, conocido comercialmente como “broiler” o “pollo de carne”, tiene cuantitativamente una considerable importancia en la producción total de carne de ave. Para hacer una correcta interpretación de los datos estadísticos, debemos tener en cuenta que en los resultados de producción de “carne de ave” se incluye la carne de pollo, la de las gallinas de desvieje y la de otras especies avícolas como pavo, pato, perdiz o faisán, entre otras (Castelló Llobet, 2002). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la carne de pollo es cuantitativamente la mayoritaria; sirvan como ejemplo los datos del año 2007, en el que sobre la producción total de carne de ave, la carne de pollo supuso en el mundo un 86%, en Europa un 80% y en España un 98%.

En España, a finales de 2008, existían 9.340 explotaciones para este tipo de ave (MERCASA, 2009). La producción de carne de pollo en nuestro país experimentó un notable crecimiento desde las últimas décadas del pasado siglo hasta la actualidad, constituyendo los años 1999 a 2001 los puntos de inflexión a partir de los cuales se sobrepasó el millón de toneladas anuales producidas (FIAB, 2008). A partir de este momento, la tendencia continúa apuntando hacia el incremento, con ligeras fluctuaciones, entre los años 2001 y 2008. La inversión económica en la modernización progresiva de granjas y mataderos, que supuso enormes mejoras técnicas en los procesos (Capita, 1998), los excelentes índices de transformación respecto al pienso en esta especie (MERCASA, 2009) que hacen que el alimento sea barato en el mercado determinando un mayor consumo del mismo, y el cada vez mayor número de intercambios comerciales con el extranjero, pueden ser algunas de las

razones para estos resultados positivos. En la actualidad, el pollo sigue ocupando el segundo lugar en producción en nuestro país, por detrás de la carne de porcino.

En 2008, la producción total de carne de aves supuso un 11,5% de la producción final agraria, siendo la de “broiler” de unos 1,08-1,15 millones de toneladas (MERCASA, 2009, FAO, 2010). En 2009, descendió un 3,92% respecto de 2008 (MARM, 2010a, b). El precio medio del pollo se situó en 149 euros/100 kg de canal en marzo del año 2010, detectándose una bajada de un 12,66% respecto al precio medio registrado en el mismo mes del año anterior (MARM, 2010a, b).

Desde el año 2000, en el que el consumo mundial de carne de pollo fue de 48,157 millones de toneladas, hasta el año 2007 en el que el consumo fue de 62,018 millones de toneladas, el aumento ha sido constante y ha supuesto un incremento del 28,78%. En el año 2007, los principales países consumidores de carne de pollo fueron los EE.UU. (22,0%), la R.P. China (17,8%), la U.E. (14%) y Brasil (11,6%). Estos países son responsables del 65,4% del consumo total.

El consumo de carne de ave en los países de la U.E. supuso 10,3 millones de toneladas en el año 2006, lo que se corresponde con unos 22,4 kg/habitante. En ese año se produjo un descenso de alrededor del 3% respecto al año 2005, debido al impacto negativo del brote de influenza aviar, pero en comparación con el año 1995 (con una U.E. de 15 países) se da un aumento de cerca de 3 kg por persona.

En el 4º Congreso Nacional de la Carne, celebrado en Lleida los días 9 y 10 de octubre de 2008, D. Francisco Mombiola, Director General de Industria y Mercados Alimentarios del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, notificó que el consumo de carne en España está estancado en un promedio de 50 kilos por persona y año, con un ligero aumento de pollo y porcino, una tendencia a la baja de caprino y ovino y ninguna variación en el vacuno. Según las conclusiones de su informe, la carne de vacuno está considerada como la más sabrosa por los españoles, el hombre come más vacuno y la mujer se decanta por el pollo. El consumo de carne envasada presenta ligeros aumentos, pero el 80% de la carne se sigue comprando al corte, sin envasar. Además, el grado de confianza de los consumidores en la carne es de un 8 sobre 10, frente a los preparados cárnicos en los que la confianza baja hasta un 3.

Por lo que se refiere al aspecto concreto del consumo de carne de pollo en España, Castelló Llobet, en el año 2002 en su obra *“Producción de Carne de Pollo”*, señalaba que es un tema conflictivo debido a la disparidad de los datos existentes y a su diferente interpretación. Sirva de ejemplo el consumo para el año 2005, que según los datos proporcionados por el MAPA en su obra *“La Alimentación en España”* (2006) el consumo estaría en 16,1 kilos por persona, cifra considerablemente inferior a la proporcionada por la FAO para ese mismo año (31,15 kilos por persona).

En cuanto a la evolución del consumo de carne de pollo en el período de los años 2000 a 2005 y según los datos del MAPA (2006), se produjo un máximo en el año 2002 (17,7 kilos por persona) y un mínimo en 2005 (16,1 kilos por persona). La variación del año 2004 al 2005 ha sido a la baja, produciéndose un descenso en el consumo del 3,1%. A pesar de esto, la carne de pollo fue la más consumida en el año 2005, seguida por la de cerdo fresca (13,5 kilos por persona) y la de vacuno (10,2 kilos por persona).

Finalmente, decir que en el informe elaborado por MERCASA (Alimentación en España 2007), con datos del MAPA, se pone de manifiesto que los españoles en ese año consumimos una media de 16,1 kilos de carne de pollo por persona. Un 82,8% de ese consumo se realizó en los hogares, un 12,9% en los establecimientos de restauración y hostelería, mientras que el restante 4,3% correspondió a los consumos institucionales.

Un encuesta realizada a consumidores españoles en 2008, revela que el 86,5% de los entrevistados ingiere carne de pollo de manera habitual, que es más preferida por las mujeres que por los hombres y que es considerada como la más saludable de todos los tipos de carne comercializados, por todos los participantes, con independencia de su edad y sexo (MARM, 2010a). Entre otros resultados de interés aplicables a todas las clases de carnes analizadas incluyendo a la de pollo, el estudio mencionado señala que los consumidores muestran preferencia por la carne cortada en el momento de la compra (en vez de la que se encuentra cortada y envasada previamente) y por la de origen nacional (frente a la importada); además, indica que muestran menos confianza por los platos a base de carne y envasados por la industria que por los alimentos cárnicos elaborados en la propia carnicería y listos para calentar, aunque en ambos casos la confianza es baja. Por otra parte, tanto el precio como la calidad son los factores que más influyen en la elección final

del producto, por encima de otros como el aspecto del mismo o las consideraciones nutricionales, según este estudio.

La carne de pollo se considera una fuente de proteínas de alta calidad, conteniendo varios de los aminoácidos esenciales. Es baja en grasa, ya que la mayor parte de esta se halla bajo la piel, que se puede retirar, y no infiltrada en el músculo. Es una carne blanda y de muy buena digestibilidad. Además su perfil lipídico es más saludable que el de otros tipos de carne, por contener mayor proporción de ácidos grasos insaturados frente a los saturados (Capita *et al.*, 1999). En cuanto a consideraciones de carácter práctico, se puede afirmar que tiene buena aptitud tecnológica, lo que permite elaborar productos cárnicos muy diversos y además tiene posibilidades comerciales como alimento funcional (Grashorn, 2007); por otra parte, no entra en conflicto con ningún precepto religioso (a diferencia de lo que sucede, por ejemplo, con la carne de cerdo), lo que explica su gran nivel de consumo en todo el mundo (Alonso-Hernando, 2011). Sin embargo, y como contrapartida a los aspectos señalados, las características de producción y obtención de este alimento (Capita, 1998) hacen que esté frecuentemente implicado en procesos de enfermedad humana. Así, en el año 2010, se produjeron en la Unión Europea un total de 5.262 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (43.473 casos), estando la carne de mamíferos y aves implicada en el 20,2% de ellos (EFSA, 2012).

4.2. Huevos

Los huevos de mesa son alimentos de alto valor nutritivo y una fuente barata de proteínas de alta calidad, jugando un papel importante en la dieta humana (Adesiyun *et al.*, 2006). Debido a sus propiedades multifuncionales (por ejemplo poder emulsificante), los huevos han sido ampliamente usados en la Industria Alimentaria, a la vez que ha sido una fuente importante de materia prima para las industrias farmacéutica y cosmética (Matt *et al.*, 2009). En 2007 la producción total de huevos de gallina llegó a las 63 millones de toneladas (aproximadamente un billón (10^{12}) de huevos). La Unión Europea (UE-27) fue el segundo productor, seguido de China, con más de 6,5 millones de toneladas, y un consumo anual medio de 235 huevos *per cápita*. Por lo que se refiere concretamente a España, la producción de huevos en 2008 alcanzó la cifra de 1,6 billones de unidades, con un consumo *per cápita* de 211 huevos (Pascale, 2010). Los huevos de codorniz, aunque considerados

una opción saludable por sus características nutricionales, se asocian a un consumo únicamente esporádico (Sinanoglou *et al.*, 2011).

Diferentes microorganismos patógenos, particularmente *Salmonella*, se han aislado de huevos de gallina, y se han identificado como responsables de numerosos casos de enfermedad transmitida por alimentos. Así, en la UE, el 22,1% de los brotes confirmados de infecciones transmitidas por alimentos en 2010 se debieron al consumo de huevos y ovoproductos, siendo estos alimentos los implicados con mayor frecuencia en enfermedades de origen alimentario (EFSA, 2012). La presencia de microorganismos patógenos en los huevos es una consecuencia de la contaminación vertical durante la formación del huevo o bien el resultado de la contaminación durante o después de la puesta. Las infecciones e intoxicaciones asociadas con estos alimentos son consecuencia de la contaminación cruzada o de un inadecuado cocinado (Adesiyun *et al.*, 2007).

En los últimos años se están aplicando diferentes métodos de producción en gallinas ponedoras (Directiva del Consejo 1999/74/EC, Reglamento 1804/1999/EC, Reglamento 2295/2003/EC). Estos sistemas se diferencian en cómo las aves son alimentadas, alojadas y manejadas. Los códigos usados son 0, para producción ecológica, 1 para gallinas camperas, 2 para gallinas criadas en suelo y 3 para gallinas criadas en jaulas. Brevemente, las aves pueden ser alojadas en jaulas en batería, que son pequeños recintos con pisos inclinados de alambre soldada. La Directiva del Consejo 1999/74/EC impone la prohibición, con efecto desde el 1 de enero de 2012, del alojamiento de gallinas ponedoras en jaulas convencionales, que han demostrado ser extremadamente pobres desde el punto de vista de bienestar animal. En los sistemas de cría en suelo, las aves no están enjauladas y tienen libertad para moverse dentro de la nave. En el caso de las gallinas camperas, éstas tienen acceso al exterior de la explotación, disponiendo de un espacio al aire libre. Finalmente, en el caso de la producción orgánica o ecológica, los animales tienen acceso al exterior, a un terreno de producción ecológico. Contrariamente a la producción convencional, donde se emplean agentes antimicrobianos con frecuencia para el tratamiento, prevención y control de enfermedades, en la producción orgánica de huevos el empleo de antimicrobianos está muy restringido. Además, las aves sometidas a este sistema de producción pueden ser alimentadas únicamente con piensos y suplementos producidos de forma orgánica. Los porcentajes de consumo en la UE son 2%, 9%, 14% y 75% para cada tipo de huevos,

respectivamente (Pascale, 2010). Por otro lado, la comercialización de huevos de producción doméstica procedentes de pequeñas explotaciones familiares, y que son distribuidos en mercados locales tradicionales, es una práctica frecuente en España. Así, los consumidores disponen de un amplio rango de productos de diferentes precios pero carecen de información real sobre sus características específicas.

Como se ha comentado con anterioridad, el amplio uso de antimicrobianos en medicina humana y en producción animal está involucrado en la emergencia, selección y diseminación de cepas de bacterias multi-resistentes a antibióticos. En este sentido, se ha sugerido que existe una relación entre el uso de antibióticos en producción primaria y la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en infecciones humanas. Recientemente se han aislado a partir de alimentos bacterias resistentes a antibióticos de diferentes géneros (Begun *et al.*, 2010). En la Unión Europea se monitoriza la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y enterococos de animales y alimentos (EFSA, 2010b). Sin embargo, existen pocos estudios publicados en relación con la resistencia a antibióticos en bacterias, particularmente *Escherichia coli*, en huevos de consumo (Musgrove *et al.*, 2006).

5. INTERÉS DEL ESTUDIO DE *Salmonella*

Las salmonelas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*; son bacterias Gram negativas, catalasa positivas y oxidasa negativas, no formadoras de esporas y con metabolismo oxidativo y fermentativo (Velge *et al.*, 2005). Existe poca uniformidad e incluso un cierto grado de confusión por lo que respecta a la nomenclatura de estos microorganismos. Puede considerarse que el género *Salmonella* consta de tres especies: *S. enterica*, *S. bongori* y *S. subterranea*. Esta última especie no está incluida en el esquema tradicional de Kauffmann-White (Popoff *et al.*, 2003), pero se considera como tal en el Laboratorio Nacional de Referencia de *Salmonella* y *Shigella* en España –LNRSSSE- (Echeita *et al.*, 2005a). *S. enterica* se subdivide a su vez en seis subespecies que se pueden diferenciar bioquímicamente: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV), e *indica* (VI), habiendo sido la subespecie V (*bongori*) elevada a categoría de especie en 1989 (Echeita *et al.*, 2005a). Recientemente *The Judicial Commission of the*

International Committee for Systematics of Prokaryotes (2005) ha establecido dentro del género *Salmonella* una única especie (*S. enterica*), con siete subespecies (las indicadas anteriormente y, además, *S. bongori*). La subespecie I o *S. enterica* subespecie *enterica* agrupa a la inmensa mayoría de los serotipos de *Salmonella* que se asocian con animales de sangre caliente y con el hombre.

Hasta el momento actual se han descrito más de 2.600 serotipos de *Salmonella*, si bien solo unos pocos se ven habitualmente implicados en procesos de gastroenteritis humanas. En España, *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Enteritidis (*S. Enteritidis*), *S. Typhimurium*, *S. Hadar* y *S. Virchow* fueron los serotipos a los que se adscribieron con mayor frecuencia las cepas clínicas de origen humano entre los años 2002 y 2003, suponiendo el 57,9%, 22,8%, 2,4%, y 1,8% de los aislamientos, respectivamente (Echeita *et al.*, 2005a). De igual forma, únicamente un número limitado de fagotipos son los predominantes. Así, los fagotipos 1, 4, 6a y 21 (*S. Enteritidis*), U302, 193, 104B y 104 (*S. Typhimurium*), 1, 2, 17 y 32 (*S. Hadar*), y 6, 8, 17 y 18 (*S. Virchow*) son los habitualmente asociados con salmonelosis humana en España (Echeita *et al.*, 2005a, b). Por lo que respecta a la Unión Europea, los principales serotipos responsables de enfermedad humana en 2010 fueron *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium* variante monofásica (1, 4, (5), 12:i:-) y *S. Newport*, en este orden (EFSA, 2012). Los principales fagotipos detectados en cepas de origen clínico en la Unión Europea son 1, 4 y 8 en el caso de *S. Enteritidis* y 193, 120 y 104 en el de *S. Typhimurium* (EFSA, 2012). El protagonismo de algunos serotipos y fagotipos en los episodios de esta enfermedad pone de manifiesto que no todas las cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos tienen la misma capacidad para causar enfermedad humana, como ha sido previamente señalado (Sarwari *et al.*, 2001).

La salmonelosis es una enfermedad zoonótica caracterizada por diarrea profusa acompañada de dolor abdominal, fiebre y, con frecuencia, dolor de cabeza y malestar general. En ocasiones se asocia a una sintomatología más grave, si bien su tasa de letalidad no suele superar el 1% (D'Aoust, 2001). Esta infección, cuyo agente etiológico son los microorganismos del género *Salmonella*, presenta una elevada incidencia, lo que la sitúa entre las enfermedades de transmisión alimentaria de mayor importancia cuantitativa, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (Camps *et al.*, 2005). En la Unión Europea *Salmonella* fue responsable de 1.604 brotes (12.352 casos asociados; 2.201 hospitalizaciones y 16

fallecimientos) de enfermedad transmitida por alimentos en 2010 (lo que supone un 30,5% de los 5.262 brotes totales), lo que sitúa a este microorganismo como primer agente etiológico (EFSA, 2012). Por lo que se refiere concretamente a España, de los brotes señalados anteriormente 482 se produjeron en nuestro país. Los datos nacionales ponen de manifiesto que en el año 2003 se informaron un total de 1.221 brotes de enfermedades de origen alimentario (857 de etiología conocida), la mayoría de los cuales estuvieron producidos por *Salmonella* (85,5% de los brotes con agente causal conocido), seguida a gran distancia por *Staphylococcus aureus* (2,6%) y norovirus (2,6%) (Cevallos *et al.*, 2005). De forma similar, del conjunto de brotes declarados entre 1993 y 2002 (9.364), *Salmonella* fue el agente implicado en el 80,8% de ellos (Hernández-Pezzi *et al.*, 2004). Una situación similar a la planteada queda patente también en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, donde *Salmonella* ha sido responsable en los últimos años del 70-80% de los brotes alimentarios de etiología conocida (Martín Marín, 2005).

Por lo que respecta a los casos esporádicos de enfermedad, en el año 2010 se informaron un total de 4.420 casos de salmonelosis por salmonelas no tifoideas (377 en Castilla y León) (ISCIII, 2012), con una incidencia acumulada anual de aproximadamente 95 casos por millón de habitantes. Hay que señalar, no obstante, que si bien los datos correspondientes a brotes se pueden considerar fiables (en España la notificación de brotes es obligatoria desde 1982 y las situaciones epidémicas y brotes están incluidas como uno de los sistemas básicos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica según el Real Decreto 2210/1995, de creación de esta Red), los relativos a casos esporádicos se basan en notificaciones voluntarias de las identificaciones que se llevan a cabo en un conjunto de laboratorios de microbiología clínica en nuestro país (lo que se conoce como Sistema de Información Microbiológica, SIM), por lo que la información disponible sobre el número de personas afectadas por salmonelosis no se corresponde con el dato real (una excepción la constituyen los casos por los serotipos *Salmonella* Typhi y *S. Paratyphi*, adaptados al hombre y que producen enfermedades de declaración obligatoria siempre, independientemente de que se trate o no de procesos asociados a brotes). Por la razón señalada, y por el hecho de que menos del 10% de las personas con gastroenteritis reciben asistencia sanitaria, algunos autores señalan que el número real de casos de salmonelosis humana es 20 veces superior al de informados (Gil Setas *et al.*, 2002; BES, 2004, 2005; Larkin *et al.*, 2004).

La gran importancia de la salmonelosis humana queda también patente fuera de nuestro

país, con 99.020 casos (21,5 casos/100000 habitantes) en el año 2010 en la Unión Europea, siendo la segunda zoonosis más frecuente tras la campilobacteriosis (EFSA, 2012). En los EE.UU. *Salmonella* provoca 1,5 millones de enfermos anuales (15.000 hospitalizaciones y 500 fallecimientos), cifras que sitúan a este microorganismo en el primer puesto por lo que respecta a incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos en dicho país (Baldauf *et al.*, 2007).

El interés de la Administración por este microorganismo queda patente en el hecho de que *Salmonella* fue el peligro responsable del mayor número de notificaciones de información (188; 40,17% del total de las producidas por peligros biológicos), de notificaciones de alertas (14; 29,78% de las alertas por peligros biológicos) y de notificaciones de rechazos 69 (31,51% de las correspondientes a peligros biológicos) realizadas al Sistema de Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI) en 2011 (AESAN, 2012).

6. INTERÉS DEL ESTUDIO DE *Escherichia coli*

Escherichia coli es un contaminante común en la Industria Alimentaria (Pagedar *et al.*, 2012). 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 del microorganismo en la cadena alimentaria. Esta bacteria es una de las más abundantes de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal de animales y seres humanos y, aunque la mayoría de las cepas son apatógenas y consideradas como meros indicadores de una higiene deficiente y malas condiciones sanitarias (contaminación fecal), entre el 10% y el 15% de las cepas de *E. coli* pertenecen a serotipos patógenos oportunistas (Barnes y Goss, 1997). Así, en el año 2010 se produjeron en la Unión Europea 5.262 brotes de enfermedad transmitida por alimentos (EFSA, 2012). Estos brotes fueron responsables de 43.473 casos de enfermedad humana, 4.695 hospitalizaciones y 25 fallecimientos. *Escherichia coli* fue identificada como el agente etiológico de 31 brotes (0,6% del total). Esta bacteria es también un motivo de preocupación en el sistema sanitario, donde se sitúa entre los microorganismos más frecuentemente implicados 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 e incluso septicemia. Por otro lado, la habilidad de *E. coli* para adquirir 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, este grupo bacteriano, junto con *Enterococcus* spp., actúa 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 (SCENIHR, 2009). Finalmente, señalar que *E. coli* es una bacteria habitualmente empleada 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesiyun, A., Offiah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V. y Musai, L. (2006). Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. *Food Research International* **39**, 212-219.
- Adesiyun, A., Offiah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V. y Musai, L. (2007). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. *Food Control* **18**, 306-311.
- AESAN (2012). Memoria Anual del Sistema Coordinado de Intercambio Rápido de Información (SCIRI). Accesible en: http://www.aesa.msc.es/AESAN/docs/docs/alertas/acceso_general/memoria_sciri/Memoria_SCI_RI_2011_definitiva.pdf.
- AHI (Animal Health Institute) (2008). Sales of disease-fighting animal medicines rise. Accesible en: <http://www.ahi.org/files/Media%20Center/Antibiotic%20Use%202007.pdf>.
- 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. (2011). Implicaciones para la Seguridad Alimentaria de varios tratamientos descontaminantes de la carne de ave bajo diferentes condiciones de utilización. Tesis Doctoral, Universidad de León, abril de 2011.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2009a). Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *Journal of Microbiology* **47** (2), 142-146.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2009b). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20** (12), 1108-1111.
- Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2009c). Comparative analysis of acid resistance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains before and after exposure to poultry decontaminants. Role of the glutamate decarboxylase (GAD) system. *Food Microbiology* **26** (8), 905-909.
- Ausubel, J. H., Meyer, P. S. y Wernick, I. K. (2001). Death and the human environment: the United States in the 20th century. *Technology in Society* **23**, 131-146.
- Bager, F., Madsen, M., Christesen, J. y Aarestrup, F.M. (1997). Avoparcin used as a growth promoter is associated with the occurrence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* on Danish poultry and pig farms. *Preventive Veterinary Medicine* **31** (1-2), 95-112.

- Baldauf, N. A., Rodríguez-Romo, L. A., Manning, A., Yousef, A. E. y Rodríguez-Saona, L. E. (2007). Effect of selective growth media on the differentiation of *Salmonella enterica* serovars by Fourier-Transform Mild-Infrared Spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods* **68**, 106-114.
- Barnes, H. J. y Gross, W. B. (1997). Colibacillosis, 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.
- Begun, K., Reza, T. A., Haque, M., Hossain, A., Hassan, F. M. K., Hasan, S. H., Akhter, N., Ahmed, A. y Barua, U. (2010). Isolation, identification and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* spp. from chicken eggs, intestines and environmental samples. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* **13**, 23-27.
- Beinlich, K. L., Chuanchuen, R. y Schweizer, H. P. (2001). Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* **198** (22), 129-134.
- BES (Boletín Epidemiológico Semanal) (2004). Servicio de Vigilancia epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Comentario epidemiológico de las Enfermedades de Declaración Obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2003. *Boletín Epidemiológico Semanal* **12**, 101-112.
- BES (Boletín Epidemiológico Semanal) (2005). Servicio de Vigilancia epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. Comentario epidemiológico de las Enfermedades de Declaración Obligatoria y Sistema de Información Microbiológica. España. Año 2004. *Boletín Epidemiológico Semanal* **13**, 109-120.
- Bywater, R. J. y Casewell, M. W. (2000). An assessment of the impact of antibiotic resistance in different bacterial species and of the contribution of animal sources to resistance in human infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46** (4), 643-645.
- Campos, J. y Baquero, F. (2002). Resistencia a antibióticos: ¿Qué hacer ahora? *Medicina Clínica* **119**, 656-658.
- Camps, N., Domínguez, A., Company, M., Pérez, M., Pardos, J., Llobet, T., Usera, M.A., Salleras, L. and the Working Group for the Investigation of the Outbreak of Salmonellosis in Torroella de Montgrí. (2005). A foodborne of *Salmonella* infection due to the overproduction of egg-containing foods for a festival. *Epidemiology and Infection* **133**, 817-822.
- Capita, R. (1998). Calidad higiénica y sanitaria de la carne de pollo con atención especial a *Listeria monocytogenes*. Ensayos de descontaminación. Tesis Doctoral. Universidad de León, León.
- Capita, R. (2007). Variation in *Salmonella* resistance to poultry chemical decontaminants, based on serotype, phage type, and antibiotic resistance patterns. *Journal of Food Protection* **70** (8), 1835-1843.

- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Arias, M. T., Moreno-García, B. y García-Fernández, M. C. (1999). El pollo como alimento. *Alimentación, Equipos y Tecnología* **7**, 101-108.
- Carlson, S. A., Sharma, V. K., McCuddin, Z. P., Rasmussen, M. A. y Franklin, S. K. (2007). Involvement of an *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.
- Cars, O. y Nordberg, O. C. (2004). Antibiotic resistance-The faceless threat. In: The global threat of antibiotic resistance: Exploring roads towards concerted action. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation. Uppsala, Sweden. Accesible en: http://soapimg.icecube.snowfall.se/react/Meeting%20the%20challenge%20of%20Antibiotic%20Resistance%20-%20The%20Swedish%20Experience%20April%202009_version%20with%20chinese%20complements.pdf.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. y Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **52** (2), 159-161.
- Castanon, J. I. R. (2007). Review. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poultry Science* **86**, 2466-2471.
- Castelló Llobet, J. A. (2002). La industria del pollo para carne, pp. 15-36. En: *Producción de Carne de Pollo*, 2ª ed. Real Escuela de Avicultura, Barcelona.
- CDC (2006). Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings, 2006. Centers for Disease Prevention and Control. Accesible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf>.
- CDC (2009). Centers for Disease Prevention and Control. Antimicrobial Resistance in Healthcare Settings. Accesible en: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/ar.html>.
- 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.
- Cevallos, C., Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P., Villarrubia, S. y Bleda, M.J. (2005). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España. 2003 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal* **13**, 25-31.

- Cole, D. W., Cole, R., Gaydos, S. J., Gray, J., Hyland, G., Jacques, M. L., Powell-Dunford, N., Sawhney, C. y Au, W. W. (2009). Aquaculture: Environmental, toxicological, and health issues. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* **212** (4), 369-377.
- Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J. y Prat, M. D. (2009). Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **395** (4), 877-891.
- Coque, T. M., Tomayko, J. F., Ricke, S. C., Okhyusen, P. C. y Murray, B. E. (1996). Vancomycin-resistant enterococci from nosocomial, community, and animal sources in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40** (11), 2605-2609.
- 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.
- Cottell, A., Denyer, S., Hanlon, G., Ochs, D. y Maillard, J. (2009). Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *Journal of Hospital Infection* **72** (1), 71-76.
- D'Aoust, J.-Y. (2001). Especies de *Salmonella*, pp. 133-163. En: Doyle, M. P., Beuchat, L. R. y Montville, T. J. (Eds.), *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras*. Acribia, Zaragoza.
- Daikos, G. L., Koutsolioutsou, A., Tsiodras, S., Theodoridou, M., Koutouzis, E. I., Charissiadou, A., Pangalis, A., Michos, A. G., Chaidopoulou, F., Braoudaki, M. y Syriopoulou, V. P. (2008). Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **60** (4), 393-398.
- 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.
- Dibner, J. J. y Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* **84** (4), 634-643.
- Donoghue, D. J. (2003). Antibiotic residues in poultry tissues and eggs: human health concerns? *Poultry Science* **82** (4), 618-621.
- Doublet B., Golding G. R., Mulvey M. R. y Cloeckert A. (2008). Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS ONE* **3** (4): 1-11. Accesible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2297512/pdf/pone.0002060.pdf>.
- Doyle, M. P. y Erickson, M. C. (2006). Emerging microbiological food safety issues related to meat. *Meat Science* **74** (1), 98-112.

- EARSS (2007). European Antimicrobial Resistance Surveillance System. Annual report 2007. European Antibiotic Resistance Surveillance System. Accesible en: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202007_FINAL_tcm61-55933.pdf.
- EASAC (2007). *Tackling antibacterial resistance in Europe*. European Academies Science Advisory Council, June 2007. Accesible en: <http://www.leopoldina-halle.de/easac-report07.pdf>.
- 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. Accesible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/1372.pdf?ssbinary=true.
- ECDC/EMEA (2009). ECDC/EMEA (European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency) joint technical report. The bacterial challenge: time to react. Accesible en: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf.
- Echeita, A., Aladueña, A., González-Sanz, R., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, F., Arrollo, M. y Gutiérrez, R. (2005a). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (I). *Boletín Epidemiológico Semanal* **13**, 73-76.
- Echeita, A., Aladueña, A., González-Sanz, R., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, F., Arrollo, M. y Gutiérrez, R. (2005b). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (II). *Boletín Epidemiológico Semanal* **13**, 85-88.
- Economic and Social Committee of the European Union (1998). Opinion on resistance to antibiotics as a threat to public health. Brussels, Septiembre 1998. N° ESC-98-016-EN. Accesible en: http://eescopinions.eesc.europa.eu/EESCopinionDocument.aspx?identfier=ceslanciennes_secti ons\envi\envi471\ces1118-1998_ac.doc&language=EN.
- Edmond, M. B., Ober, J. F., Dawson, J. D., Weinbaum, D. L. y Wenzel, R. P. (1996). Vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: natural history and attributable mortality. *Clinical Infectious Diseases* **23** (6), 1234-1239.
- EEA (European Environment Agency) (2010). Environmental Terminology and Discovery Service (ETDS). Definitions. Accesible en: http://glossary.eea.europa.eu/terminology/concept_html?term=fungicide.
- 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. Accesible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/biohaz_op_ej765_antimicrobial_resistance_en_3.pdf?ssbinary=true.

- 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. Accesible en: [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific Opinion/biohaz_op_ej659_decontamination_four_substances_en,3.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific%20Opinion/biohaz_op_ej659_decontamination_four_substances_en,3.pdf?ssbinary=true).
- EFSA (2009a). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Assessment of the Public Health significance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in animals and foods. *EFSA Journal* **2009** **993**, 1-73. Accesible en: [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific Opinion/biohaz_op_993_mrsa_en,3.pdf?ssbinary=true](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific%20Opinion/biohaz_op_993_mrsa_en,3.pdf?ssbinary=true).
- EFSA (2009b). Reasoned opinion of EFSA prepared by the Pesticides Unit (PRAPeR) on the 2007 Annual Report on Pesticide Residues. *EFSA Scientific Report* **2009** **305**, 1-106. Accesible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Report/EFSA_2007_Annual_Report_Pesticide%20Residue_en.pdf?ssbinary=true.
- EFSA (2010a). 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** (4), 1544-1575. Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1544.pdf>.
- EFSA (2010b). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **2010** **8**, 1658-1918. Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1658.pdf>.
- EFSA (2012). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* **2012** **10**, 2597-3038. Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>.
- Erill, I., Campoy, S. y Barbé, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiology Reviews* **31** (6), 637-656.
- European Commission (1999). Opinion of the Scientific Steering Committee on Antimicrobial Resistance. 28 May 1999. Accesible en: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/ssc/out50_en.pdf.
- European Commission (2001). Communication from the Commission on a Community Strategy against antimicrobial resistance /* COM/2001/0333 final Volume I. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:52001DC0333:EN:HTML>.
- European Commission (2006a). International surveillance network for the enteric infections - *Salmonella*, VTEC O157 and *Campylobacter*. Enter-net – Human enteric pathogen dedicated surveillance network Final report for the period 01/10/2003 – 01/10/2006. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_projects/2003/action2/docs/2003_2_20_frep.pdf.

- European Commission (2006b). 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. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_073.pdf.
- European Commission (2008). Commission staff working document on the implementation of national residue monitoring Plans in the member states in 2007 (Council Directive 96/23/EC) Accesible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf.
- European Commission (2009a). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2008. EU Directorate General for Health and Consumers, Luxemburg. Accesible en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2008_en.pdf.
- European Commission (2009b). EU pesticides database. Accesible en: http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm.
- European Parliament (2006). *Antibiotic resistance*. IP/A/STOA/ST/2006-4. Accesible en: http://www.europarl.europa.eu/stoa/publications/studies/stoa173_en.pdf.
- EUROSTAT (Statistical Office of the European Communities) (2010). Accesible en: <http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/themes>.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) (2010). Base de datos FAOSTAT. Accesible en: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=291&lang=es>.
- FIAB (Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas) (2008). Una Aproximación a la Industria Española de la Alimentación y Bebidas y su Comercio Exterior. Madrid, Mayo de 2008 (páginas 8-20). Ed. Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación y FIAB. Accesible en: http://www.fiab.es/archivos/documentoMenu/documentomenu_20090312050643.pdf.
- Flensburg, J. y Sköld, O. (1984). Regulatory changes in the formation of chromosomal dihydrofolate reductase causing resistance to trimethoprim. *Journal of Bacteriology* **159** (1), 184-190.
- FVE (2002). Antibiotic resistance and prudent use of antibiotics in veterinary medicine. Federation of Veterinarians of Europe, Brussels. Accesible en: <http://www.fve.org/news/publications/pdf/antibioen.pdf>.
- Gil Setas, A., Manzón Ramos, A., Martín Salas, C., Urtiaga Domínguez, M. y Inza Elia, M. E. (2002). Salmonellosis no tifoidea en un área de salud de Navarra, España. *Revista Española de Salud Pública* **76**, 49-56.
- 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 *E. coli* and *Ps. aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55** (6), 879-882.

- Gradel, K. O., Randall, L., Sayers, A. R. y Davies, R. H. (2005). Possible associations between *Salmonella* persistence in poultry houses and resistance to commonly used disinfectants and a putative role of *mar*. *Veterinary Microbiology* **107** (1-2), 127-138.
- Graham, J. P., Price, L. B., Evans, S. L., Graczyk, T. K. y Silbergeld, E. K. (2009). Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of the Total Environment* **407** (8), 2701-2710.
- Grashorn, M. A. (2007). Functionality of poultry meat. *The Journal of Applied Poultry Research* **16** (1), 99-106.
- 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.
- Hald, T., Wong, D. M. L. F. y Aarestrup, F. M. (2007). The attribution of human infections with antimicrobial resistant *Salmonella* bacteria in Denmark to sources of animal origin. *Foodborne Pathogens and Disease* **4** (3), 313-326.
- 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.
- Helms, M., Simonsen, J. y Mølbak, K. (2004). Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium. *The Journal of Infectious Diseases* **190** (9), 1652-1654.
- Helms, M., Simonsen, J., Olsen, K. E. y Mølbak, K. (2005). Adverse health events associated with antimicrobial drug resistance in *Campylobacter* species: A registry-based cohort study. *The Journal of Infectious Diseases* **191** (7), 1050-1055.
- Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P. y Cevallos, C. (2004). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 1993-2002 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal* **12**, 289-296.
- Hof, H. (2001). Critical annotations to the use of azole antifungals for plant protection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (11), 2987-2990.
- HPA (2008). Antimicrobial Resistance and Prescribing in England, Wales and Northern Ireland, 2008. Health Protection Agency, London. Accesible en: http://www.hpa.org.uk/web/HPAwebFile/HPAweb_C/1216798080469.
- Hunter, P. R., Wilkinson, D. C., Catling, L. A. y Barker, G. C. (2008). Meta-analysis of experimental data concerning antimicrobial resistance gene transfer rates during conjugation. *Applied and Environmental Microbiology* **74** (19), 6085-6090.

- 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.
- ISCI (2012). Informe anual del Sistema de Información Microbiológica 2010. Accesible en: http://www.iscii.es/ISCI/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-sistema-informacion-microbiologica/Informe_General_SIM_2010.pdf.
- Kempf, I. y Zeitouni, S. (2009). Coût biologique de la résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences. *Pathologie Biologie* **60** (2), e9-e14.
- Kollef, M. H., Sherman, G., Ward, S. y Fraser, V. J. (1999). Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* **115** (2), 462-474.
- Kools, S. A., Moltmann, J. F. y Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **50** (1), 59-65.
- Larkin, C., Poppe, C., McNab, B., McEwen, B., Mahdi, A. y Odumeru, J. (2004). Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. *Journal of Food Protection* **67**, 448-445.
- Ledder, R. G., Gilbert, P., Wilis, C. y McBain, A. J. (2006). Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 *ex-situ* environmental and human isolates. *Journal of Applied Microbiology* **100** (5), 1132-1140.
- 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 oxytetracycline production wastewater treatment plant and the receiving river. *Applied and Environmental Microbiology* **76** (11), 3444-3451.
- Mah, T.-F. C. y O'Toole, G. A. (2001). Review. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* **9** (1), 34-39.
- MAPA (2006). La alimentación en España. Secretaría General de Agricultura y Alimentación. Dirección General de Industrias Agroalimentarias y Alimentación, Madrid.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) (2010a). Boletín Mensual de Estadística. Abril 2010. Publicación elaborada por la Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística. Accesible en: <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/publicaciones/BME/introduccion.htm>.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino) (2010b). Boletín Mensual de Estadística. Mayo 2010. Publicación elaborada por la Secretaría General Técnica, Subdirección

- General de Estadística. Accesible en: <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/publicaciones/BME/introduccion.htm>.
- Martín Marín, C. (2005). Enfermedades transmitidas por agua y alimentos. Brotes. *Boletín Epidemiológico de Castilla y León* **21**, 25-28.
- Matt, D., Veromann, E. y Luik, A. (2009). Effect of housing systems on biochemical composition of chicken eggs. *Agronomy Research* **7**, 662-667.
- McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W. y Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology* **40**, 443-65.
- McManus, P. S. (2000). Antibiotic use and microbial resistance in plant agriculture. *ASM News* **66** (8), 448-449.
- MERCASA (2007). Alimentación en España. 2007. Accesible en: www.mercasa.es.
- MERCASA (2009). Alimentación en España 2009 (Informe sobre Producción, Industria, Distribución y Consumo de Alimentación en España). Accesible en: http://www.munimerca.es/mercasa/alimentacion_2009/index.html.
- Mølbak, K. (2004). Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans—the public health consequences. *Journal of Veterinary Medicine* **51** (8-9), 364-369.
- Monnet, D. L. (2005). Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry. *International Journal of Risk and Safety Medicine* **17**, 133-145.
- Mulvey, M. R. y Simor, A. E. (2009). Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? *Canadian Medical Association Journal* **180** (4), 408-415.
- Musgrove, M. T., Jones, D. R., Northcutt, J. K., Cox, N. A., Harrison, M. A., Fedorka-Cray, P. J. y Ladely, S. R. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poultry Science* **85**, 1665-1669.
- NARMS (2006). National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric bacteria. 2006 Human isolates final report. Centers for Disease Control and Prevention. Accesible en: <http://www.cdc.gov/narms/annual/2006/NARMSAnnualReport2006.pdf>.
- Nijsten, R., London, N., van den Bogaard, A. y Stobberingh, E. (1994). Resistance in faecal *Escherichia coli* isolated from pig farmers and abattoir workers. *Epidemiology and Infection* **113** (1), 45-52.
- OIE (2010). Terrestrial animal health code. Responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. Health standards of the World Organization for Animal Health. Accesible en: http://www.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.6.9.pdf.

- OJEC (1990). Council Regulation (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Communities* **18/08/1990 L224**, 1-8. Accesible en : http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377/reg_1990_2377_en.pdf.
- OJEC (1996). Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Official Journal of the European Communities* **23/05/1996 L 125**, 10-32. Accesible en : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0023:EN:HTML>.
- OJEC (1997). Commission Directive 97/6/EC of 30 January 1997 amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities* **05/02/2007 L035**, 11-13. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/Notice.do?mode=dbl&lng1=en,es&lang=&lng2=cs,da,de,el,en,es,et,fi,fr,hu,it,lt,lv,mt,nl,pl,pt,sk,sl,sv,&val=218496:cs&page=&hwords=null>.
- OJEC (1998a). 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. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:123:0001:0001:EN:PDF>.
- OJEC (1998b). Council Regulation (EC) No 2821/98 of 17 December 1998 amending, as regards withdrawal of the authorisation of certain antibiotics, Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities* **29/12/1998 L351**, 4-8. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:351:0004:0008:EN:PDF>.
- OJEC (1998c). Commission Regulation (EC) No 2788/98 of 22 December 1998 amending Council Directive 70/524/EEC concerning additives in feedingstuffs as regards the withdrawal of authorisation for certain growth promoters. *Official Journal of the European Communities* **23/12/1998 L347**, 31-32. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:347:0031:0032:EN:PDF>.
- OJEC (1998d). Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*, **05/12/1998 L330**, 32-54. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF>.
- OJEC (2001a). Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. *Official Journal of the European Communities* **28/11/2001 L311**, 1-66. Accesible en: <http://faolex.fao.org/docs/pdf/eur36747.pdf>.

- OJEU (2003a). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union* **18/10/2003** **L268**, 29-43. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EN:PDF>.
- OJEU (2004a). Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 laying down Community procedures for the authorisation and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicines Agency. *Official Journal of the European Union* **30/04/2004** **L136**, 1-33. Accesible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s17139e/s17139e.pdf>.
- OJEU (2004b). 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. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:EN:PDF>.
- OJEU (2005a). Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Official Journal of the European Union* **16/03/2005** **L70**, 1-16. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:en:PDF>.
- 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. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:354:0016:0033:en:PDF>.
- OJEU (2009a). Commission Directive 2009/9/EC of 10 February 2009 amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for veterinary use. *Official Journal of the European Union* **14/02/2009** **L44**, 10-61. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:044:0010:0061:EN:PDF>.
- OJEU (2009b). Council Decision 2009/121/EC of 18 December 2008 rejecting the proposal from the Commission for a Council Regulation implementing Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as regards the use of antimicrobial substances to remove surface contamination from poultry carcasses. *Official Journal of the European Union* **13/02/2009** **L42**, 13-15. Accesible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:042:0013:0015:EN:PDF>.
- 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.

- Pascale, M. (2010). Future prospects for the European egg industry. Worldpoultry.net. Accesible en: <http://www.worldpoultry.net/chickens/marketing/eggs/future-prospects-for-the-european-egg-industry-7678.html>.
- Patterson, D. L. y Rice, L. B. (2003). Empirical antibiotic choice for the seriously ill patients: Are minimization of selection resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive? *Clinical Infectious Diseases* **36** (8), 1006-1012.
- 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.
- Phillips, I. (2007). Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *International Journal of Antimicrobial Agents* **30** (2), 101-107.
- Popoff, M. Y., Bockemuhl, J. y Gheesling, L. L. (2003). Supplement 2001 (Nº 45) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* **154**, 173-174.
- 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.
- Rajkovic, A., Smigic, N., Uyttendaele, M., Medic, H., Zutter, L. de y Devlieghere, F. (2009). Resistance of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Campylobacter jejuni* after exposure to repetitive cycles of mild bactericidal treatments. *Food Microbiology* **26** (8), 889-895.
- 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.
- Rice, L. B. (2009). The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Current Opinion in Microbiology* **12** (5), 476-481.
- Rosen, G. D. (2004). Optimizing the replacement of pronutrient antibiotics in poultry nutrition, pp. 93-101. En: *Proceedings of Alltech's 20th Annual International Symposium*. Alltech, Lexington.
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The landscape of antibiotic resistance. *Environmental Health Perspectives* **117**, A245-A250.
- Sarwari, A., Magder, S., Levine, P., McNamara, A., Knowler, S., Armstrong, G., Etzel, R., Hollingsworth, J. y Morris, J. (2001). Serovar distribution of *Salmonella* isolates found in humans. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 1295.

- SCENIHR (2009). *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf.
- 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. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_015.pdf.
- Sheldon, A. T., Jr. (2005). Antiseptic "resistance": real or perceived threat? *Clinical Infectious Diseases* **40** (11), 1650-1656.
- Sidhu, M. S., Heir E., Leegaard T., Wiger K. y Holck A. (2002). Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46** (9), 2797-2803.
- Sinanoglou, V. J., Strati, I. F. y Miniadis-Meimaroglou, S. (2011). Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: a comparative study. *Food Chemistry* **124**, 971-977.
- Sørum, H. (2006). Antimicrobial Drug Resistance in Fish Pathogens, pp. 213-238. En: Aarestrup, F. M. (Ed.), *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal origin*. American Society for Microbiology Press, Washington D.C.
- The Judicial Commission of the International Committee for Systematics of Prokaryotes (2005). Opinion. The type species of genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2^T, and conservation of the epithet enterica in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 519-520.
- 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.
- Thorrold, C. A., Letsoalo, M. E., Dusé, A. G. y Marais, E. (2007). Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal of Food Microbiology* **113** (3), 315-320.
- Tkachenko O., Shepard, J., Aris V. M., Joy, A., Bello, A., Londono, I., Marku, J., Soteropoulos, P. y Peteroy-Kelly, M. A. (2007). A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. *Research in Microbiology* **158** (8-9), 651-658.

- Ungemach, F. R. (2000). Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. *Acta Veterinaria Scandinavica Suppl.* **93**, 89-98.
- 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.
- Varma, J. K., Marcus, R., Stenzel, S. A., Hanna, S. S., Gettner, S., Anderson, B. J., Hayes, T., Shiferaw, B., Crume, T. L., Joyce, K., Fullerton, K. E., Voetsch, A. C. y Angulo, F. J. (2006). Highly resistant *Salmonella* Newport-MDRampC transmitted through the domestic US food supply: a FoodNet case-control study of sporadic *Salmonella* Newport infections, 2002-2003. *The Journal of Infectious Diseases* **194** (2), 222-230.
- Velge, P., Cloeckaert, A. y Barrow, P. (2005). Review. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Veterinary Research* **36**, 267-288.
- Vidaver, A. K. (2002). Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Diseases* **34** (Suppl. 3), S107-S110.
- Watson, R. (2008). Multidrug resistance responsible for half of deaths from healthcare associated infections in Europe. *British Medical Journal* **336** (7656), 1266-1267.
- WHO (1997). The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a World Health Organization meeting, Berlin, Germany, 13-17 October 1997. Accesible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/1997/WHO EMC_ZOO_97.4.pdf.
- WHO (2000). World Health Organization global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food. Report of a WHO consultation with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the Office International des Epizooties (OIE), Geneva, Switzerland, 5-9 June, 2000. Accesible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_CSRAPH_2000.4.pdf.
- WHO (2001). World Health Organization global strategy for containment of antimicrobial resistance. Accesible en: http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_DRS_2001_2_EN/en/
- WHO (2002). World Health Organization. Antimicrobial resistance. Fact sheet N° 194. Accesible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.
- WHO (2003). Impacts of antimicrobial growth promoter termination in Denmark. WHO/CDS/CPE/ZFK/2003.1 Document. World Health Organization, Foulum, Denmark. Accesible en: http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_CDS_CPE_ZFK_2003.1.pdf.
- WHO (2004). Second Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Management options, 15-18 March 2004. Oslo, Norway. Accesible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/oslo_report.pdf.

- WHO (2006). Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Report of a Joint FAO/OIE/WHO expert consultation. World Health Organization, Seoul, Republic of Korea, 13-16 June, 2006. Accesible en: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf.
- WHO (2007). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine: Categorization for the Development of Risk Management Strategies to contain Antimicrobial resistance due to Non-Human Antimicrobial Use. Report of the Second WHO Expert Meeting Copenhagen, 29–31 May 2007. Copenhagen, 29-31 May 2007. Accesible en: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/antimicrobials_human.pdf.
- WHO (2009). *Related WHO publications and links on antimicrobial resistance*. Accesible en: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/publications/en/index.html.
- Wierup, M. (2001). The Swedish experience of the 1986 year ban of antimicrobial growth promoters, with special reference to animal health, disease prevention, productivity, and usage of antimicrobials. *Microbial Drug Resistance* 7 (2), 183-190.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Como se ha señalado, la carne es un vehículo frecuente de microorganismos patógenos para el hombre. En el año 2010, se produjeron en la Unión Europea un total de 5.262 brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (43.473 casos), estando la carne de mamíferos y aves implicada en el 20,2% de ellos (EFSA, 2012). Entre los principales microorganismos responsables de infecciones alimentarias se encuentra *Salmonella*, que fue responsable de 1.604 brotes (12.352 casos asociados; 2.201 hospitalizaciones y 16 fallecimientos) de enfermedad transmitida por alimentos en 2010 (lo que supone un 30,5% del total) y sitúa a este microorganismo como primer agente etiológico de enfermedades transmitidas por alimentos (EFSA, 2012).

Con el objetivo de reducir este riesgo, en algunos países (EE.UU., Canadá, Australia o Nueva Zelanda) se aplican a la carne tratamientos antimicrobianos o descontaminantes (por ejemplo fosfato trisódico, clorito sódico acidificado o ácidos orgánicos). La efectividad de estos tratamientos para reducir los niveles y/o la prevalencia de microorganismos patógenos y alterantes en la superficie de la carne está bien documentada (Buncic y Sofos, 2012; Del Río *et al.*, 2007). Sin embargo, recientemente, tanto las autoridades sanitarias de la UE como la comunidad científica han comenzado a expresar su preocupación en relación con el uso de estos tratamientos, ante la posible selección de microorganismos con susceptibilidad reducida a antibióticos cuando las bacterias contactan con dosis subinhibitorias de los descontaminantes (EFSA, 2008; SCHER/SCENIHR, 2008). En este sentido, se ha sugerido que estos tratamientos podrían favorecer el crecimiento de las bacterias tolerantes (tolerancia intrínseca o adquirida) a los antimicrobianos en general, dada la eliminación de la microbiota sensible competitiva. Por presión selectiva, estas bacterias resistentes podrían sobrevivir y multiplicarse, originando una progenie resistente (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Recientemente se ha demostrado la relación entre tolerancia a descontaminantes y resistencia a antibióticos (Alonso-Hernando *et al.*, 2009; Capita, 2007). Sin embargo, estos estudios se han llevado a cabo en caldo de cultivo y, hasta donde llega nuestro conocimiento, **son inexistentes los estudios realizados en carne encaminados a investigar el posible efecto de los tratamientos descontaminantes en la selección de cepas resistentes a antibióticos.**

Efectivamente, a lo largo de los últimos años se ha venido produciendo un aumento de la preocupación en relación con la resistencia bacteriana a los antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013). En este contexto, la monitorización de la resistencia a antibióticos es esencial para conocer la magnitud y las tendencias de este importante problema de Salud Pública, así como para planificar las estrategias de control. En la Unión Europea los Estados Miembros están obligados a monitorizar las resistencias en el caso de *Salmonella* y *Campylobacter* de origen animal o alimentario (EFSA, 2010). Sin embargo, **es muy escasa la información disponible sobre la prevalencia y susceptibilidad a antibióticos de *Salmonella* en carne de pollo adquirida en establecimientos de venta al público en el Noroeste de España y no se han llevado a cabo estudios previos que comparen los datos obtenidos a lo largo de los años.**

Al igual que la carne, los huevos son productos avícolas frecuentemente contaminados con microorganismos patógenos para el hombre, principalmente *Salmonella*. En la UE, el 22,1% de los brotes de enfermedad transmitida por alimentos en 2010 fueron causados por huevos y ovoproductos, siendo estos alimentos la principal fuente de infecciones de origen alimentario (EFSA, 2012). Puesto que la concentración de microorganismos en la superficie de los huevos está directamente relacionada con el riesgo de penetración y contaminación de la clara y de la yema, así como de contaminación cruzada a otros alimentos, la carga microbiana de la cáscara de los huevos implica un riesgo que debe ser evaluado y controlado. Hasta el momento, **no se han llevado a cabo estudios para determinar el nivel de contaminación microbiológica de la superficie de huevos de mesa en el Noroeste de España, y tampoco se han realizado, aparentemente, investigaciones encaminadas a conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos en huevos de aves procedentes de diferentes sistemas de alojamiento.**

Como se ha señalado, la carne de ave constituye una parte muy importante de la dieta humana. De hecho, el consumo medio anual de este producto en el ámbito mundial (12,60 kg por persona) ha aumentado a lo largo de las últimas décadas hasta superar al consumo de carne de vacuno (9,60 kg) y aproximarse al de carne de cerdo (15,00 kg) (FAO, 2011). Teniendo en cuenta este elevado nivel de consumo, la calidad (incluyendo la calidad microbiológica) de la carne de ave en el momento de su consumo es un aspecto importante para la Industria, la Administración y el Consumidor. Hay que tener en cuenta que el nivel de

contaminación bacteriana de la carne fresca de ave tiene importantes implicaciones tanto desde el punto de vista de la Seguridad Alimentaria como de la vida útil del producto.

Por otro lado los alimentos procedentes de sistemas de producción orgánica, incluyendo la carne de ave, son de fácil acceso en los países desarrollados y su consumo está aumentando desde hace algunos años (Nie y Zepeda, 2011). Al contrario de lo que ocurre en la producción convencional de las aves, donde los agentes antimicrobianos son ampliamente usados para el tratamiento, control y prevención de las enfermedades (los antibióticos están prohibidos para la promoción del crecimiento en la UE desde enero de 2006; Capita y Alonso-Calleja, 2013), la producción ecológica es muy restrictiva con el uso de antimicrobianos (Luangtongkum *et al.*, 2006). La percepción de los consumidores en relación con las prácticas de cría usadas en las granjas de aves es claramente más positiva por lo que respecta a las explotaciones ecológicas que a las convencionales (cría intensiva). Esta percepción influye claramente en la intención de compra de los consumidores (Soonthornchaikul *et al.*, 2006). Sin embargo, **existe muy poca información disponible en relación con el impacto de las prácticas de producción orgánica en la carga microbiana y en los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias aisladas de la carne.**

Finalmente, señalar que actualmente una de las técnicas más empleadas para poner de manifiesto la resistencia a antibióticos en bacterias de origen alimentario es el método de difusión por disco sobre agar Mueller-Hinton (Sjölund *et al.*, 2009). Sin embargo, esta técnica es laboriosa e implica un importante consumo de tiempo y material. Por ello, se han desarrollado y comercializado en los últimos años diferentes pruebas rápidas para la determinación *in vitro* de la susceptibilidad bacteriana a los antibióticos. El sistema “*Sensi Test Gram-negative*” (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy) consta de 24 pocillos con antibióticos deshidratados para la realización de antibiogramas en bacterias Gram-negativas y enterococos, que permite la obtención de resultados en 18-24 horas. **Hasta el momento no existe información publicada en relación con la concordancia entre el procedimiento convencional de difusión por disco y el sistema miniaturizado señalado.**

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

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2009). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20** (12), 1108-1111.
- Buncic, S. y Sofos, J., 2012. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International* **45**, 641-655.
- Capita, R. (2007). Variation in *Salmonella* resistance to poultry chemical decontaminants, based on serotype, phage type, and antibiotic resistance patterns. *Journal of Food Protection* **70** (8), 1835–1843.
- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11-48.
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* **115**, 268-280.
- EFSA (2008). Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *The EFSA Journal* **659**, 2-26.
- EFSA (2010). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **8**, 1658-1918. Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1658.pdf>.
- EFSA (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* **10**, 2597-3038. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>.
- FAO (2011). Faostat: Food Balance Sheets. Accesible en: <http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor>.
- Luangtongkum, T., Morishita, T. Y., Ison, A. J., Huang, S., McDermott, P. F. y Zhang, Q. (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (5), 3600-3607.
- Nie, C. y Zepeda, L. (2011). Lifestyle segmentation of US food shoppers to examine organic and local food consumption. *Appetite* **57** (1), 28-37.
- 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. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_015.pdf.

Sjölund, M., Bengtsson, S., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Olsen, B. y Kahlmeter, G. (2009). Antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* of human and avian origin-a comparison of wild-type distributions. *Clinical Microbiology and Infection* **15**, 461-465.

Soonthornchaikul, N., Garelick, Jones, H., Jacobs, J., Ball, D. y Choudhury, M. (2006). Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated for organically- and intensively-reared chickens purchased from retail outlets. *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**, 125-130.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Conocer la influencia de:

- 1) el año del análisis (1993 o 2006),
- 2) algunos tratamientos químicos de descontaminación de la carne,
- 3) el sistema de alojamiento de las aves y
- 4) la especie animal

en la resistencia a antibióticos de bacterias de origen avícola en España.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Conocer la prevalencia, serotipos, fagotipos y antibiotipos de *Salmonella* en carne de pollo adquirida en establecimientos de venta al público del noroeste de España.
2. Conocer los niveles de contaminación microbiana de carne de ave de diferentes especies de cría convencional y orgánica.
3. Conocer y comparar la efectividad antimicrobiana de algunos compuestos descontaminantes de la carne de pollo.
4. Conocer los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* de carne de ave de diferentes especies de cría convencional y orgánica.
5. Conocer la carga microbiana de huevos de gallina y codorniz procedentes de aves sometidas a diferentes sistemas de alojamiento.
6. Conocer los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* de huevos de gallina y codorniz procedentes de aves sometidas a diferentes sistemas de alojamiento.
7. Comparar los resultados obtenidos mediante el sistema tradicional de difusión por disco y los de un sistema miniaturizado disponible comercialmente para determinar la resistencia a antibióticos (*Sensi Test Gram-negative*).

CAPÍTULO I

**PREVALENCIA Y RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN SEROTIPOS DE
Salmonella AISLADOS DE CARNE DE AVE EN ESPAÑA: COMPARACIÓN
ENTRE 1993 Y 2006**

RESUMEN

Se obtuvieron, en 10 establecimientos de venta al público del noroeste de España, un total de 226 muestras de carne de pollo (canales, muslos, alas, cuellos y pechugas) (73 en 1993 y 153 en 2006), que se analizaron para detectar la presencia de *Salmonella*. Las cepas aisladas se sometieron a serotipia, fagotipia (*Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *S. Typhimurium*) y se determinó su susceptibilidad a antimicrobianos (15 antimicrobianos; método de difusión por disco). Se detectó *Salmonella* en 40 (55,0%) muestras en 1993 y en 19 (12,4%) en 2006 ($P<0,001$). Los serotipos (*S. Enteritidis*, *S. Poona*, *S. Infantis*, *S. Newport* y *S. Typhimurium*) y fagotipos (1, 4, 14b y 35 en el caso de *S. Enteritidis* y 193 para *S. Typhimurium*) que se detectaron se encuentran entre los principales tipos responsables de salmonelosis humana en España. Todas las cepas eran multi-resistentes (resistentes a entre 3 y 13 antimicrobianos). El número medio de resistencias por cepa aumentó ($P<0,05$) desde 3,98 en 1993 hasta 5,00 en 2006. Se observó un aumento de la incidencia de resistencia entre 1993 y 2006 para la cefalotina ($P<0,01$), enrofloxacina ($P<0,001$) y tetraciclina ($P<0,01$). La disminución en la prevalencia de *Salmonella* observada entre 1993 y 2006 sugiere que las medidas obligatorias que se han introducido a lo largo de la última década en la Unión Europea para reducir la incidencia de la *Salmonella* en aves han tenido éxito. Sin embargo, el aumento en las tasas de resistencia a antibióticos es un motivo de preocupación y supone una amenaza para la Salud Pública. Puesto que los datos de este estudio han puesto de manifiesto que la carne de pollo en el noroeste de España es una fuente potencial de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos, se destaca la necesidad de la educación del consumidor en buenas prácticas higiénicas.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Salmonella enterica es una causa frecuente de gastroenteritis humana tanto en los países desarrollados como en aquéllos en vía de desarrollo, provocando millones de enfermedades humanas y animales, así como importantes pérdidas económicas, por todo el mundo. En la Unión Europea, la incidencia de infecciones por *Salmonella* en 2009 fue de 23,7 por 100.000 habitantes, con un total de 108.614 casos confirmados, siendo ésta la segunda enfermedad zoonótica responsable de enfermedad humana, después de la campilobacteriosis (EFSA, 2011). Hay varias rutas para contraer salmonelosis, pero el consumo de alimentos contaminados es, con diferencia, la causa más frecuente de infecciones humanas (Lestari *et al.*, 2009). Durante 2009, *Salmonella* fue responsable de 1.722 brotes de enfermedad causada por alimentos (31,0 % de todos los brotes alimentarios y 33,2% de los brotes confirmados) en la UE, siendo el agente etiológico más comúnmente asociado a los brotes alimentarios registrados. *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y *S. Typhimurium* fueron los serotipos predominantes asociados a estas infecciones (59,6% y 15,7% de los brotes de salmonelosis, respectivamente) (EFSA, 2011).

Los métodos de producción de alimentos de origen animal y las prácticas llevadas a cabo en los mataderos pueden aumentar la propagación de *Salmonella* entre los animales productores de alimentos. En la producción primaria existen condiciones que facilitan la diseminación de las bacterias, tales como la alta densidad de animales. Además, en los mataderos modernos el elevado ritmo de producción mantiene a los animales en estrecha proximidad a lo largo del procesado, lo cual conduce a la transferencia de bacterias entre unas canales y otras (Capita *et al.*, 2007). Por lo tanto, los alimentos de origen animal, especialmente la carne de aves y mamíferos, son los principales vehículos para la transmisión de la salmonelosis humana debido a episodios de contaminación cruzada o a un cocinado inadecuado (Capita *et al.*, 2007). Según el informe anual de 2009 del RASFF (siglas en inglés de *Rapid Alert System for Food and Feed* – Sistema de alerta rápida para alimentos y piensos), *Salmonella* es el microorganismo que se notifica con más frecuencia, siendo las notificaciones relacionadas con las aves (aproximadamente 70) y con las carnes rojas (50) las más comunes (European Commission, 2010). Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de *Salmonella* en las aves, se han implementado programas de control en la UE

en los últimos años para las manadas de *Gallus gallus* (incluyendo manadas de cría, ponedoras y pollos broiler) (EFSA, 2011).

Durante las últimas décadas ha crecido la preocupación por el incremento de las resistencias a antibióticos en cepas de microorganismos patógenos, incluyendo *Salmonella* (Capita y Alonso-Calleja, 2013), y las repercusiones que ello puede tener en el ámbito de la Salud Pública. Aunque la mayoría de los casos de salmonelosis humana son autolimitantes y suelen resolverse en cinco o siete días sin necesidad de tratamiento antimicrobiano, la terapia con antibióticos (por ejemplo ciprofloxacina en adultos y ceftriaxona en niños) puede ser necesaria para casos graves, enfermedad extra-intestinal o pacientes inmunocomprometidos (Berrang *et al.*, 2009). En este escenario, las cepas de *Salmonella* que son resistentes a antimicrobianos son especialmente preocupantes, ya que pueden comprometer el tratamiento efectivo de la salmonelosis humana. Las personas infectadas con cepas resistentes a antibióticos tienen más posibilidades de sufrir eventos adversos, tales como enfermedad prolongada, aumento de la gravedad de la enfermedad, hospitalización o fallecimiento, que los que están infectados con cepas susceptibles (Cook *et al.*, 2009).

Es esencial llevar a cabo una monitorización de las resistencias bacterianas a los antibióticos para facilitar información acerca de la magnitud del problema y de sus tendencias, y poder así planificar y evaluar el efecto de las intervenciones realizadas. En la Unión Europea, los Estados Miembros están obligados a monitorizar y a informar de la resistencia a antimicrobianos de las cepas de *Salmonella* y *Campylobacter* procedentes de animales y de alimentos (EFSA, 2010). Sin embargo, es muy escasa la información acerca de la prevalencia y de la susceptibilidad a antimicrobianos de *Salmonella* procedente de carne de aves en el noroeste de España. Asimismo, no se han llevado a cabo estudios que comparen los datos obtenidos de los mismos establecimientos a lo largo de varios años. Por lo tanto, este estudio se ha llevado a cabo para: 1) determinar la prevalencia, los serotipos y los fagotipos de *Salmonella* en carne de ave adquirida en establecimientos de venta al público en el noroeste de España, 2) investigar los perfiles de resistencia de las cepas a antibióticos de uso frecuente como agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria y 3) comparar la prevalencia, los tipos y los perfiles de resistencia a antibióticos observados en 1993 y en 2006.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se analizaron un total de 226 muestras (73 en 1993 y en 153 en 2006) de carne de ave, que consistían en piel de canales y despieces (muslos, alas, cuellos y pechugas) de pollos criados de forma convencional (cría intensiva). Cada muestra provenía de un ave diferente. Tanto las muestras de 1993 como las de 2006 se adquirieron en los mismos diez establecimientos de venta al por menor en la provincia de León, y pertenecían a tres marcas diferentes (cada marca procedía de un matadero diferente). El número de muestras que se tomaron en cada establecimiento variaba entre 6 y 8 en 1993 y entre 14 y 16 en 2006. Las muestras se transportaron al laboratorio en bolsas individuales en una nevera portátil y se almacenaron a $3\pm 1^{\circ}$ C durante no más de una hora antes del comienzo del análisis.

Procedimiento de aislamiento

Los análisis se realizaron siguiendo la norma ISO-6579-1993. Las muestras de piel (un total de 25 g) se homogeneizaron en un Masticador (IUL, Barcelona, España) junto con 225 mL de agua peptona tamponada (Oxoid Ltd, Hampshire, Reino Unido). En el caso de los cuellos y las alas cada muestra estaba constituida por dos o más piezas del mismo lote (envase), para obtener así 25 g de piel. Después de la incubación a 37° C durante 24 horas, se transfirieron alícuotas de 0,1 mL a tubos conteniendo 10 mL de caldo selectivo Rappaport-Vassiliadis (Oxoid Ltd.), que se incubaron durante 24 horas a 42° C. Al cabo de este tiempo se procedió a sembrar por estría, utilizando un asa de nicrom, en la superficie de agar Rambach (Merck, Darmstadt, Alemania), agar xilosa lisina desoxicolato (XLD, Oxoid Ltd.) y agar entérico Hektoen (Oxoid Ltd). Las placas se incubaron a 37° C entre 24 y 48 h. Aquellas colonias con morfología característica de *Salmonella* se identificaron en base a la tinción Gram, la reacción de la catalasa, la reacción de la oxidasa y la oxidación/fermentación de glucosa. Las cepas que se correspondían con bacilos Gram negativos, catalasa positivos, oxidasa negativos y con capacidad para oxidar y fermentar glucosa se sometieron a caracterización utilizando galerías minaturizadas API 20E (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las bacterias se identificaron utilizando la base de datos API LAB Plus versión 3.2.2. (bioMérieux).

Las cepas de *Salmonella* se mantuvieron congeladas a -20° C después de su re-suspensión en caldo triptona de soja (Oxoid Ltd.) (TSB) con 20% (v/v) de glicerol. En el año 2006 todas las cepas fueron sometidas a serotipia, fagotipia y pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Se tipificó una cepa de *Salmonella* de cada muestra positiva.

Serotipia y fagotipia

La asignación a serotipos y a fagotipos (sólo se fagotiparon las cepas de los serotipos S. Enteritidis y S. Typhimurium) se llevó a cabo en el “Laboratorio Nacional de Referencia para *Salmonella* y *Shigella* de España” (LNRSSSE) del Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, España.

Evaluación de la susceptibilidad a antimicrobianos

Se examinó la susceptibilidad de las cepas frente a un panel de 15 antimicrobianos en agar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.) por el método de difusión por disco, según describe el *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). Se utilizaron los siguientes discos de antibióticos (Oxoid Ltd.): gentamicina (GEN; 10µg), estreptomina (STR; 10µg), neomicina (N; 10µg), rifampicina (RD; 5µg), ampicilina (AMP; 10µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30µg), cefalotina (CF; 30µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25µg), eritromicina (E; 15µg), cloranfenicol (C; 30µg), enrofloxacina (ENR; 5µg), ciprofloxacina (CIP; 5µg), ácido nalidíxico (NA; 30µg), tetraciclina (TE; 30µg) y furazolidona (FR; 50µg). Se midieron los halos de inhibición y las cepas se clasificaron como sensibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes de acuerdo con los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). Los aislamientos de susceptibilidad intermedia se contabilizaron junto con los que eran resistentes en sentido estricto (Cardinale *et al.*, 2005). Se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 como cepas de referencia para el control de los discos de antibióticos. Una cepa se definió como resistente si mostraba resistencia a uno o más de los agentes analizados, mientras que las cepas resistentes a dos o más antimicrobianos se clasificaron como multi-resistentes (Capita *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

La prevalencia de *Salmonella* en la carne de ave y la frecuencia de las cepas resistentes a antibióticos se compararon por medio de las pruebas de Chi-cuadrado y de

Fisher. La prueba t de Student se realizó para comparar el número medio de antibióticos a los que las cepas eran resistentes. Los análisis se realizaron utilizando el paquete informático Statistica® 6.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

RESULTADOS

Prevalencia de *Salmonella*

Del total de las 226 muestras analizadas en 1993 y 2006, 59 (22,7%) fueron positivas para *Salmonella*, con un límite de detección de una unidad formadora de colonias por 25 g (1 ufc/25 g) de piel. Se encontraron prevalencias similares entre todos los tipos de muestras tanto en 1993 como en 2006. El porcentaje de muestras con *Salmonella* detectada descendió de forma significativa ($P < 0,001$) entre 1993 (40 de 73; 55% de muestras positivas) y 2006 (19 de 153; 12,4%).

Serotipos y fagotipos

De las 40 cepas de *Salmonella* aisladas en 1993, 28 (70,0%) se identificaron como *Salmonella enterica* serotipo Enteritidis y 12 (30,3%) como *S. Poona*. Entre las 19 cepas positivas para *Salmonella* en 2006, 14 (73,7%) estaban contaminadas con *S. Enteritidis*, 2 (10,5%) con *S. Infantis*, 2 (10,5%) con *S. Newport* y 1 (5,3%) con *S. Typhimurium*. Las cepas de *S. Enteritidis* se adscribieron a cuatro fagotipos (4 y 35 en 1993; 1 y 14b en 2006). La cepa perteneciente al serotipo *S. Typhimurium* se asignó al fagotipo 193.

Susceptibilidad a antimicrobianos

Se determinó la susceptibilidad a antimicrobianos de 59 cepas de *Salmonella enterica* (40 de 1993 y 19 de 2006) aisladas de muestras de carne de ave. Las Tablas I.1 y I.2 resumen los patrones de resistencia a 15 antimicrobianos de las cepas aisladas en 1993 (9 patrones diferentes) y 2006 (13 patrones). El patrón predominante fue la resistencia a RD/E/NA, que fue mostrado por 8 cepas en 1993 y por 5 cepas en 2006. Todas las cepas analizadas presentaron resistencia a los antibióticos mencionados anteriormente. No se observó ninguna asociación entre los patrones de resistencia antimicrobiana y un serotipo o fagotipo en particular.

Tabla I.1. Perfiles de resistencia a antibióticos de los 40 aislamientos de *Salmonella* procedentes de aves en 1993.

Serotipo / Fagotipo	Perfil de resistencia	Número de cepas
S. Enteritidis / 4	RD/E/NA	8
S. Enteritidis / 4	STR/RD/E/NA	5
S. Enteritidis / 4	N/RD/E/NA	3
S. Enteritidis / 4	RD/SXT/E/NA	7
S. Enteritidis / 35	RD/SXT/E/NA	5
S. Poona	RD/E/NA	2
S. Poona	STR/RD/E/NA	1
S. Poona	STR/N/RD/E/NA	5
S. Poona	N/RD/SXT/E/NA	4

GEN (gentamicina; 10µg), STR (estreptomicina; 10µg), N (neomicina; 10µg), RD (rifampicina; 5µg), AMP (ampicilina; 10µg), AMC (amoxicilina-ácido clavulánico; 30µg), CF (cefalotina; 30µg), SXT (sulfametoxazol-trimetoprim; 25µg), E (eritromicina; 15µg), C (cloranfenicol; 30µg), ENR (enrofloxacina; 5µg), CIP (ciprofloxacina; 5µg), NA (ácido nalidixico; 30µg), TE (tetraciclina; 30µg) y FR (furazolidona; 50µg).

Tabla I.2. Perfiles de los 19 aislamientos de *Salmonella* resistentes a antibióticos procedentes de aves en 2006.

Serotipo / Fagotipo	Perfil de resistencia	Número de cepas
S. Enteritidis / 1	RD/E/NA/TE	1
S. Enteritidis / 1	STR/RD/E/NA/TE	1
S. Enteritidis / 1	RD/AMP/E/NA	1
S. Enteritidis / 1	RD/E/ ENR/NA	3
S. Enteritidis / 1	STR/N/RD/CF/E/NA	1
S. Enteritidis / 1	STR/RD/E/ ENR/NA/TE	1
S. Enteritidis / 1	STR/N/RD/AMP/AMC/CF/SXT/E/C/ ENR/NA/TE/FR	1
S. Enteritidis / 14b	RD/E/NA	5
S. Infantis	STR/N/RD/E/NA	1
S. Infantis	STR/N/RD/E/ENR/NA	1
S. Newport	N/RD/CF/E/ENR/NA	1
S. Newport	STR/N/RD/CF/E/ENR/NA	1
S. Typhimurium / 193	N/RD/AMC/CF/E/NA	1

Para interpretación, ver la Tabla I.1.

Todas las cepas mostraron resistencias múltiples a tres o más compuestos antimicrobianos. Las 40 cepas de *Salmonella* de 1993 eran resistentes a 3 (25,0%), 4 (52,5%) ó 5 (22,5%) antibióticos, mientras que las cepas obtenidas en 2006 (19) mostraron resistencia a 3 (26,3%), 4 (26,3%), 5 (10,5%), 6 (26,3%), 7 (5,3%), o incluso 13 (5,3%) antibióticos diferentes (Figura I.1). El número medio de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes fue menor ($P<0,05$) en 1993 (3,98) que en 2006 (5,00). De los serotipos identificados en el presente estudio, *S. Enteritidis* mostró el menor número medio de resistencias por cepa, tanto en 1993 (3,71) como en 2006 (4,64). Los datos para otros serotipos fueron 4,58 (*S. Poona*), 5,50 (*S. Infantis*), 6,50 (*S. Newport*) y 6,00 (*S. Typhimurium*).

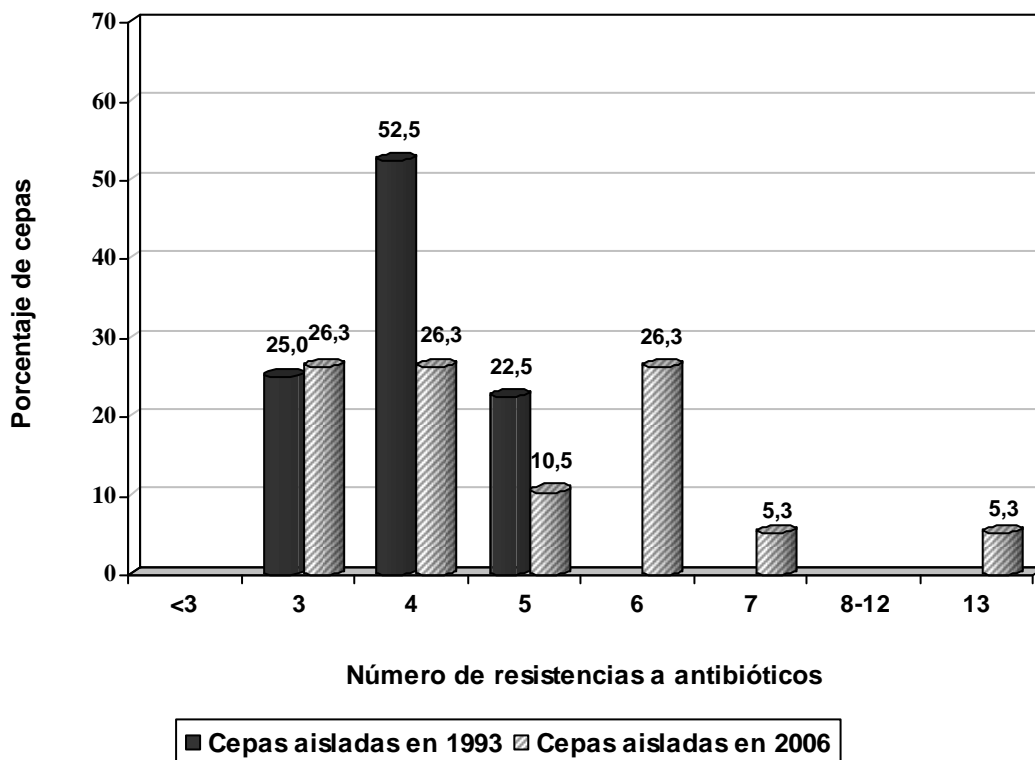
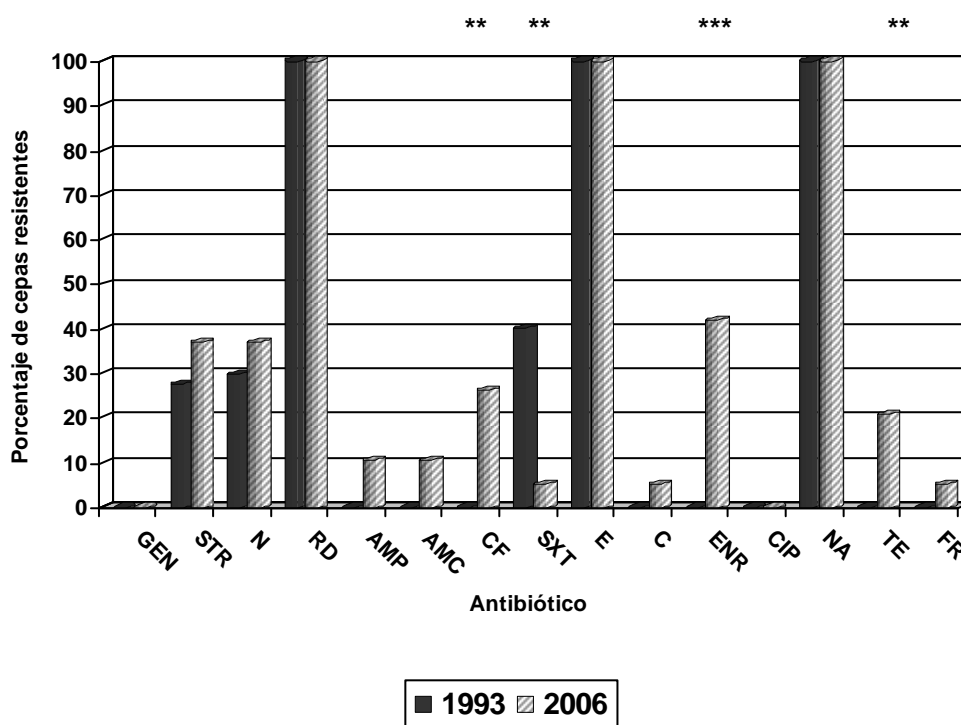


Figura I.1. Distribución de las cepas de *Salmonella* aisladas de aves según el número de antibióticos a los que fueron resistentes.

La mayor incidencia de resistencia ($P<0,001$) en 1993 y 2006 se encontró para la rifampicina, eritromicina y ácido nalidíxico (100% de las cepas). En 1996 se observó también resistencia frente a SXT (40%), N (30%) y STR (27,5%). En 2006, se observó una incidencia intermedia de resistencia frente a STR, N, CF, ENR y TE, con un número de entre 4 y 8 cepas resistentes (entre 21,1% y 42,1%). Algunas cepas en 2006 mostraron resistencia a AMC, AMP (10,5%), SXT, C y FR (5,3%) (Figura I.2). Se observó un aumento en la incidencia de la resistencia entre 1993 y 2006 para CF ($P<0,01$), ENR ($P<0,001$) y TE ($P<0,01$). La resistencia a SXT disminuyó ($P<0,01$) entre 1993 y 2006.



** , $P<0,01$; *** , $P<0,001$

GEN (gentamicina; 10µg), STR (estreptomina; 10µg), N (neomicina; 10µg), RD (rifampicina; 5µg), AMP (ampicilina; 10µg), AMC (amoxicilina-ácido clavulánico; 30µg), CF (cefalotina; 30µg), SXT (sulfametoxazol-trimetoprim; 25µg), E (eritromicina; 15µg), C (cloranfenicol; 30µg), ENR (enrofloxacina; 5µg), CIP (ciprofloxacina; 5µg), NA (ácido nalidíxico; 30µg), TE (tetraciclina; 30µg) y FR (furazolidona; 50µg).

Figura I.2. Porcentaje de cepas de *Salmonella* resistentes a cada antibiótico analizado.

DISCUSIÓN

Prevalencia de *Salmonella*

La prevalencia de *Salmonella* observada por otros autores en productos avícolas, muestreando diferentes partes de la canal y utilizando distintos tamaños de muestra, oscila entre 0 y 100% (Foley *et al.*, 2008; Waldroup, 1996), con porcentajes de contaminación generalmente inferiores en los países más desarrollados (Dallal *et al.*, 2010; Galanis *et al.*, 2006). Tasas de contaminación similares a las del presente estudio (22,7%) han sido observadas en Sudáfrica (19% en canales pollo adquiridas en establecimientos de venta al por menor utilizando el método no destructivo de lavado; Nierop *et al.*, 2005), en Marruecos (20,83% en canales, despieces y menudillos de pollo procedentes de establecimientos de venta al por menor analizando 25 g de muestra; Abdellah *et al.*, 2009), en Lousiana (20,8-22,0% en canales de pollos de cría convencional y orgánica procedentes de establecimientos minoristas de alimentación empleando el método de lavado; Lestari *et al.*, 2009), en Québec (21,2% de canales de pollo a nivel de matadero mediante el método de lavado; Arsenault *et al.*, 2007), en Ontario (24% de despieces de pavo procedentes de establecimientos al por menor analizando 25 g de piel; Cook *et al.*, 2009) y Turquía (29,3% de carne de aves procedentes de establecimientos *delicatessen*, analizando 25 g de carne; Arslan y Eyi, 2010). Al igual que en el presente estudio, Cook *et al.* (2009) no observaron diferencias significativas en la prevalencia de *Salmonella* entre diferentes tipos de muestras de pavo (pechugas, alas o muslos) en Canadá. En establecimientos de venta al público del Sur de la India, Suresh *et al.* (2011) detectaron una prevalencia similar de *Salmonella* en distintas partes de la canal de pollos (utilizando la técnica de hisopado). Por otra parte, Miranda *et al.* (2009) observaron mayores tasas de contaminación con *Salmonella* en la piel del cuello que en el resto de las muestras de pollos broiler (muslos, pechugas y alas) recogidas en supermercados y establecimientos al por menor en Méjico, y Abdellah *et al.* (2009) detectaron en Marruecos una mayor prevalencia de *Salmonella* en despieces que en canales de pollo.

En el presente estudio se ha observado un descenso significativo en la prevalencia de *Salmonella* en carne de pollo entre 1993 y 2006. Teniendo en cuenta que la prevalencia de *Salmonella* en la carne de ave puede ser un reflejo de la incidencia de este micro-organismo

en las granjas de las que procedían los pollos (Rodrigo *et al.*, 2006), las tasas de contaminación relativamente bajas que se han observado podrían deberse a una combinación de varios factores. En primer lugar, a lo largo de los últimos años, los productores de aves en España han estado vacunando contra *Salmonella* ciertas manadas (por ejemplo las de pollos de carne y las de gallinas ponedoras). Además, la introducción en España, así como en otros países de la Unión Europea, de la obligatoriedad de sacrificio (con compensación económica) de las manadas de aves reproductoras y de gallinas ponedoras infectadas con *S. Enteritidis* o *S. Typhimurium* puede haber contribuido también al descenso de la prevalencia de *Salmonella* en carne de ave (Capita *et al.*, 2007; EFSA, 2011). La legislación exige también trazabilidad y vigilancia de las manadas de reproductoras y pollos *broiler*, así como los detalles de movimiento de las aves. La introducción de sistemas obligatorios basados en el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP por sus siglas en inglés) en las plantas de procesado de aves de la UE durante los 1990 (Anónimo, 1993) puede haber jugado también un papel importante en la reducción de la *Salmonella* en las aves en los últimos años. Al igual que en el presente estudio, las publicaciones recientes en la Unión Europea también muestran un descenso en la prevalencia de *Salmonella* en las aves como consecuencia de la implementación de las normativas señaladas (Hue *et al.*, 2011).

Serotipos y fagotipos

Cuatro de los cinco serotipos detectados en el presente estudio (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Newport* y *S. Typhimurium*) están entre los 5 serotipos más frecuentemente implicados en casos de salmonelosis humana en España (Velasco *et al.*, 2009) y en la Unión Europea (EFSA, 2011) en los últimos años. En los EE.UU., los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) han indicado que *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Newport*, en este orden, son los serotipos más frecuentemente registrados por los laboratorios de Salud Pública (CDC, 2011). Este hecho confirma la opinión de que muchos casos de salmonelosis humana podrían tener su origen en los alimentos de origen avícola, como se ha sugerido con anterioridad (Capita *et al.*, 2007).

Los serotipos de *Salmonella* detectados en el presente estudio coinciden con datos obtenidos en la Unión Europea, en los que se indica que *S. Infantis* y *S. Enteritidis* eran los serotipos predominantes en canales de pollos *broiler* en 2009, ocupando *S. Typhimurium* la

cuarta posición (EFSA, 2011). *S. Enteritidis* fue el serotipo aislado con mayor frecuencia en la investigación que presentamos aquí (70% de muestras positivas en 1993 y 73,7% en 2006). Este serotipo ha sido también el predominante en productos avícolas en estudios llevados a cabo con anterioridad, en los que la carne de ave y los huevos se han identificado como el principal reservorio de *S. Enteritidis* (Cardinale *et al.*, 2005; Dogru *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2005). La elevada prevalencia de *S. Enteritidis* en aves es un reflejo de la presencia de estos microorganismos en el tracto intestinal de los pollos *broiler* vivos, produciéndose la contaminación de las canales durante el sacrificio y procesado (Capita *et al.*, 2007), lo que conlleva un aumento del riesgo de infección en seres humanos. De este modo, algunos datos obtenidos en Asia, Europa y Latinoamérica ponen de manifiesto que *S. Enteritidis* es el serotipo más común entre los aislamientos humanos (EFSA, 2011; Galanis *et al.*, 2006).

Mediante la utilización de modelos matemáticos que combinan datos epidemiológicos con la biología de las manadas de aves se ha sugerido que *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* (serotipos responsables de enfermedades en las aves) ejercían una exclusión competitiva sobre el serotipo *S. Enteritidis* en las explotaciones avícolas (Rabsch *et al.*, 2000). Durante las décadas de 1960s y 1970s se implementaron medidas de control para reducir ambas infecciones avícolas. Parece probable que *S. Enteritidis* pasó entonces a ocupar el nicho ecológico creado por el descenso de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum* en las aves (Foley *et al.* 2008).

Las cepas de *S. Typhimurium* tienen una capacidad superior para causar salmonelosis humana que otros serotipos (Sarwari *et al.*, 2001). Aunque *S. Typhimurium* es un serotipo ampliamente distribuido, se detecta con frecuencia en carne de ave (Arslan y Evi, 2010; Parveen *et al.*, 2007; Yildirim *et al.*, 2011). En España, *S. Typhimurium* fue el segundo serotipo, después de *S. Enteritidis*, más frecuentemente detectado en aislamientos clínicos humanos en el periodo comprendido entre 2000 y 2008 (Martínez *et al.*, 2008).

Varios investigadores (Abdellah *et al.*, 2009; Cetinkaya *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2009; Yildirim *et al.*, 2011) han obtenido aislamientos de *S. Infantis* y *S. Newport* a partir de carne de ave. Finalmente, y por lo que respecta a *S. Poona*, algunos autores (Dione *et al.*, 2009) han detectado cepas en carne de pollo. Sin embargo, este serotipo se asocia con más frecuencia al agua que a los alimentos (Capita *et al.*, 2007).

Los fagotipos de *S. Enteritidis* (1, 4, 14b y 35) y *S. Typhimurium* (193) detectados en la presente investigación son coincidentes con hallazgos previos en carne de aves (Chung *et al.*, 2004; Ellerbroek *et al.*, 2010; Valdezate *et al.*, 2007). Estos fagotipos están entre los más frecuentemente involucrados en casos de salmonelosis humana tanto en España (Echeita *et al.* 2005a, b; Hernández *et al.*, 2005) como fuera de nuestras fronteras (Anaraki *et al.*, 2005; Gillespie *et al.*, 2005).

Susceptibilidad a antimicrobianos

Las cepas de *Salmonella* fueron examinadas para determinar su susceptibilidad a 15 antibióticos de importancia clínica tanto en medicina humana como veterinaria. Hay que destacar, como hecho preocupante, que numerosas cepas del presente estudio mostraron resistencia a varios agentes antimicrobianos, es decir fueron multi-resistentes. La elevada incidencia de la combinación de resistencia frente a la rifampicina, la eritromicina y el ácido nalidíxico, observada en las 59 cepas analizadas, podría indicar la presencia de sistemas de transferencia de genes, tales como plásmidos conjugativos bacterianos o transposones, portadores de genes que confieren resistencia a estos antimicrobianos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

El porcentaje de cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes observado en este estudio (100%) es mucho mayor que los encontrados en otras investigaciones en el sur de Italia (2,3% de cepas resistentes; Nastasi *et al.*, 2000). Por otra parte, elevados porcentajes de cepas resistentes o multi-resistentes, similares a los observados en nuestro estudio, se han detectado en carne de ave en Turquía (100%; Arslan y Eyi, 2010; Dogru *et al.*, 2010; Yildirim *et al.*, 2011), España (100%; Carramiñana *et al.*, 2004), Brasil (100%; Dias de Oliveira *et al.*, 2005), Nepal (100%; Shrestha *et al.*, 2010), los EE.UU. (92%; Zhao *et al.*, 2005), Méjico (85,4%; Miranda *et al.*, 2009), China (80%; Yang *et al.*, 2010), Marruecos (75,43%; Abdellah *et al.*, 2009) y Portugal (75%; Antunes *et al.*, 2003). En un estudio realizado recientemente en Korea, Hur *et al.* (2010) observaron que todos los aislamientos de *Salmonella* procedentes de aves eran resistentes a uno o más antimicrobianos y muchas (65,2%) de las cepas eran resistentes a tres o más compuestos. Estos hallazgos vienen a confirmar que las aves son un reservorio importante de cepas de *Salmonella* multi-resistentes, y sugieren la dificultad de alcanzar una terapia antimicrobiana eficaz para la salmonelosis causada por cepas de origen avícola.

Se sabe que el uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos provoca una selección que causa la emergencia de resistencia a antibióticos tanto en microorganismos patógenos como comensales (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Por lo tanto, la alta prevalencia de cepas de *Salmonella* resistentes o multi-resistentes observada en el trabajo presentado aquí y en estudios anteriores puede deberse al uso excesivo de antimicrobianos en el ámbito mundial. Para prevenir la generación, selección y diseminación de resistencias antimicrobianas, el reglamento (CE) N° 1831/2003 prohíbe el uso de antimicrobianos como promotores del crecimiento en animales de abasto dentro de la Unión Europea. Desde enero de 2006 los antibióticos sólo pueden usarse con una finalidad terapéutica o profiláctica. El efecto de esta prohibición es aún desconocido (Capita y Alonso-Calleja, 2013). El uso de antibióticos para la promoción del crecimiento y para aumentar la velocidad de ganancia de peso está permitido en los EE.UU., Canadá y en muchos otros lugares del mundo (Yildirim *et al.*, 2011).

El elevado número de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes en el presente estudio (hay que destacar que una cepa aislada en 2006 fue resistente a 13 compuestos) confirma los hallazgos de otros autores. Así, Yang *et al.* (2010) indicaron que aproximadamente el 28% de los aislamientos de pollo eran resistentes a 9 o más antimicrobianos. Parveen *et al.* (2007) detectaron resistencia a ocho antimicrobianos en dos cepas de *Salmonella* procedentes de carne de ave. Shrestha *et al.* (2010) encontraron cepas de *Salmonella* procedentes de aves en Nepal resistentes a 5 (15,4%), 6 (69,2%), 7 (7,7%) y 8 (5,2%) antimicrobianos. Pan *et al.* (2010) detectaron en China dos cepas de *S. Pullorum* resistentes a 12 antimicrobianos. En Korea, Hur *et al.* (2010) aislaron a partir de carne de ave una cepa de *S. Enteritidis* resistente a 15 antimicrobianos.

El número medio de antimicrobianos a los que las cepas fueron resistentes (3,98 en 1993 y 5,00 in 2006) confirma los resultados de Logue *et al.* (2003), que encontraron un valor medio de resistencia a 4 antimicrobianos en cepas de *Salmonella* procedentes de aves en los EE.UU. El aumento de la resistencia a antibióticos observado en 2006 en comparación con 1993 coincide con los datos epidemiológicos, que muestran un aumento en la resistencia a antibióticos de *Salmonella* del 20% al 30% a principios de la década de 1990's, alcanzando un 70% en algunos países una década después (Su *et al.*, 2004).

El hecho, observado en el presente estudio, de que *S. Typhimurium* esté entre los serotipos con niveles más elevados de resistencia a antibióticos, es un resultado que coincide con la mayoría de las investigaciones (Abdellah *et al.*, 2009; Barton, 2000; Berrang *et al.*, 2009; Capita *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2005; Shresta *et al.*, 2010; Usera *et al.*, 2002). Esta información es alarmante puesto que, según se ha indicado con anterioridad, *S. Typhimurium* tiene consecuencias más negativas para la salud humana que la mayoría de los serotipos de *Salmonella*. Por otra parte, tal y como se ha puesto de manifiesto previamente en España (Capita *et al.*, 2007), Inglaterra (Jones *et al.*, 2002), Korea (Yang *et al.*, 2002) y China (Yang *et al.*, 2010), el serotipo *S. Enteritidis* es menos proclive al desarrollo de resistencias que otros serotipos.

La ampicilina y el cloranfenicol han sido durante décadas los fármacos elegidos para el tratamiento de la salmonelosis humana. No obstante, en años recientes, debido al aumento de la resistencia a estos antimicrobianos, el uso de fluoroquinolonas (en adultos) y de cefalosporinas de amplio espectro (en niños) se ha generalizado (Miranda *et al.*, 2009). En la investigación que se presenta aquí, sólo dos y una cepas fueron resistentes en 2006 a la ampicilina y al cloranfenicol, respectivamente. La baja tasa de resistencia al cloranfenicol podría deberse a que no se utiliza en producción animal. Debido al riesgo toxicológico para los consumidores (carcinogenicidad y mutagenicidad) provocado por el cloranfenicol y los nitrofuranos (incluida la furazolidona), a mediados de los 90 se prohibió en la UE el uso de cloranfenicol en animales productores de alimentos. Ambos antimicrobianos están incluidos en el Anexo IV de la Directiva del Consejo 2377/90, que establece una tolerancia cero hacia estos fármacos en todos los productos alimentarios de origen animal. Habría que destacar, sin embargo, que a pesar del hecho de que estos antimicrobianos no se hayan utilizado en las granjas avícolas españolas durante años, los mecanismos de resistencia cruzada o de co-resistencia (Capita y Alonso-Calleja, 2013) podrían ser la causa de la resistencia observada a ambos compuestos tanto en el presente trabajo como en otras investigaciones (Duijkeren *et al.*, 2003; Yildirim *et al.*, 2011). Se ha indicado desde hace años que el uso de antibióticos modifica los genes de resistencia a antibióticos presentes en una comunidad microbiana (resistoma), y que los efectos en el resistoma microbiano perduran durante décadas después del cese en el uso de antibióticos (Sommer y Dantas, 2011). Por lo tanto, es esperable que los genes que confieren resistencia al cloranfenicol y a los nitrofuranos

perduren en la microbiota del ganado después de la prohibición del uso de ambos compuestos (Johnsen *et al.*, 2011).

El hecho de que la resistencia a la cefalotina haya aumentado de forma significativa a lo largo del período estudiado, del 0% de las cepas en 1993 al 26,3% en 2006, supone un motivo de preocupación, dado el uso clínico de estos compuestos, como se ha indicado con anterioridad. Se han identificado también en estudios previos aislamientos con susceptibilidad reducida a las cefalosporinas (Lestari *et al.*, 2009).

El aumento de la resistencia a la tetraciclina y a la enrofloxacin observados en el presente estudio entre 1993 y 2006 no es sorprendente si tenemos en cuenta que estos compuestos han estado entre los antibióticos más ampliamente utilizados con finalidad terapéutica en granjas avícolas en España (Capita *et al.*, 2007). Las fluoroquinolonas fueron aprobadas en numerosos países europeos a partir de 1980. En las décadas que siguieron a la autorización de estos antibióticos, se produjo un incremento en la prevalencia de cepas de *Salmonella* resistentes a las quinolonas, hecho observado tanto en España (Sáenz *et al.*, 2001) como en el resto del mundo (Dias de Oliveira *et al.*, 2005; Ellerbroek *et al.*, 2010; Schroeter *et al.*, 2004; Shrestha *et al.*, 2010; Wilson, 2004) en aislamientos clínicos y de origen cárnico. Este hecho es extremadamente preocupante ya que, como se ha indicado antes, las fluoroquinolonas se han considerado durante mucho tiempo como fármaco de elección para el tratamiento de la salmonelosis humana en adultos.

Al igual que en el presente estudio, en otros trabajos realizados con productos avícolas se ha observado con frecuencia resistencia a estreptomycin, neomicina, eritromicina, tetraciclina, amoxicilina-ácido clavulánico y sulfamidas (Arslan y Eyi, 2010; Barton, 2000; Cardinale *et al.*, 2005; Carramiñana *et al.*, 2004; Dias de Oliveira *et al.*, 2005; Hur *et al.*, 2010; Parveen *et al.*, 2007; Shrestha *et al.*, 2010; Usera *et al.*, 2002; Yildirim *et al.*, 2011). Afortunadamente, no hemos encontrado cepas resistentes a la gentamicina o a la ciprofloxacina, lo que sugiere que éstos son tratamientos potencialmente efectivos para tratar las infecciones por *Salmonella*. De manera similar al presente trabajo, Yildirim *et al.* (2001) no encontraron tampoco resistencia a estos antimicrobianos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdellah, C., Fouzia, R. F., Abdelkader, C., Rachida, S. B. y Mouloud, Z. (2009). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from chicken carcasses and giblets in Meknès, Morocco. *African Journal of Microbiology Research* **3**, 215-219.
- Anaraki, S., Giraudon, I. y Cathcart, S. (2005). Large outbreak of *Salmonella* Enteritidis in northeast London. *Eurosurveillance* **10**, article 2. Accesible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2664>.
- Anónimo (1993). Council Directive 93/43/EEC of 14 June 1993 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of European Union* **L 175**, 1-11.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J. C., Peixe, L. y Pestana, N. (2003). Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 97-103.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S. y Boulianne, M. (2007). Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec. *Journal of Food Protection* **70**, 1820-1828.
- Arslan, S. y Eyi, A. (2010). Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *Journal of Food Protection* **73**, 1613-1617.
- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research* **13**, 279-299.
- Berrang, M. E., Bailey, J. C., Altekruse, S. F., Shaw, W. K., Patel, B. L., Mainersmann, R. J. y Fedorka-Cray, P. J. (2009). Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpick and postchill in 20 U.S. processing plants. *Journal of Food Protection* **72**, 1610-1615.
- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. y Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1366-1375.
- Cardinale, E., Perrier Grosclaude, J. D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E. F. y Salvat, G. (2005). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **56**, 13-16.
- Carramiñana, J. J., Rota, C., Agustín, I. y Herrera, A. (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* **104**, 133-139.

- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2011). Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food --- 10 States, 2008. Accesible en: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm?s_cid=mm5813a2_e.
- Cetinkaya, F., Cibik, R., Soyutemiz, G. E., Ozakin, C., Kayali, R. y Levent, B. (2008). *Shigella* and *Salmonella* contamination in various foodstuffs in Turkey. *Food Control* **19**, 1059-1063.
- Chung, Y.-H., Know, Y.-I., Kim, S.-Y., Kim, S.-H., Lee, B.-K. y Chang, Y.-H. (2004). Antimicrobial susceptibilities and epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis isolates in Korea by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection* **67**, 264-270.
- CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
- Cook, A., Reid-Smith, R., Irwin, R., McEwen, S. A., Valdivieso-García, A. y Ribble, C. (2009). Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canada. *Journal of Food Protection* **72**, 473-481.
- Dallal, M. M. S., Doyle, M. P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, S., Bakhtiari, R., Sharifiy, K., Taremi, M., Zali, M. R. y Sharifi-Yazdi, M. K. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control* **21**, 388-392.
- Dias de Oliveira, S., Siqueira Flores, F., Ruschel dos Santos, L. y Brandelli, A. (2005). Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 297-305.
- Dione, M. M., Leven, M., Garin, B., Marcotty, T. y Geerts, S. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broiler farms, chicken carcasses, and street-vended restaurants in Casamance, Senegal. *Journal of Food Protection* **72**, 2423-2427.
- Dogru, A. K., Ayaz, N. D. y Gencay, Y. E. (2010). Serotype identification and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from chicken carcasses. *Tropical Animal Health and Production* **42**, 893-897.
- Duijkeren, E. van, Wannet, W. J. B., Houwers, D. J. y Pelt, W. Van (2003). Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* **41**, 3574-3578.
- Echeita, A., Aladueña, A., González-Sanz, R., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, F., Arrollo, M. y Gutiérrez, R. (2005a). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (I). *Boletín Epidemiológico Semanal* **13**, 73-76.

- Echeita, A., Aladueña, A., González-Sanz, R., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, F., Arrollo, M. y Gutiérrez, R. (2005b). Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (II). *Boletín Epidemiológico Semanal* **13**, 85-88.
- EFSA (2010). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **8**, 1658-1918. Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1658.pdf>.
- EFSA (2011). The European Union Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* **9** (3), 2090-2477. Accesible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>.
- Ellerbroek, L., Narapati, D., Phu Tai, N., Poosaran, N., Pinthong, R., Sirimalaisuwan, A., Tshering, P., Fries, R., Zessin, K.-H., Baumann, M. y Schroeter, A. (2010). Antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from imported chicken carcasses in Bhutan and from pig carcasses in Vietnam. *Journal of Food Protection* **73**, 376-379.
- European Commission (2010). The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2009. EU Directorate General for Health and Consumers, Luxemburg. Accesible en: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2009_en.pdf.
- Foley, S. L., Lynne, A. M. y Nayak, R. (2008). *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science* **86**(E. Suppl.), E149-E162.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D., Patrick, M. E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermachaikit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F. J. y Wegener, H. C. (2006). Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000-2002. *Emerging Infectious Diseases* **12**, 381-388.
- Gillespie, I. A., O'Brien, S. J., Adak, G. K., Ward, L. R. y Smith, H. R. (2005). Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? *Epidemiology and Infection* **133**, 795-801.
- Hernández, T., Sierra, A., Rodríguez-Álvarez, C., Torres, A., Arevalo, M. P., Calvo, M. y Arias, A. (2005). *Salmonella enterica* serotypes isolated from imported frozen chicken meat in the Canary Islands. *Journal of Food Protection* **68**, 2702-2706.
- Hue, O., Le Bouquin, S., Lalande, F., Allain, V., Rouxel, S., Petetin, I., Quesne, S., Laisney, M.-J., Gloaguen, P.-Y., Picherot, M., Salvat, G., Bougeard, S. y Chemaly, M. (2011). Prevalence of *Salmonella* spp. on broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008. *Food Control* **22**, 1158-1164.
- Hur, J., Kim, J. H., Park, J. H., Lee, Y.-J. y Lee, J. H., 2010. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. *The Veterinary Journal* **189**, 306-311.

- Johnsen, P. J., Townsend, J.P., Bohn, T., Simonsen, G. S., Sundsfjord, A. y Nielsen, K. M. (2011). Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**, 608-610.
- Jones, Y. E., Chappell, S., McLaren, I. M., Davies, R. H. y Wray, C. (2002). Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals and their environment in England and Wales from 1988 to 1999. *Veterinary Record* **150**, 649-654.
- Lestari, S. I., Han, F. Wang, F. y Ge, B. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in conventional and organic chickens from Louisiana retail stores. *Journal of Food Protection* **72**, 1165-1172.
- Logue, C. M., Sherwood, J. S., Olah, P. A., Elijah, L. M. y Dockter, M. R. (2003). The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 16-24.
- Martínez, E. V., Varela, M. C., Cevallos, C., Hernández-Pezzi, G., Torres, A. y Ordóñez, P. (2008). Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal* **16**, 241-252.
- Miranda, J. M., Mondragón, A. C., Martínez, B., Guarddon, M. y Rodríguez, J. A. (2009). Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection* **72**, 966-971.
- Nastasi, A., Mammina, C. y Cannova, L. (2000). Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis*, southern Italy, 1990–1998. *Emerging Infectious Diseases* **6**, 401–403.
- Nierop, van W., Duse, A. G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J.S. y Bloomfield, S. F. (2005). Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology* **99**, 1-6.
- Pan, Z. M., Geng, S. Z., Ahou, Y. Q., Liu, Z. Y., Fang, Q., Liu, B. B. y Jiao, X. A. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* sp. isolated from domestic animals in eastern China. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **9**, 2290-2294.
- Parveen, S., Taabodi, M., Schwarz, J. G., Oscar, T. P., Harter-Dennis, J. y White, D. G. (2007). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection* **70**, 2466-2472.
- Rabsch, W., Hargis, B. M., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Hinz, K.-H., Tschäpe, H., Bäuml, A. J., 2000. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella* Gallinarum in poultry. *Emerging Infectious Diseases* **6**, 443-448.

- Rodrigo, S., Adesiyun, A., Asgarali, Z. y Swanston, W. (2006). Occurrence of selected foodborne pathogens on poultry and poultry giblets from small retail processing operations in Trinidad. *Journal of Food Protection* **68**, 1096-1105.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* **18**, 353-358.
- Sarwari, A. R., Magder, L. S., Levine, P., McNamara, A. M., Knower, S., Armstrong, G. L., Etzel, R., Hollingsworth, J. y Morris, J. G. (2001). Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *Journal of Infectious Diseases* **183**, 1295-1299.
- Schroeter, A., Hoog, B. y Helmuth, R. (2004). Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. *Journal of Veterinary Medicine* **51**, 389-392.
- Shrestha, A., Regmi, P., Dutta, R. K., Khanal, D. R., Aryal, S. R., Thakur, R. P., Karki, D. y Singh, U. M. (2010). First report on antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry in Nepal. *Veterinary Microbiology* **144**, 522-524.
- Sommer, M. O. A. y Dantas, G. (2011). Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* **14** (5), 556-563.
- Su, L. H., Chiu, C. H., Chu, C. y Ou, J. T. (2004). Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clinical Infectious Diseases* **39**, 546-551.
- Suresh, T., Hatha, A. A. M., Harsha, H. T. y Lakshmanaperumalsamy, P. (2011). Prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore city of southern India. *Food Research Internacional* **44**, 823-825.
- Usera, M. A., Aladueña, A. González, R., De la Fuente, M., García-Peña, J., Frías, N. y Echeita, M. A. (2002). Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection* **65**, 768-773.
- Valdezate, S., Arroyo, M., González-Sanz, R., Ramiro, R., Herrera-León, S., Usera, M. A., De la Fuente, M. y Echeita, A. (2007). Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food human consumption in Spain. *Journal of Food Protection* **70**, 2741-2748.
- Velasco, L., Sobrino, L., García, M., Soler P. y Martínez, L. (2009). Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008. *Boletín Epidemiológico Semanal* **17**, 193-204.
- Waldroup, A. L. (1996). Contamination of raw poultry with pathogens. *Worlds Poultry Science Journal* **52**, 7-25, 84, 87, 90, 93.

- Wilson, I. G. (2004). Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. *Journal of Food Protection* **67**, 1220-1225.
- Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Xi, M., Sheng, M., Zhi, S. y Meng, J. (2010). Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food Microbiology* **141**, 63-72.
- Yang, S. J., Park, K. Y., Kim, S. H., No, K. M., Besser, T. E., Yoo, H. S., Lee, B. K. y Park, Y. H. (2002). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology* **86**, 295-301.
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Pamuk, S. y Ertas, N. (2011). Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Research International* **44**, 725-728.
- Zhao, S., Fedorka-Cray, P. J., Friedman, S., McDermott, P. F., Walker, R. D., Qaiyumi, S., Foley, S. L., Hubert, S. K., Ayers, S., English, L., Dargatz, D. A., Salamone, B. y White, D. G. (2005). Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the national antimicrobial resistance monitoring system. *Foodborne Pathogens and Disease* **2**, 169-181.

CAPÍTULO II

LOS TRATAMIENTOS DE DESCONTAMINACIÓN PUEDEN INCREMENTAR LA
PREVALENCIA DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN POBLACIONES
NATURALES DE *Escherichia coli* EN CARNE DE AVE

RESUMEN

El principal objetivo de este trabajo ha sido determinar la potencialidad de varios tratamientos químicos de descontaminación para incrementar la prevalencia de resistencia a antibióticos en poblaciones de *Escherichia coli* presentes en carne de ave. Se trataron muslos de pollo por inmersión durante 15 minutos en soluciones acuosas (p/v) de fosfato trisódico (FTS; 12%), clorito sódico acidificado (CSA; 1,200 ppm), ácido ascórbico (AA; 2%), ácido cítrico (AC; 2%) o agua (control). Las muestras se analizaron inmediatamente después del tratamiento (día 0) y al cabo de cinco días de almacenamiento a $7\pm 1^\circ$ C. Un total de 250 cepas de *E. coli* (50 de cada grupo de muestras; 25 aisladas el día 0 y 25 el día 5 de almacenamiento) se examinaron frente a un panel de 12 antibióticos de importancia clínica mediante la técnica estándar de difusión por disco. Se observó una elevada prevalencia de resistencia a antibióticos en el caso de las cepas de *E. coli* procedentes de las muestras control, con tres (6,0%) aislamientos susceptibles, tres (6,0%) resistentes a un antibiótico y 44 (88,0%) multi-resistentes (resistentes a dos o más antibióticos). Cuando los datos obtenidos en ambos días de muestreo (días 0 y 5) se consideran de forma conjunta, los aislamientos de las muestras control mostraron una menor prevalencia de resistencia que los de las muestras tratadas en el caso de ampicilina-sulbactam ($P<0,01$, muestras tratadas con FTS), amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,001$, CSA, AA y AC), cefotaxime ($P<0,05$, FTS), trimetoprim-sulfametoxazol ($P<0,05$, AA; $P<0,01$, AC), tetraciclina ($P<0,01$, AC), ciprofloxacina ($P<0,001$, CSA; $P<0,05$, AA; $P<0,01$, AC) y nitrofurantoína ($P<0,01$, FTS). Estos resultados sugieren que los descontaminantes químicos examinados podrían favorecer la emergencia, selección y/o proliferación de cepas resistentes a antibióticos en las poblaciones microbianas de la carne de pollo.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La carne de mamíferos y aves es un vehículo frecuente de microorganismos patógenos para el hombre. En 2010, se produjeron en la Unión Europea un total de 5.262 brotes de enfermedad transmitida por alimentos (43.473 casos), estando la carne implicada en un 20,2% de ellos (EFSA, 2012). Con el objetivo de reducir este riesgo, pueden aplicarse tratamientos descontaminantes, por ejemplo fosfato trisódico (FTS), clorito sódico acidificado (CSA) o ácidos orgánicos, a la carne durante su obtención en el matadero. La efectividad de estos tratamientos para reducir los niveles de microorganismos patógenos y alterantes en la carne está bien documentada (Buncic y Sofos, 2012; Del Río *et al.*, 2007a).

Los tratamientos descontaminantes están autorizados desde hace años en los países de América del Norte. Sin embargo, dentro de la Unión Europea (UE) no se permite el uso de antimicrobianos para el tratamiento de las canales de mamíferos o aves, ni de sus partes o vísceras (Buncic y Sofos, 2012). Recientemente, las Autoridades Sanitarias de la Unión Europea y la comunidad científica han comenzado a cuestionarse la inocuidad de estos tratamientos de la carne, teniendo en cuenta la posible selección de microorganismos con susceptibilidad reducida a antimicrobianos cuando están presentes concentraciones subóptimas de los compuestos (EFSA, 2008; SCHER/SCENIHR, 2008). Así se ha sugerido que los procesos de descontaminación favorecen el crecimiento de las bacterias tolerantes (con tolerancia intrínseca o adquirida) en la superficie de las canales al producirse la eliminación de la flora competitiva sensible. Es posible que, por presión selectiva, las bacterias tolerantes puedan sobrevivir y multiplicarse, originando una población de bacterias tolerantes (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Como se ha comentado a lo largo de la Introducción de esta Memoria, existe una relación entre tolerancia a biocidas y resistencia a antibióticos. Los mecanismos que contribuyen a la tolerancia a biocidas son inespecíficos y están a menudo relacionados con modificaciones en la permeabilidad de las cubiertas celulares y con cambios en la actividad de bombas de expulsión activa, mecanismos también relacionados con la resistencia a antibióticos (Sheridan *et al.*, 2012), por lo que las bacterias capaces de sobrevivir en presencia de biocidas tendrán probablemente incrementada su resistencia a antibióticos (Karatzas *et al.*, 2008). La contribución de algunos biocidas, diferentes a los

descontaminantes, en el incremento de la prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos ha sido científicamente demostrada (SCENIHR, 2009). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la posible contribución de los descontaminantes a dicha resistencia. Teniendo en cuenta el incremento de la preocupación por la resistencia a antibióticos en el ámbito de la Salud Pública (Capita y Alonso-Calleja, 2013), diferentes instituciones de la Unión Europea han establecido recomendaciones para que no se autoricen los procedimientos de descontaminación de la carne hasta que se haya demostrado que dichas técnicas son seguras, teniendo en cuenta la microbiota patógena presente (EFSA, 2008; FVE, 2005).

En dos estudios recientes (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a, 2009b) se puso de manifiesto que la exposición de *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* a concentraciones sub-inhedoras crecientes de descontaminantes provocó una susceptibilidad reducida tanto a descontaminantes como a antibióticos. Por otro lado, cuando se usaron cepas de *Salmonella enterica* procedentes de carne de ave, se observó una relación entre el número de antibióticos al que las cepas fueron resistentes y su tolerancia a los descontaminantes (tolerancia estudiada en base a los valores D, tiempo necesario para conseguir una reducción logarítmica en la concentración de bacterias) (Capita, 2007). En estos estudios previos se demostró la asociación entre la tolerancia a los descontaminantes y la resistencia a antibióticos. Sin embargo, en la investigación señalada las cepas se hicieron crecer exclusivamente en caldo de cultivo. Hasta donde llega nuestro conocimiento no se han realizado hasta el momento estudios similares en modelos reales, como puede ser la carne.

Escherichia coli es una de las bacterias más comunes del tracto gastrointestinal de los animales y seres humanos. Si bien la mayoría de las cepas son apatógenas y su interés radica en que son microorganismos marcadores de contaminación fecal de los alimentos, entre el 10% y el 15% de las cepas de *E. coli* son patógenas (Barnes y Gross, 1997). Además, *E. coli*, junto con *Enterococcus* spp., son considerados indicadores de resistencia a antibióticos (SCENIHR, 2009). El principal objetivo de este estudio ha sido investigar si una exposición única de la carne de ave a concentraciones habituales de descontaminantes puede incrementar la prevalencia de resistencia a antibióticos de importancia clínica en poblaciones naturales de *E. coli*. La efectividad antimicrobiana de los descontaminantes y

los patrones de resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* aisladas de la carne de ave han sido también determinados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Un total de 50 muslos de pollo fueron recogidos inmediatamente tras la evisceración en un matadero local. Los muslos se introdujeron individualmente en bolsas de plástico estériles. El transporte al laboratorio se realizó en una nevera portátil. Las muestras se almacenaron a $3\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante un máximo de 5 horas antes del comienzo del análisis.

Tratamientos antimicrobianos

Los muslos de pollo se dividieron de forma aleatoria en cinco grupos, cada uno de ellos conteniendo 10 muslos. Las muestras de cuatro grupos se sumergieron durante 15 minutos en 500 mL de soluciones estériles (p/v) de fosfato trisódico (Merck, Darmstadt, Alemania) (FTS); 1.200 ppm de clorito sódico (Fluka, Madrid, España) acidificado a pH 2,7 por adición de ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) (CSA); 2% de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid, España) (AA); y 2% de ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) (AC). Los valores de pH de las soluciones medidos en el momento de la aplicación fueron: $13,06\pm 0,08$ (FTS), $2,70\pm 0,01$ (CSA), $2,17\pm 0,02$ (AA) y $2,19\pm 0,02$ (AC). Las muestras del grupo restante se sumergieron en 500 mL de agua estéril (control). La temperatura de las soluciones fue $20\pm 1^{\circ}\text{C}$. Tras el tratamiento, los muslos de pollo se mantuvieron sobre un papel de filtro durante minutos a temperatura ambiente ($20\pm 1^{\circ}\text{C}$) para permitir el escurrido. Posteriormente las muestras se colocaron de forma individual en contenedores de plástico estéril y se almacenaron a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Análisis microbiológico

Los análisis microbiológicos se realizaron al cabo de 0 y 5 días de almacenamiento. El día 0 los muslos se examinaron inmediatamente después del escurrido. Las muestras, que consistían en 5 g de piel tomados con un bisturí estéril, fueron colocadas en una bolsa de stomacher con 45 mL de agua de peptona tamponada estéril (Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) y homogeneizadas (Masticator IUL, Barcelona, España) durante dos minutos. A partir del homogeneizado se realizaron diluciones decimales en agua de peptona (p/v) al 0,1% (Oxoid Ltd.). Los recuentos de microbiota aerobia viable se llevaron a cabo en la superficie de placas de agar para recuento en placa (*plate count agar*, PCA; Oxoid Ltd.) incubado durante 72 horas a $30\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para la enumeración de coliformes fecales, se sembraron en

profundidad alícuotas de 1 mL de las diluciones apropiadas de la muestra en medio agar cristal violeta, rojo neutro y sales biliares (*violet red bile agar*, VRBA; Oxoid Ltd.), añadiendo una sobrecapa del mismo medio de cultivo. Las placas se incubaron a $44 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas. Se procedió al recuento de las placas con entre 25 y 250 colonias (técnica de siembra en superficie) o entre 30 y 300 colonias (técnica de siembra en profundidad).

Aislamiento e identificación de las cepas de *E. coli*

Una vez realizados los recuentos microbianos, se seleccionaron entre tres y seis colonias de VRBA a partir de cada muestra. Estas colonias fueron sembradas en agar triptona de soja (*tryptone soy agar*, TSA; Oxoid Ltd.) e incubadas a $44 \pm 1^\circ \text{C}$ durante 24 horas con el objetivo de obtener cultivos puros. Se realizó la tinción de Gram y se determinaron las actividades oxidasa y catalasa. Las cepas consideradas presuntas *E. coli* en base a los resultados de las pruebas anteriores se inocularon en los microtubos de las galerías API 20E (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las bacterias fueron identificadas usando la base de datos API LAB Plus version 3.2.2. (bioMérieux). Las cepas de *E. coli* se mantuvieron en congelación a -20°C tras su resuspensión en caldo triptona de soja (*tryptone soy broth*, TSB; Oxoid Ltd.) con 20% (v/v) de glicerol.

Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Se determinó la susceptibilidad a antibióticos en un total de 250 cepas (25 tomadas el día 0 y 25 el día 5 a partir de cada grupo de muestras). La antibiotipia se realizó con un panel de 12 antibióticos en agar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.) utilizando la técnica de difusión por disco descrita por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). Se emplearon los siguientes discos de antibióticos (Oxoid Ltd.): gentamicina (GEN; 10 μg), ampicilina-sulbactam (AMS; 20 μg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30 μg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 μg), cefotaxime (CTX; 30 μg), trimetoprim-sulfametoxazol (SXT; 25 μg), cloranfenicol (C; 30 μg), tetraciclina (TE, 30 μg), ácido nalidíxico (NA; 30 μg), ciprofloxacina (CIP; 5 μg), fosfomicina (FOS; 200 μg) y nitrofurantoína (F; 300 μg). Las zonas de inhibición se midieron y las cepas se clasificaron como susceptibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes de acuerdo con los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). *Escherichia coli* ATCC 25922 y

Staphylococcus aureus ATCC 29213 se usaron como cepas de referencia para el control de los discos de antibióticos. A la hora de hacer los cálculos, los aislamientos de susceptibilidad intermedia se contaron junto con los resistentes en sentido estricto. Una cepa se consideró multi-resistente cuando mostró resistencia o resistencia intermedia a dos o más antimicrobianos (Álvarez-Fernández *et al.*, 2012).

Análisis estadístico

Se analizaron, en días separados, 10 muslos de pollo para cada grupo microbiano, tratamiento y día de muestreo. Los recuentos microbianos (ufc/g de piel) se transformaron en unidades logarítmicas (\log_{10}), calculándose las medias y desviaciones estándar. Los valores medios se compararon usando la prueba de rango múltiple de Duncan. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) para los tres factores: grupo microbiano (G), tipo de tratamiento (T) y día de muestreo (D) así como sus interacciones. Además, se realizó un ANOVA para ambos grupos microbianos por separado con el objeto de comprobar si los recuentos medios eran iguales para los distintos tratamientos y días de almacenamiento. Se examinaron también las interacciones (T x D). La prevalencia de cepas resistentes se comparó mediante las pruebas de Fisher y Chi-cuadrado. Para comparar el número medio de antibióticos al cual los aislamientos eran resistentes se emplearon las pruebas de Mann-Whitney U (comparación entre tratamientos dentro del mismo día de muestreo) y de Wilcoxon (comparación entre los días 0 y 5 para el mismo tratamiento). Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Todas las pruebas se llevaron a cabo usando el paquete estadístico Statistica® 6.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

RESULTADOS

Recuentos microbianos

El análisis de varianza (ANOVA) de los tres factores (G, T y D) puso de manifiesto la influencia ($P<0,001$) de todos los factores y de sus interacciones. El compuesto químico y el día de muestreo influyeron significativamente ($P<0,001$) en los niveles de microbiota aerobia viable y de coliformes fecales. Las interacciones T x D fueron también significativas ($P<0,001$) para ambos grupos microbianos.

Los recuentos microbianos (\log_{10} ufc/g) iniciales en las muestras control fueron $5,66\pm 0,92$ (microbiota aerobia viable) y $3,08\pm 0,64$ (coliformes fecales), como muestran las Tablas II.1 y II.2. Estos valores son superiores ($P<0,001$) a los obtenidos en las muestras tratadas (valores medios de $4,86\pm 0,53$ y $1,92\pm 0,68$ en el caso de microbiota aerobia viable y coliformes fecales, respectivamente). Todos los compuestos químicos redujeron significativamente ($P<0,05$) los niveles bacterianos iniciales en comparación con las muestras control. Los muslos tratados con ácido ascórbico presentaron los niveles más bajos de coliformes fecales. Los recuentos aumentaron a lo largo del almacenamiento en todos los grupos de muestras. Las muestras control presentaron mayores ($P<0,001$) niveles de contaminación que las muestras tratadas al final del almacenamiento, tanto por lo que respecta a los recuentos en PCA ($8,27\pm 0,80 \log_{10}$ ufc/g *versus* $7,62\pm 0,77 \log_{10}$ ufc/g) como a los coliformes fecales ($4,38\pm 0,78 \log_{10}$ ufc/g *versus* $3,73\pm 0,70 \log_{10}$ ufc/g). El día 5 de almacenamiento, el FTS y el AC (en el caso de la microbiota aerobia viable), y el FTS y el clorito sódico acidificado (para los coliformes fecales) fueron los compuestos más efectivos para reducir los recuentos microbianos.

Tabla II.1. Recuentos de microbiota aerobia viable (\log_{10} ufc/g de piel) en muslos de pollo sumergidos en agua o en soluciones acuosas de descontaminantes antes y después del almacenamiento durante 5 días a $7\pm 1^\circ$ C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)	
	0	5
Control (agua)	5,66 \pm 0,92Aa	8,27 \pm 0,80Ba
Fosfato trisódico (12%)	4,90 \pm 0,24Ab	7,35 \pm 0,87Bb
Clorito sódico acidificado (1.200 ppm)	4,71 \pm 0,48Ab	8,05 \pm 0,51Bac
Ácido ascórbico (2%)	4,75 \pm 0,64Ab	7,72 \pm 0,63Bbc
Ácido cítrico (2%)	5,15 \pm 0,70Ab	7,31 \pm 0,80Bb

Cada valor es la media \pm desviación estándar de 10 determinaciones.

Los valores en la misma fila que no comparten ninguna letra mayúscula son significativamente diferentes ($P<0,05$). Los valores en la misma columna que no comparten ninguna letra minúscula son significativamente diferentes ($P<0,05$).

Tabla II.2. Recuentos de coliformes fecales (\log_{10} ufc/g de piel) en muslos de pollo sumergidos en agua o en soluciones acuosas de descontaminantes antes y después del almacenamiento durante 5 días a $7\pm 1^\circ$ C.

Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)	
	0	5
Control (agua)	3,08 \pm 0,64Aa	4,38 \pm 0,78Ba
Fosfato trisódico (12%)	2,07 \pm 0,69Abc	3,13 \pm 0,56Bb
Clorito sódico acidificado (1.200 ppm)	1,77 \pm 0,64Abd	3,41 \pm 0,44Bb
Ácido ascórbico (2%)	1,39 \pm 0,64Ad	4,32 \pm 0,35Ba
Ácido cítrico (2%)	2,22 \pm ,56Ac	4,36 \pm 0,40Ba

Para interpretación, ver Tabla II.1.

Resistencia a antimicrobianos

Se examinaron un total de 250 cepas de *E. coli* (50 de cada grupo de muestras) para determinar su resistencia frente a 12 antimicrobianos usando el método convencional de difusión por disco. Las cepas de *E. coli* mostraron resistencia a un número de antibióticos que osciló entre 0 y 10 (Tabla II.3). En las muestras control, se encontraron un total de tres (6,0%), tres (6,0%) y 44 (88,0%) cepas sensibles, resistentes a un antibiótico y multi-resistentes (resistentes a dos o más antibióticos), respectivamente. Si las cepas de todos los grupos de muestras son consideradas de forma conjunta, un total de 23 (9,2%) y 219 (87,6%) cepas mostraron resistencia a un antibiótico y multi-resistencia, respectivamente, mientras que 8 (3,2%) aislamientos fueron sensibles. El número medio de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes el día 0 fue similar ($P>0,05$) en las muestras control ($3,76\pm 2,01$) y en las muestras tratadas ($4,23\pm 1,94$). Sin embargo, al final del almacenamiento (día 5), el número de antibióticos al que las cepas fueron resistentes fue mayor ($P<0,001$) en las muestras tratadas ($4,68\pm 2,16$) que en las control ($3,44\pm 1,42$). En las muestras tratadas, las cepas fueron resistentes a un mayor número de antibióticos ($P<0,001$) el día 5 que el día 0.

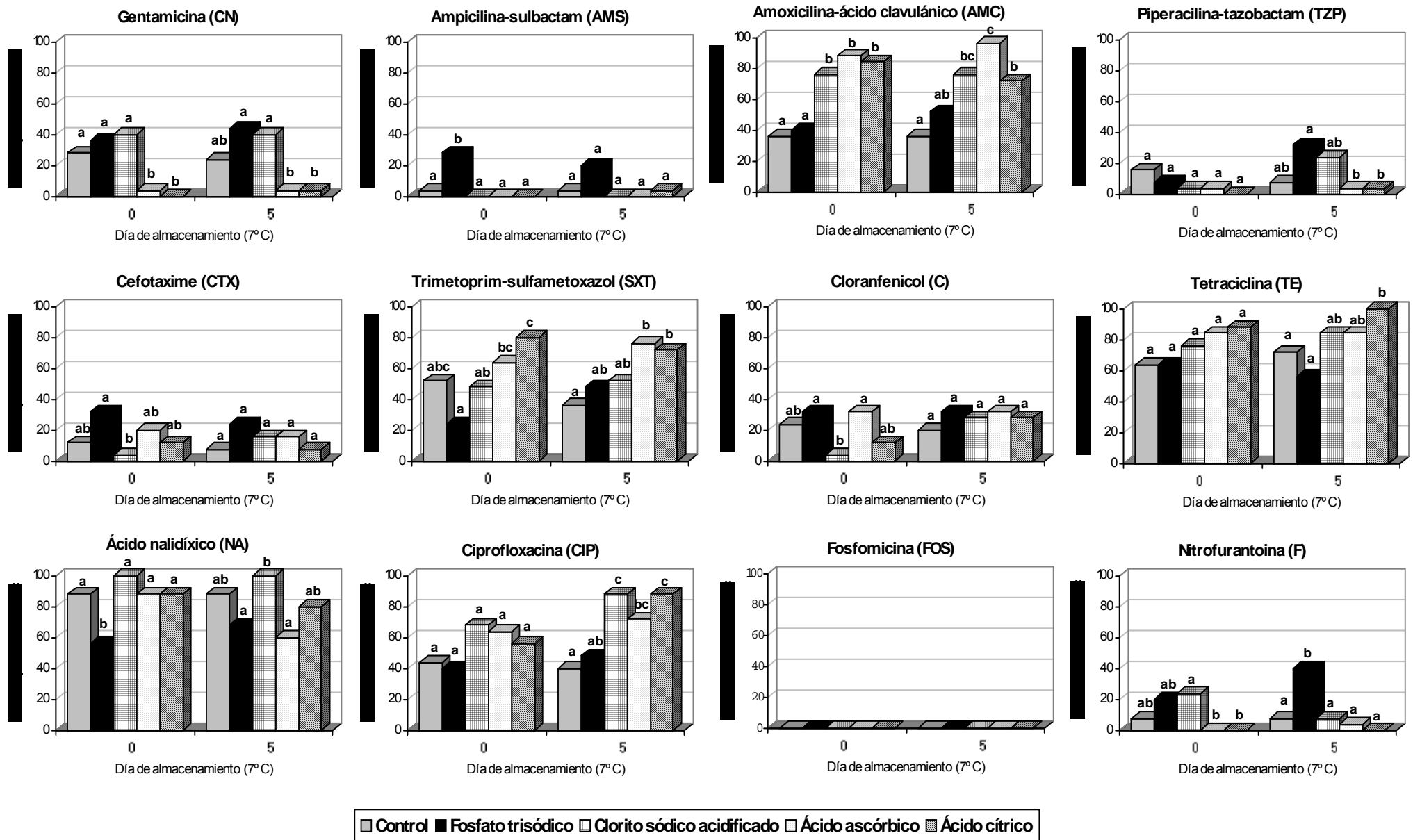
La Figura II.1. muestra los porcentajes de cepas de *E. coli* resistentes a cada uno de los antibióticos. Los aislamientos presentaron una elevada prevalencia de resistencia a AMC, SXT, TE, NA y CIP. Considerando simultáneamente todos los descontaminantes, se observó una mayor prevalencia de resistencia a antibióticos en las muestras tratadas que en las control por lo que respecta a amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,01$) el día 0, y para amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,001$), trimetoprim-sulfametoxazol ($P<0,05$) y ciprofloxacina ($P<0,01$) el día 5 de almacenamiento. Cuando los descontaminantes se consideran por separado, se observaron mayores prevalencias de resistencia ($P<0,05$) el día 0 en las muestras tratadas que en las muestras control para ampicilina-sulbactam ($P<0,05$, FTS) y amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,01$, CSA y AC, y $P<0,001$, AA). El día 5 se obtuvieron prevalencias de resistencia superiores en los muslos tratados en el caso de amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,01$, ASC; $P<0,001$, AA y $P<0,05$, CA), trimetoprim-sulfametoxazol ($P<0,01$, AA y $P<0,05$, CA), tetraciclina ($P<0,05$, CA), ciprofloxacina ($P<0,001$, ASC y CA, y $P<0,05$, AA) y nitrofurantoina ($P<0,05$, FTS). En el caso de la gentamicina se observó una mayor ($P<0,05$) prevalencia de resistencia en las muestras control que en las tratadas el día 0 de almacenamiento (AA y CA).

Tabla II.3. Número (porcentaje) de cepas de *Escherichia coli* susceptibles, resistentes y multi-resistentes aisladas a partir de grupos de muslos de pollo control o tratados con soluciones acuosas de descontaminantes^a y no almacenadas o almacenadas durante 5 días a 7±1° C.

Tiempo de almacenamiento (días)	Tratamiento	Número de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes:											Número medio por cepa		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
0	Control	2 (8)	2 (8)	2 (8)	5 (20)	5 (20)	2 (8)	6 (24)	1 (4)						3,76±2,01 ^a _a
	FTS		9 (36)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	6 (24)	4 (16)	1 (4)	2 (8)					3,80±2,48 ^a _a
	CSA				6 (24)	10 (40)	4 (16)	2 (8)	3 (12)						4,44±1,29 ^a _a
	AA		2 (8)	1 (4)	2 (8)	4 (16)	10 (40)	6 (24)							4,48±1,48 ^a _a
	AC	4 (16)	1 (4)		1 (4)	5 (20)	6 (24)	5 (20)	3 (12)						4,20±2,29 ^a _a
5	Control	1 (4)	1 (4)	3 (12)	8 (32)	7 (28)	3 (12)	2 (8)							3,44±1,42 ^a _a
	FTS		5 (20)	3 (12)		4 (16)		6 (24)	5 (20)	1 (4)			1 (4)		4,64±2,64 ^b _b
	CSA				3 (12)	7 (28)	7 (28)	3 (12)	3 (12)		2 (8)				5,16±1,65 ^b _b
	AA	1 (4)	3 (12)	2 (8)	3 (12)	5 (20)	3 (12)	4 (16)	2 (8)		1 (4)	1 (4)			4,32±2,50 ^{ab} _a
	AC			6 (24)		3 (12)	9 (36)	5 (20)		2 (8)					4,60±1,78 ^b _b

^a Los descontaminantes son FTS (12% de fosfato trisódico); CSA (1.200 ppm de clorito sódico acidificado); AA, 2% de ácido ascórbico; y AC (2% de ácido cítrico).

Se examinaron un total de 250 cepas (25 en cada grupo de muestras). Los números medios de resistencias por cepa dentro del mismo día de muestreo (diferentes tratamientos) que no comparten ninguna letra (superíndice), son significativamente diferentes ($P<0,05$). El número medio de resistencias por cepa dentro del mismo tratamiento (día 0 versus día 5) que no comparten ninguna letra (subíndice), son significativamente diferentes ($P<0,05$).



Se examinaron un total de 250 aislamientos de *E. coli* (25 el día 0 y 25 el día 5 a partir de cada grupo de muestras). Los valores que, para un mismo día y antibiótico, no comparten ninguna letra son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

Figura II.1. Porcentajes de aislamientos de *E. coli* resistentes a antibióticos procedentes de muslos de pollo sumergidos en agua (control) o en soluciones de descontaminantes químicos y almacenados durante 5 días a $7 \pm 1^\circ \text{C}$.

Puesto que la carne de pollo puede consumirse al cabo de diferentes días de almacenamiento, los resultados obtenidos en ambos días de muestreo se combinaron para obtener valores medios. Cuando todos los descontaminantes son considerados de forma conjunta, se observó una mayor prevalencia de resistencia a antibióticos en las muestras descontaminadas que en las control en el caso de amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,001$), trimetoprim-sulfametoxazol ($P<0,05$) y ciprofloxacina ($P<0,01$). Si cada descontaminante es considerado por separado, los aislamientos procedentes de los muslos control mostraron una menor prevalencia de resistencia que los tratados por lo que respecta a ampicilina-sulbactam ($P<0,01$, muestras tratadas con FTS), amoxicilina-ácido clavulánico ($P<0,001$, ASC, AA y AC), cefotaxime ($P<0,05$, FTS), trimetoprim-sulfametoxazol ($P<0,05$, AA; $P<0,01$, AC), tetraciclina ($P<0,01$, AC), ciprofloxacina ($P<0,001$, CSA; $P<0,05$, AA; $P<0,01$, AC) y nitrofurantoina ($P<0,01$; FTS). Así, el número de antibióticos al que a los que cada uno de los descontaminantes provocó un incremento en la prevalencia de resistencia, respecto a las muestras control, durante el almacenamiento osciló entre dos (CSA) y cuatro (AC). Una mayor prevalencia de resistencia se encontró en las muestras control que en las tratadas en el caso de gentamicina ($P<0,01$, AA, y $P<0,001$, AC) y del ácido nalidíxico ($P<0,01$, FTS).

En la mayoría de los casos, el incremento en la prevalencia de resistencia en los aislamientos de las muestras tratadas con respecto a los de las muestras control fue consecuencia de diferencias marcadas en los halos de inhibición, siendo las cepas puntuadas como “susceptibles” (muestras control) y de “susceptibilidad intermedia” o “resistentes” (muestras tratadas), en base a los criterios usados. En otros casos, el diámetro de las zonas de inhibición en las cepas de los muslos descontaminados disminuyó en relación con las procedentes de las muestras control, a pesar de lo cual las cepas se clasificaron dentro de la misma categoría (“susceptible” o “resistente”).

La prevalencia de resistencia en las cepas de *E. coli* de las muestras control fue similar ($P>0,05$) en los días 0 y 5 de almacenamiento para todos los antibióticos. Sin embargo, en las muestras tratadas (considerando conjuntamente todos los descontaminantes) se observó un incremento en la prevalencia de resistencia entre el día 0 y 5 para TZP ($P<0,001$), C ($P<0,001$) y CIP ($P<0,01$). Cuando cada descontaminante es considerado por separado, la prevalencia de resistencia a antibióticos aumentó del día 0 al día 5 en el caso de TZP ($P<0,05$, FTS y CSA), C ($P<0,01$, CSA) y CIP ($P<0,05$, CA).

DISCUSIÓN

Recuentos microbianos

El presente trabajo amplía hallazgos previos en relación con el efecto del fosfato trisódico, el clorito sódico acidificado y los ácidos orgánicos sobre la contaminación microbiana de la carne de ave, poniendo de manifiesto que todos los descontaminantes estudiados redujeron significativamente los niveles microbianos (en relación con las muestras control) tanto después del tratamiento (efecto bactericida) como durante el almacenamiento en refrigeración (acción bacteriostática). En trabajos publicados con anterioridad utilizando FTS, CSA y AC se han observado resultados similares (Del Río *et al.*, 2007b; Loretz *et al.*, 2010). Los hallazgos del presente trabajo tienen especial interés puesto que el ácido ascórbico no ha sido previamente estudiado como agente descontaminante de la carne de ave. Debe señalarse, no obstante, que aunque estadísticamente significativas, las relativamente pequeñas diferencias que hemos observado en la carga microbiana de las muestras control y tratadas, nos hacen dudar sobre su relevancia práctica.

Nuestros hallazgos en relación con el compuesto con mayor efectividad antimicrobiana son similares a los obtenidos con anterioridad (Del Río *et al.*, 2007a), identificándose al AC y al FTS como los compuestos más efectivos frente a las bacterias Gram-positivas, y el CSA el más efectivo frente a las Gram-negativas.

La influencia del grupo microbiano (G), el tipo de tratamiento (T), y el día de almacenamiento (D) en los recuentos bacterianos observada en el presente estudio es coincidente con los resultados de la mayoría de los autores consultados para carne de mamíferos y aves. Las interacciones D x T encontradas sugieren que las diferencias medias entre tratamientos fueron generalmente de diferentes magnitudes en los días 0 y 5 de almacenamiento.

Resistencia a antimicrobianos

La preocupación por la resistencia a antibióticos en bacterias procedentes de animales de abasto y alimentos de origen animal está aumentando en los últimos años tanto en el ámbito nacional como en el internacional. Si las bacterias responsables de infecciones alimentarias son resistentes a antibióticos de importancia clínica, se produce un problema añadido para las personas infectadas, puesto que la mayoría de las infecciones requieren

terapia antimicrobiana apropiada. Así, la morbilidad y mortalidad en infecciones provocadas por bacterias resistentes a antibióticos son considerablemente mayores que las provocadas por bacterias susceptibles. Además, las bacterias resistentes a antibióticos (incluso las bacterias no patógenas) pueden representar un reservorio de genes de resistencia que son transportados en elementos genéticos móviles, los cuales pueden ser transferidos a bacterias de importancia clínica a lo largo de la cadena alimentaria, incluyendo el tracto digestivo humano (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Las pruebas de resistencia a antibióticos en el presente estudio indicaron que la mayoría de los aislamientos de *E. coli* fueron resistentes a dos o más antimicrobianos. Estos resultados están en concordancia con los hallazgos de otros autores, que han puesto de manifiesto que la mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas de carne de mamíferos y aves son multi-resistentes (Jasson *et al.*, 2009; Soufi *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2008), hecho que sugiere el importante papel de estos aislamientos como reservorio de genes de resistencia a antibióticos.

La considerable prevalencia de resistencia a AMC, SXT, TE, NA y CIP encontrada en el presente trabajo es un hecho observado en la mayoría de los estudios de otros autores, en los que la resistencia a penicilinas, derivados de las tetraciclinas, quinolonas y sulfamidas fueron comunes en las bacterias procedentes de carne de ave (Jasson *et al.*, 2009; Sáenz *et al.*, 2001; Schroeder *et al.*, 2003; Soufi *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2008). La elevada frecuencia de resistencia a AMC, SXT, TE y fluoroquinolonas observada en el presente estudio puede ser debida al amplio uso de estos antibióticos en producción avícola en gran parte del mundo, incluida España. Así, la presión selectiva ejercida por el uso (especialmente el uso incorrecto) de antibióticos, en animales y seres humanos se considera la principal causa en la emergencia de resistencia bacteriana a estos antimicrobianos (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Las elevadas tasas de resistencia a CIP en las cepas de *E. coli* es un hecho destacable, puesto que las fluoroquinolonas son antibióticos de primera elección para tratar las infecciones importantes por *E. coli* en seres humanos (Van *et al.*, 2008).

Como se ha indicado con anterioridad, los alimentos contaminados con bacterias resistentes a antibióticos, tanto patógenas como apatógenas, suponen un desafío en el contexto de la Salud Pública. Así, se ha enfatizado la prevención de la emergencia o selección y de la diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y genes de resistencia

en la Industria Alimentaria (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Recientemente se ha abierto un debate sobre la relación entre los tratamientos descontaminantes de las canales de pollo y la diseminación de cepas resistentes a antibióticos. En este contexto, los comités científicos de la Unión Europea han recomendado realizar investigaciones sobre la potencialidad de estos tratamientos para favorecer la aparición de resistencia a antibióticos (EFSA, 2008).

La relación entre susceptibilidad reducida a compuestos descontaminantes de la carne de ave y a antibióticos ha sido demostrada con anterioridad en caldo de cultivo usando cepas individuales de *Salmonella enterica* (Capita, 2007). Además, en una investigación previa (Alonso-Hernando *et al.*, 2009a, 2009b), se puso de manifiesto que el cultivo de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* en presencia de concentraciones crecientes subinhibitorias de descontaminantes provocaba un descenso (pequeño pero significativo) en la susceptibilidad de las cepas tanto a los compuestos descontaminantes como a antibióticos. Sin embargo, no se han llevado a cabo estudios para investigar la influencia de la descontaminación en la frecuencia de resistencia a antibióticos en la microbiota natural de la carne de pollo. En la investigación que se presenta, los patrones de resistencia a antibióticos de las poblaciones de *E. coli* en carne de ave expuesta a descontaminantes ha sido comparada, por primera vez, con la de poblaciones procedentes de carne no expuesta, usando la técnica estándar de difusión por disco.

Hay muchas similitudes entre los mecanismos por los que una bacteria adquiere resistencia a antibióticos y a biocidas (Braoudaki y Hinton, 2004). Por lo tanto, parece razonable suponer que la aplicación de biocidas (incluyendo descontaminantes) a concentraciones sub-inhibitorias pueda seleccionar cepas no solo resistentes a biocidas sino también a antibióticos, contribuyendo así a la emergencia de multi-resistencia a antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013). En el contexto de la descontaminación de la carne de ave, estas concentraciones sub-inhibitorias podrían ocurrir como consecuencia de una inadecuada distribución o dosificación de los compuestos usados, o cantidad excesiva de materia orgánica, con capacidad para inactivar biocidas, en el tanque de inmersión. Por otro lado, pueden alcanzarse concentraciones insuficientes en las anfractuosidades de la piel. Así, se ha demostrado que las bacterias pueden ser retenidas en las arrugas y folículos pilosos de la piel de pollo (Capita *et al.*, 2002). Es difícil para los compuestos químicos alcanzar las bacterias unidas a, o atrapadas en, estos lugares. En esas condiciones, las

cepas bacterianas probablemente alcanzan concentraciones sub-óptimas de descontaminantes que podrían suponer una presión selectiva que favorecería la selección y proliferación de cepas resistentes de forma natural. Además, es posible que la tolerancia de los organismos a un agente se incremente mediante mecanismos de adaptación, que pueden implicar también un incremento de la resistencia a otros compuestos, en la forma de co-resistencia o resistencia cruzada (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Así, es esperable que las poblaciones de *E. coli* en carne de pollo almacenada en refrigeración son muy heterogéneas, conteniendo cepas con susceptibilidad reducida intrínseca o adquirida a un rango de antimicrobianos, incluyendo antibióticos. Este hecho puede explicar los resultados del presente estudio, en el que se observó un incremento en la prevalencia de resistencia a antibióticos (tanto el día 0 como, y especialmente, al cabo de varios días de almacenamiento en refrigeración) en las cepas obtenidas a partir de las muestras descontaminadas, en comparación con las procedentes de las muestras control.

El incremento en la prevalencia de resistencia a diferentes antibióticos (AMS y AMC el 0 de almacenamiento, GEN, AMS, AMC, SXT, TE, CIP y F el día 5, o AMS, AMC, CTX, SXT, TE, CIP y F cuando ambos días de muestreo son considerados de forma conjunta) observado en las poblaciones de *E. coli* tras los tratamientos descontaminantes es un hecho preocupante, puesto que estos antibióticos se encuentran entre los fármacos de elección para el tratamiento de las infecciones humanas (Alonso-Hernando *et al.*, 2012; Álvarez-Fernández *et al.*, 2012). Hay que señalar que los resultados del presente trabajo están en consonancia con hallazgos previos en caldo de cultivo (Alonso-Hernando *et al.*, 2009b), en los que se ha observado un incremento de la resistencia a varios antibióticos en el caso de cepas de *Listeria monocytogenes* y de *Salmonella enterica* tras la exposición a los descontaminantes químicos.

Como se ha señalado con anterioridad, en el presente estudio se observaron importantes diferencias entre las zonas de inhibición provocadas por las cepas de las muestras control y las aisladas de las muestras tratadas. Además, en algunos casos se encontraron pequeños descensos en el tamaño de los halos de inhibición, insuficientes para permitir la adscripción de las cepas a diferentes categorías. Según Braudaki y Hinton (2004), incluso las pequeñas disminuciones en las zonas de inhibición podrían ser significativas,

puesto que un modesto cambio en la susceptibilidad puede en última instancia conferir una ventaja de crecimiento a una cepa.

No se obtuvieron diferencias sustanciales entre descontaminantes por lo que respecta a su potencialidad para incrementar la prevalencia de resistencia a antibióticos en las poblaciones de *E. coli* presentes en la carne de ave. Estos resultados no son coincidentes con los resultados obtenidos con anterioridad en caldo de cultivo (Alonso-Hernando *et al.*, 2009b; Whitehead *et al.*, 2011), en los que se puso de manifiesto que la capacidad para incrementar la resistencia a antibióticos varía entre biocidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2009a). Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *The Journal of Microbiology* **47**, 142-146.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. y Alonso-Calleja, C. (2009b). Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* **20**, 1108-1111.
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2012). Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates from *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* **23**, 37-41.
- 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**, 281-287.
- Barnes, H. J. y Gross, W. B. (1997). Colibacillosis, 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.
- Braoudaki, M. y Hilton, A. C. (2004). Adaptative resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 73-78.
- Buncic, S. y Sofos, J. (2012). Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International* **45**, 641-665.
- Capita, R. (2007). Variation in *Salmonella* resistance to poultry chemical decontaminants, based on serotype, phage type, and antibiotic resistance patterns. *Journal of Food Protection* **70**, 1835-1843.
- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Rodríguez-Pérez, R., Moreno, B. y García-Fernández, M. C. (2002). Influence of poultry carcass skin sample site on the effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* **65**, 853-856.
- CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.

- Del Río, E., Muriente, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007a). Effectiveness of trisodium phosphate, acidified sodium chlorite, citric acid, and peroxyacids against pathogenic bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection* **70**, 2063-2071.
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2007b). Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* **115**, 268-280.
- EFSA (2008). Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *The EFSA Journal* **659**, 2-26.
- EFSA (2012). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* **10**, 2597-3038.
- FVE (2005). *Public Health. Implementing measures of the hygiene package May Newsletter*, pp. 4-6. Federation of Veterinarians of Europe, Brussels.
- Jasson, V., Sampers, I., Botteldoorn, N., López-Gálvez, F., Baert, L., Denayer, S., Rajkovic, A., Habib, I., De Zutter, L., Debevere, J. y Uyttendaele, M. (2009). Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology* **135**, 248-253.
- Karatzas, K. A. G., Randall, L. P., Webber, M., Piddock, L. J. V., Humphrey, T. J., Woodward, M. J. y Coldham, N. G. (2008). Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology* **74**, 1508-1516.
- Loretz, M., Stephan, R. y Zweifel, C. (2010). Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: a literature survey. *Food Control* **21**, 791-804.
- Sáenz, Y., Zaragoza, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* **18**, 353-358.
- SCENIHR (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf.
- 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. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_015.pdf.
- Schroeder, C. M., White, D. G., Ge, B., Zhang, Y., McDermott, P. F., Ayers, S., Zhao, S. y Meng, J. (2003). Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 197-202.

- Sheridan, À., Lenahan, M., Duffy, G., Fanning, S. y Burgess, C. (2012). The potential for biocide tolerance in *Escherichia coli* and its impact on the response to food processing stresses. *Food Control* **26**, 98-106.
- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbasi, M. S., Ruiz, E., Zaragaza, M., Hassen, A. B., Hammami, S. y Torres, C. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology* **144**, 497-502.
- Van, T. T. H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T. y Coloe, P. J. (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* **124**, 217-223.
- Whitehead, R. N., Overton, T. W., Kemp, C. L. y Webber, M. A. (2011). Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level of biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step. *PLoS ONE* **6** (7), e22833. doi: 10.1371/journal.pone.0022833.

CAPÍTULO III

**INFLUENCIA DEL SISTEMA DE ALOJAMIENTO EN LA CARGA MICROBIANA Y
EN LOS PATRONES DE RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS DE AISLAMIENTOS
DE *Escherichia coli* DE HUEVOS DE MESA**

RESUMEN

Se determinaron los niveles microbianos (microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos, enterobacterias, coliformes, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp. y el grupo de mohos y levaduras) en la cáscara de 240 huevos de mesa en el noroeste de España. Se analizaron huevos de seis procedencias diferentes (40 muestras de cada una): huevos de gallina de cinco sistemas de producción (de gallinas criadas en jaulas convencionales en batería, criadas en suelo, camperas, de producción ecológica y de pequeñas explotaciones domésticas o “gallinas caseras”) y huevos de codorniz. Se obtuvieron un total de 120 cepas de *Escherichia coli* (20 a partir de cada procedencia) que fueron examinadas para determinar su resistencia a un panel de 12 antimicrobianos de importancia clínica usando la técnica de difusión por disco. Los recuentos de microbiota aerobia viable oscilaron entre $1,96 \pm 1,00$ (gallinas camperas) y $3,69 \pm 0,72$ (caseras) log ufc/cm². Los recuentos de la mayoría de los grupos microbianos variaron significativamente en función de la procedencia de las muestras, mostrando los huevos de producción doméstica los mayores ($P < 0,05$) niveles de contaminación por lo que respecta a microbiota aerobia viable, microorganismos psicrotrofos, coliformes fecales, *Enterococcus* spp. y el grupo de mohos y levaduras, así como la mayor prevalencia de *E. coli*. Un total de 23 (21,67% del total) cepas de *E. coli* fueron pan-susceptibles y 78,33% mostraron resistencia a uno (22,50%) o más (58,33%) antimicrobianos. El sistema de producción influyó ($P < 0,05$) en el número medio de resistencias por cepa, con los mayores valores observados en huevos procedentes de cría en jaula convencional (2,85) y camperos (3,10), seguidos por cría en suelo (1,55) y codorniz (1,95). Los huevos de producción orgánica (1,00) y los de explotaciones domésticas (0,75) mostraron los menores números. La mayor prevalencia de resistencia se observó para los grupos de antimicrobianos más frecuentemente usados en las explotaciones avícolas. Estos resultados sugieren que hay una relación entre la prevalencia de resistencia a antibióticos en *E. coli* y el uso de estos compuestos en las explotaciones avícolas, como se deduce del hecho de que los huevos procedentes de sistemas convencionales de producción (jaulas, suelo, camperas) presentan mayores tasas de resistencia que los de explotaciones ecológicas o domésticas. Estos resultados enfatizan la necesidad de educar al consumidor en buenas prácticas higiénicas, para evitar la contaminación cruzada o el insuficiente cocinado de los huevos.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los huevos de mesa son alimentos muy nutritivos y suponen una fuente barata de proteínas de alta calidad, jugando un papel importante en la dieta humana (Adesiyun *et al.*, 2006). Gracias a sus propiedades multi-funcionales (por ej., capacidad emulsionante) los huevos son muy utilizados en la industria alimentaria, al mismo tiempo que son buenas fuentes potenciales de materia prima tanto para la industria farmacéutica como la cosmética (Matt *et al.*, 2009). En el año 2007 la producción mundial total de huevos de gallina alcanzó los 63 millones de toneladas (lo que equivale a un millón de millones de huevos). La Unión Europea (EU-27) fue el segundo productor, después de China, con más de 6,5 millones de toneladas, y una media de consumo de 235 huevos *per cápita*. En España, el consumo *per cápita* en 2008 fue de 211 huevos (Pascale, 2010). Aunque los huevos de codorniz se han identificado como una opción saludable para la dieta humana, su consumo es sólo esporádico (Sinanoglou *et al.*, 2011).

En diferentes investigaciones se han aislado microorganismos patógenos, en concreto *Salmonella*, a partir de la superficie y del interior de huevos de mesa, que han sido responsables de numerosas enfermedades de origen alimentario en todo el mundo. En la UE, el 23,1% de los brotes confirmados de toxi-infecciones alimentarias en 2008 fueron causados por huevos y ovoproductos, siendo con diferencia la fuente alimentaria más frecuentemente involucrada en estos procesos (EFSA, 2010). La presencia de bacterias patógenas en los huevos es una consecuencia de la contaminación vertical o el resultado de la penetración de la cáscara por parte de las bacterias depositadas en la superficie de los huevos después de la puesta. Las toxi-infecciones alimentarias surgen como consecuencia de episodios de contaminación cruzada o son el resultado de un cocinado inadecuado (Adesiyun *et al.*, 2007).

Escherichia coli es una de las especies de microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal de animales y seres humanos. Si bien la mayoría de los aislamientos son apatógenos y considerados meros indicadores de contaminación fecal de los alimentos, aproximadamente entre el 10% y el 15% de las cepas de *E. coli* corresponden a serotipos patógenos o patógenos oportunistas (Barnes y Gross, 1997). Por otro lado, *Escherichia coli*, junto con *Enterococcus* spp., son considerados indicadores de resistencia a antibióticos (SCENIHR, 2009).

La preocupación por la resistencia a antibióticos está aumentando en los últimos años tanto en el ámbito nacional como internacional (Capita y Alonso-Calleja, 2013). Así, la resistencia a antibióticos se ha definido como una pandemia global (EASAC, 2007) y como uno de los mayores desafíos de Salud Pública del siglo XXI (WHO, 2009). El amplio uso, especialmente cuando éste es inadecuado, de antibióticos en seres humanos y animales está a menudo involucrado en la emergencia, selección y diseminación de cepas multi-resistentes. Así, se ha sugerido que existe un vínculo entre el uso de antibióticos y la presencia de bacterias resistentes en infecciones humanas, y numerosos estudios realizados en los últimos años han puesto de manifiesto la presencia frecuente de bacterias resistentes en muestras de alimentos (Begun *et al.*, 2010). En la Unión Europea se monitoriza de forma rutinaria la resistencia a antibióticos en aislamientos de *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. procedentes de animales y alimentos (EFSA, 2010). Sin embargo, hay pocos estudios publicados en relación con la resistencia a antibióticos en bacterias, particularmente *Escherichia coli*, procedentes de cáscara de huevos (Musgrove *et al.*, 2006).

Existen diferentes sistemas de cría de gallinas para la producción de huevos, tal y como se define en la Directiva del Consejo 1999/74/EC (EU, 1999a), en el Reglamento (EEC) 2092/91 (EU, 1991), en el Reglamento 1804/1999/EC (EU, 1999b) y en el Reglamento 2295/2003/EC (EC, 2003). Estos sistemas varían en la forma en que las aves son criadas, alimentadas y manejadas. Brevemente, los animales pueden ser confinados en jaulas en batería, que son pequeños habitáculos de rejillas de alambre y suelos inclinados. La Directiva 1999/74/EC prohíbe, desde el uno de enero de 2012, la cría de gallinas de puesta en jaulas convencionales en batería, dadas sus limitaciones a la hora de permitir el mantenimiento de un alto grado de bienestar animal. En los sistemas de cría en suelo, las aves tienen la libertad para moverse dentro de la explotación, sin posibilidades de salir al exterior, circunstancia que se permite en el caso de las gallinas camperas. En la producción orgánica o ecológica, los animales, que tienen acceso a espacios exteriores, deben ser criados sobre un terrero de producción orgánica. Al contrario de lo que ocurre en los sistemas de cría tradicional, donde los agentes antimicrobianos son ampliamente usados para el tratamiento, control y prevención de enfermedades, en la producción orgánica el uso de antimicrobianos está muy restringido. Además, para ajustarse a las estrictas normas

relativas al uso de sustancias antimicrobianas, las aves de cría orgánica deben ser alimentadas exclusivamente con piensos y suplementos de producción ecológica. Los porcentajes de consumo de los distintos tipos de huevos en la UE oscilan en torno al 75% (jaula), 14% (suelo), 9% (producción campera), y 2% (producción orgánica) (Pascale, 2010). Además, es una práctica común en España la venta en mercados locales de huevos procedentes de pequeñas explotaciones domésticas. De esta manera, los consumidores disponen de un amplio rango de productos de precios muy diferentes pero sin información real sobre sus cualidades específicas.

Puesto que una elevada concentración de microorganismos en la superficie de los huevos incrementa el riesgo de penetración a través de la cáscara y de contaminación de la yema y de la clara, así como de contaminación cruzada, la carga microbiana de la cáscara de los huevos constituye un motivo de preocupación (Messens *et al.*, 2007). Hasta el momento, no está disponible ninguna información sobre la contaminación microbiológica de la superficie de huevos de mesa en el noroeste de España, y aparentemente no se han llevado a cabo investigaciones para conocer la prevalencia de resistencia a antibióticos de uso común en bacterias presentes en la superficie de los huevos. Este trabajo se ha realizado para determinar los niveles de contaminación microbiológica en la cáscara de huevos de gallina y codorniz adquiridos en establecimientos de venta al público en el noroeste de España, así como para obtener información en relación con la resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* aisladas de estos alimentos. La influencia de los sistemas de alojamiento (cría en jaulas convencionales, en suelo, cría campera, orgánica o doméstica) sobre los recuentos microbianos y la resistencia bacteriana a los antibióticos fue también determinada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Se adquirieron un total de 50 muestras de huevos de gallina de categoría A (talla L; EC, 2003) y 10 muestras de huevos de codorniz a lo largo de un año (de octubre de 2008 a septiembre de 2009) en diferentes supermercados de la provincia de León (noroeste de España). Las muestras se adquirieron cinco días antes de la fecha de caducidad. Cada muestra consistía en un envase de una docena de huevos del mismo lote. Los huevos de codorniz procedían de sistemas de cría en jaula convencional y los huevos de gallina de diferentes sistemas de producción: cría en jaulas convencionales en batería, en suelo, gallinas camperas, de producción orgánica y de producción “casera” (pequeñas explotaciones domésticas). Los huevos se adquirieron en base a los códigos impresos en las cáscaras y en los envases (0 para producción orgánica, 1 para gallinas camperas, 2 para cría en suelo y 3 para los sistemas de cría en jaulas). Los huevos “caseros” fueron adquiridos en mercados locales tradicionales en la misma semana en que los huevos fueron puestos. Se examinaron cinco marcas diferentes (dos muestras de cada marca) para cada uno de los seis tipos de huevos (huevos de codorniz y huevos de gallina de diferentes sistemas de alojamiento). Para cada una de las 60 muestras se examinaron cuatro huevos diferentes, de forma que se analizaron un total de 240 huevos. Una vez en el laboratorio, los huevos se mantuvieron a $4\pm 1^\circ$ C y se analizaron dentro de las 24 horas siguientes a su adquisición.

Recuentos microbianos

Las cáscaras de cada huevo se colocaron individualmente (tras la eliminación del contenido) en un mortero estéril de porcelana, donde se trituraron durante un minuto. Posteriormente, el contenido del mortero se introdujo en una bolsa de plástico estéril junto con 66 mL (huevos de gallina) o 22 mL (huevos de codorniz) de agua de peptona tamponada (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) y se homogeneizó (Masticator IUL, Barcelona, España) durante dos minutos. Experimentos previos pusieron de manifiesto que la superficie media de los huevos de gallina y codorniz era 66 cm^2 y 22 cm^2 , respectivamente. Los medios de cultivo (todos de Oxoid Ltd., Hampshire, Reino Unido) y los parámetros de incubación se muestran en la Tabla III.1. Las placas se sembraron por duplicado y se

incubaron en aerobiosis. La suciedad de la cáscara (presencia de heces, tierra, contenido del huevo –yema o clara-, plumas o sangre) se evaluó visualmente. Para detectar las fisuras en la cáscara los huevos se observaron con ayuda de una lámpara.

Tabla III.1. Medios de cultivo, tiempos y temperaturas usados para la realización de los análisis microbiológicos.

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Incubación	
		Temp. (°C)	Tiempo (h)
Microbiota aerobia viable ¹	<i>Plate count agar</i> (PCA)	30	72
Psicrotrofos ²	<i>Plate count agar</i> (PCA)	7	240
Enterobacteriáceas ²	<i>Violet red bile glucose agar</i> (VRBGA) ³	35	24
Coliformes fecales ²	<i>Violet red bile agar</i> (VRBA) ³	44	24
<i>Pseudomonas</i> spp. ¹	<i>Pseudomonas</i> agar con suplemento de cefaloridina, fucidina y ceftrimida (CFC)	25	24
<i>Enterococcus</i> spp. ²	<i>Kanamycin aesculin azide agar</i> (KAA)	42	24
<i>Staphylococcus</i> spp. ¹	<i>Baird-Parker agar</i> (B-P)	35	48
Mohos y levaduras ¹	<i>Oxytetracycline glucose yeast extract agar</i> (OGYEA)	25	120

¹ técnica de siembra en superficie (0,1 mL); ² técnica de siembra en profundidad (1 mL); ³ sobrecapa.

Aislamiento e identificación de *E. coli*

Una vez realizados los recuentos microbianos, se seleccionaron, de forma aleatoria, para cada muestra entre una y cuatro colonias crecidas en agar cristal violeta rojo neutro y sales biliares (*violet red bile agar*, VRBA; Oxoid Ltd.). Las colonias fueron transferidas a agar triptona de soja (*tryptone soy agar*, TSA; Oxoid Ltd.) e incubadas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura que se reflejan en la Tabla III.1 para este grupo bacteriano. Los cultivos puros se sometieron a la prueba de tinción de Gram, y se determinó su actividad catalasa y su actividad oxidasa. Las presuntas cepas de *E. coli* se confirmaron en base a la presencia de beta-glucuronidasa (habilidad para hidrolizar el compuesto *4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide* o MUG), beta-galactosidasa (habilidad para hidrolizar el compuesto *ortho-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside* o ONPG) y triptofanasa (habilidad para producir indol a partir del triptófano) usando el sistema miniaturizado *E. coli* test (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia).

Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de *E. coli*

Las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos se llevaron a cabo con un total de 120 cepas (20 cepas de cada sistema de producción). Los aislamientos se examinaron frente a un panel de 12 antibióticos en agar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.) utilizando la técnica de difusión por disco descrita por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). Se emplearon los siguientes discos de antibióticos (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia): gentamicina (CN; 10 µg), ampicilina-sulbactam (AMS; 20 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AUG; 30 µg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), nitrofurantoina (F; 300 µg) y fosfomicina (FOS; 200 µg). Se midieron las zonas de inhibición y las cepas se clasificaron como susceptibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes de acuerdo con los criterios del CLSI. Los aislamientos de susceptibilidad intermedia se consideraron junto con los aislamientos que fueron resistentes *stricto sensu* (Cardinale *et al.*, 2005). *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se usaron como cepas de referencia para el control de calidad de los discos de antibióticos. Un aislamiento se consideró multi-resistente cuando presentaba resistencia o susceptibilidad intermedia a dos o más antimicrobianos (Capita *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Los recuentos microbianos se transformaron en $\log \text{ufc/cm}^2$, calculándose las medias y las desviaciones estándar. Los datos se evaluaron mediante técnicas de análisis de varianza (ANOVA), con separación de medias con la prueba de rango múltiple de Duncan. Se realizó un ANOVA para los dos factores, grupo microbiano (G) y sistema de producción (P), y sus interacciones. Se realizó asimismo un ANOVA para todos los grupos microbianos. La prevalencia de cepas resistentes y los patrones de multi-resistencia se compararon mediante las pruebas de Fisher y Chi-cuadrado. La prueba t de Student se realizó para comparar el número medio de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes. Las diferencias significativas se establecieron para un valor de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Todos los análisis se llevaron a cabo usando el paquete estadístico Statistica® 6.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

RESULTADOS

Recuentos microbianos

El ANOVA de los dos factores, G y P, puso de manifiesto la influencia significativa ($P<0,01$) de ambos factores y su interacción. Los niveles de microbiota aerobia viable fueron similares en los huevos de gallina y de codorniz ($P>0,05$) con valores de $2,49\pm 1,14$ y $2,59\pm 1,63$ log ufc/cm², respectivamente. De manera similar, no se observaron diferencias entre las cáscaras de huevos de gallina y de codorniz en el caso de *Enterococcus* spp. ($0,49\pm 0,97$ y $0,65\pm 0,89$, respectivamente) y *Staphylococcus* spp. ($1,85\pm 1,00$ y $1,85\pm 0,72$, respectivamente). Por el contrario, las cáscaras de huevos de gallina presentaron mayores ($P<0,05$) recuentos que los huevos de codorniz por lo que respecta a microorganismos psicrotrofos ($1,79\pm 0,83$ y $1,19\pm 0,78$), *Enterobacteriaceae* ($0,81\pm 1,02$ y $0,19\pm 0,46$), coliformes fecales ($0,65\pm 0,92$ y $0,16\pm 0,45$) y *Pseudomonas* spp. ($1,89\pm 1,10$ y $1,27\pm 0,60$). Los recuentos de mohos y levaduras fueron superiores ($P<0,05$) en las cáscaras de huevos de codorniz ($2,44\pm 1,65$) que en los de gallina (media de $1,52\pm 1,21$).

La influencia del sistema de alojamiento en los recuentos microbianos de los huevos de gallina se muestra en la Tabla III.2. Los niveles de microbiota aerobia viable, *Enterococcus* spp. y mohos y levaduras fueron superiores ($P<0,05$) en la superficie de los huevos de producción doméstica que en el resto. Los mayores recuentos microbianos ($P<0,05$) de microorganismos psicrotrofos se obtuvieron en los huevos procedentes de gallinas camperas y en huevos caseros, los de enterobacterias en los de gallinas criadas en jaula, en suelo, de producción orgánica y doméstica, los de coliformes en los huevos de gallinas criadas en suelo y en huevos caseros, los de *Pseudomonas* spp. en gallinas camperas y los de *S. aureus* en la superficie de huevos de gallinas criadas en jaula, en suelo y de producción doméstica. Los porcentajes de huevos contaminados con cada uno de los grupos microbianos oscilaron entre el 80% y el 100%, dependiendo del sistema de producción (psicrotrofos), entre el 20% y el 75% (recuentos en VRBGA), entre el 10% y el 75% (VRBA), entre el 25% y el 80% (KAA) y entre el 70% y el 100% (OGYEA). Todos los huevos estaban contaminados con microbiota aerobia viable, *Pseudomonas* spp. y *S. aureus* (Tabla III.2).

De los 240 huevos examinados, el 45% fue positivo para *E. coli*, con un rango de prevalencia que osciló entre el 20% (jaula) y el 85% (producción doméstica). Los huevos de gallinas criadas en suelo, de gallinas camperas, de producción orgánica y de codorniz mostraron una prevalencia de *E. coli* del 80%, 25%, 35% y 25%, respectivamente.

Un total de 42 de los 240 huevos examinados (17,5%) presentaron suciedad en su cáscara. Ninguno de los huevos procedentes de jaulas convencionales, de gallinas camperas o de producción orgánica presentaron suciedad en su superficie, mientras que el 10%, el 15% y el 80% de los huevos procedentes de gallinas criadas en suelo, de codorniz o de producción doméstica presentaban suciedad, respectivamente. En todos los casos las cáscaras de los huevos estaban intactas, sin fisuras.

Tabla III.2. Recuentos microbianos (log ufc/cm²) en la cáscara de huevos recogidos de diferentes establecimientos de venta al público en el noroeste de España.

Recuentos microbianos	Huevos de gallina					Huevos de codorniz (jaula)
	Cría en jaula convencional	Cría en suelo	Camperas	Producción orgánica	Producción doméstica	
Microbiota aerobia viable	2,34±1,16 ^{ab} _a (100%) ¹	1,96±1,00 ^a _a (100%)	2,18±0,86 ^{ab} _a (100%)	2,25±1,05 ^{ab} _a (100%)	3,69±0,72 ^c _a (100%)	2,59±1,63 ^b _a (100%)
Microorganismos psicrotrofos	1,54±1,2 ^{ab} _{bc} (80%)	1,71±1,1 ^a _{ab} (100%)	2,19±0,5 ^c _a (100%)	1,41±0,5 ^{ab} _b (100%)	2,11±0,4 ^c _{bc} (100%)	1,19±0,8 ^b _b (100%)
Enterobacteriáceas	0,91±1,2 ^a _d (45%)	0,89±0,6 ^a _c (75%)	0,26±0,8 ^b _b (20%)	0,90±1,3 ^a _c (50%)	1,10±0,9 ^a _d (65%)	0,19±0,5 ^b _c (20%)
Coliformes fecales	0,10±0,2 ^a _e (15%)	1,35±1,0 ^b _{bc} (70%)	0,19±0,8 ^a _b (10%)	0,25±0,5 ^a _d (25%)	1,35±0,9 ^b _{de} (75%)	0,16±0,5 ^a _c (15%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,94±1,3 ^{abc} _{ab} (100%)	1,56±0,8 ^{ab} _{ac} (100%)	2,39±1,1 ^c _a (100%)	1,49±1,02 ^{ab} _b (100%)	2,08±1,2 ^{ac} _{bf} (100%)	1,27±0,6 ^b _{bd} (100%)
<i>Enterococcus</i> spp.	0,13±0,4 ^a _e (25%)	0,13±0,3 ^a _d (25%)	0,10±0,4 ^a _b (25%)	0,27±0,4 ^a _d (55%)	1,84±1,4 ^b _{be} (80%)	0,65±0,9 ^c _{bc} (60%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2,14±1,0 ^{ab} _a (100%)	1,94±1,0 ^{ac} _a (100%)	1,30±0,7 ^d _c (100%)	1,36±0,4 ^{cd} _b (100%)	2,49±1,2 ^a _{cfg} (100%)	1,85±0,7 ^{bcd} _{de} (100%)
Mohos y levaduras	1,02±1,1 ^a _{cd} (75%)	1,11±1,0 ^a _c (70%)	1,22±0,8 ^a _c (100%)	1,30±0,9 ^a _{bc} (80%)	2,97±1,0 ^b _g (100%)	2,44±1,7 ^c _{ae} (80%)

Los valores medios que en la misma fila no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores medios que en la misma columna no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). ¹, porcentaje de huevos contaminados con cada grupo microbiano.

Resistencia a antimicrobianos

Se examinaron 120 cepas de *E. coli* (20 de cada tipo de sistema de producción). Un total de 23 (19,17%) aislamientos fueron pan-susceptibles, 27 (22,50%) resistentes a un compuesto, y 70 (58,33%) mostraron multi-resistencia (resistencia a dos o más antimicrobianos), tal y como se muestra en la Tabla III.3. Las cepas multi-resistentes presentaron resistencia a 2 (21 cepas; 17,50%), 3 (43 cepas; 35,83%), 4 (4 cepas; 3,33%) o 5 (2 cepas; 1,67%) antimicrobianos. La mayor ($P<0,05$) frecuencia de multi-resistencia (95% de las cepas) se observó en los aislamientos procedentes de cría en jaula convencional y cría en suelo. Por otro lado, los porcentajes más elevados ($P<0,05$) de cepas susceptibles se detectaron en huevos procedentes de producción doméstica (70%) y orgánica (30%).

Tabla III.3. Susceptibilidad, resistencia y multi-resistencia a antibióticos en cepas de *E. coli* presentes en la cáscara de huevos recogidos en diferentes establecimientos de venta al público del noroeste de España.

Número de antibióticos	Huevos de gallina					Huevos de codorniz (jaula) (n=20)	MEDIA (n=120)
	Jaula convencional (n=20)	Cría en suelo (n=20)	Camperas (n=20)	Producción orgánica (n=20)	Producción doméstica (n=20)		
0	1 (5) ^a [†]	1 (5) ^a	1 (5) ^a	6 (30) ^b _a	14 (70) ^c _a	0 (0) ^a _a	23 (19,17) _a
1	0 (0) ^a _a	0 (0) ^a _a	9 (45) ^b _b	8 (40) ^b _a	2 (10) ^{ac} _b	8 (40) ^b _b	27 (22,50) _a
≥ 2	19 (95) ^a _b	19 (95) ^a _b	10 (50) ^b _b	6 (30) ^{bc} _a	4 (20) ^c _b	12 (60) ^b _b	70 (58,33) _b

[†], número (porcentaje) de aislamientos de *E. coli*. Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P<0,05$). Las medias en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P<0,05$).

El número medio de resistencias por cepa varió entre los distintos sistemas de producción, con los mayores ($P<0,001$) valores observados en cría en jaula convencional (2,85) y cría en suelo (3,10) y los menores en huevos de gallinas camperas (1,55) y de producción orgánica (1,00) y doméstica (0,75). Los huevos de gallina (considerando simultáneamente todos los tipos de producción) y los huevos de codorniz mostraron un número similar ($P>0,05$) de resistencias por cepa: 1,85 y 1,95, respectivamente.

La mayor prevalencia de resistencia se observó para TE (60,83% de las cepas estudiadas) y AUG (51,67%), seguida por SXT (27,50%), F y FOS (17,50%). Una baja prevalencia de resistencia (del 0,83 al 2,50% de las cepas) se encontró para el resto de los antimicrobianos examinados (Tabla III.4).

Tabla III.4. Frecuencia de resistencia a agentes antimicrobianos en aislamientos de *Escherichia coli* de la cáscara de huevos de mesa adquiridos en establecimientos de venta al público del noroeste de España.

Antimicrobiano	Huevos de gallina					Huevos de codorniz (jaula) (n=20)	Media (n=120)
	Jaula (n=20)	Suelo (n=20)	Camperas (n=20)	Orgánicas (n=20)	Domésticas (n=20)		
CN	0 (0) ^a [†]	2 (10) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	2 (1,67) _a
AMS	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	3 (15) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	3 (2,50) _a
AUG	18 (90) ^a _b	18 (90) ^a _b	7 (35) ^{bc} _b	4 (20) ^b _a	4 (20) ^b _a	11 (55) ^{ac} _b	62 (51,67) _b
TZP	0 (0) ^a	2 (10) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	2 (1,67) _a
CTX	0 (0) ^a	1 (5) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1 (0,83) _a
SXT	17 (85) ^a _b	10 (50) ^b _c	1 (5) ^c _a	3 (15) ^c _a	2 (10) ^c _a	0 (0) ^c _a	33 (27,50) _c
C	0 (0) ^a	3 (15) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	3 (2,50) _a
CIP	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1 (5) ^a	0 (0) ^a	1 (0,83) _a
NA	0 (0) ^a	1 (5) ^a	0 (0) ^a	0 (0) ^a	1 (5) ^a	0 (0) ^a	2 (1,67) _a
TE	19 (95) ^a _b	18 (90) ^{ab} _b	14 (70) ^b _c	0 (0) ^c _a	4 (20) ^c _a	18 (90) ^{ab} _d	73 (60,83) _b
F	3 (15) ^a	4 (20) ^{ab} _a	9 (45) ^b _{bc}	0 (0) ^a	1 (5) ^a	4 (20) ^{ab} _c	21 (17,5) _d
FOS	0 (0) ^a	3 (15) ^a	0 (0) ^a	10 (50) ^b _b	2 (10) ^a	6 (30) ^{ab} _{bc}	21 (17,50) _d

[†], número (porcentaje) de aislamientos de *E. coli* resistentes. Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P>0,05$). Los valores medios en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) no muestran diferencias significativas entre sí ($P>0,05$). Gentamicina (CN; 10 µg), ampicilina-sulbactam (AMS; 20 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AUG; 30 µg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), nitrofurantoina (F; 300 µg) y fosfomicina (FOS; 200 µg).

La Tabla III.5 muestra los patrones de prevalencia de resistencia en los aislamientos de *E. coli*. Los patrones más frecuentes fueron: AUG/SXT/TE (30 cepas; 25%), AUG/TE/FOS (12 cepas; 10%), TE/F (10 cepas; 8,33%) y F (10 cepas; 8,33%). Las restantes cepas resistentes o multi-resistentes (35) exhibieron 16 patrones diferentes.

Tabla III.5. Patrones de resistencia a antibióticos de las cepas de *E. coli* resistentes o multi-resistentes aisladas de la superficie de huevos de mesa en el noroeste de España.

PATRÓN DE RESISTENCIA	NÚMERO DE CEPAS
CN/AUG/TZP/CTX/FOS	1
AUG/SXT/CIP/NA/TE	1
AUG/C/TE/FOS	2
AUG/TZP/NA/TE	1
AUG/TE/F/FOS	1
CN/AUG/TE	1
AUG/SXT/TE	30
AUG/TE/FOS	12
AUG/SXT	1
AUG/TE	8
TE/F	10
TE/FOS	2
AMS	3
AUG	4
SXT	1
C	1
TE	5
F	10
FOS	3

Gentamicina (CN; 10 µg), ampicilina-sulbactam (AMS; 20 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AUG; 30 µg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), nitrofurantoina (F; 300 µg) y fosfomicina (FOS; 200 µg).

DISCUSIÓN

Recuentos microbianos

Con la excepción de los huevos de producción doméstica ($3,69 \pm 0,72 \log \text{ ufc/cm}^2$), los niveles de microbiota aerobia viable en el presente estudio estuvieron por debajo de los valores recogidos en la bibliografía consultada, entre 2,61 y 5 log ufc por cáscara (Anónimo, 2004; De Reu *et al.*, 2009; Mallet *et al.*, 2006; Wall *et al.*, 2008). Debe señalarse, no obstante, que la mayoría de los trabajos publicados se refieren a contaminación inicial, inmediatamente después de la puesta, mientras que las muestras recogidas en el presente trabajo fueron analizadas al cabo de varios días de la distribución comercial. En este sentido, y a la hora de comparar los distintos resultados, cabe señalar que, tal y como ha sido sugerido por algunos autores (De Reu *et al.*, 2008), el almacenamiento de los huevos, en refrigeración o a temperatura ambiente, tiene como consecuencia un descenso significativo en la contaminación bacteriana de la superficie de los huevos. Asimismo, las diferencias en el método usado para la recuperación de las bacterias presentes en la cáscara podrían ser parcialmente responsables de los menores recuentos obtenidos en el presente trabajo, en relación con los de otros autores consultados. De Reu *et al.* (2005) observaron que el lavado y frotado de las cáscaras de huevo intactas con agua de peptona o PBS (*phosphate buffer saline*) daba recuentos estadísticamente superiores que el triturado de la cáscara en agua de peptona tamponada. Los niveles de microbiota aerobia viable de las cáscaras de huevo en este estudio estuvieron por debajo de 5 log₁₀ ufc por cáscara (considerando que la superficie media de la cáscara es de 66 cm² para los huevos de gallina y 22 cm² para los de codorniz), un límite considerado como aceptable desde el punto de vista de calidad higiénica (De Reu *et al.*, 2008).

Investigaciones previas han puesto de manifiesto diferencias en la contaminación bacteriana de las cáscaras de huevo dependiendo de los sistemas de alojamiento de las aves. Algunos estudios han mostrado que los huevos de gallinas criadas en suelo estaban más contaminados con bacterias aerobias que los huevos de gallinas criadas en jaula (De Reu *et al.*, 2008, 2009). Las diferencias en la construcción o el manejo de la explotación podrían también influir en la contaminación bacteriana de la cáscara de los huevos (De Reu *et al.*, 2008). Este hecho podría explicar ciertas discrepancias entre los hallazgos del

presente estudio y los de publicaciones previas. También el manejo de los huevos a lo largo de la cadena de distribución de alimentos podría explicar algunas de las diferencias entre trabajos.

Los mayores recuentos microbianos observados en los huevos de producción doméstica comparados con el resto de los sistemas de producción podrían estar en relación con la mayor prevalencia de huevos sucios en el caso de los huevos “caseros”. Sin embargo, Wall *et al.* (2008) han puesto de manifiesto una relación pobre entre grado de suciedad de los huevos y los niveles de contaminación. Así, no es posible estimar los niveles de contaminación de la cáscara de los huevos en base a observaciones visuales. El hecho de que los huevos procedentes de gallinas criadas en jaula presentaban un menor grado de suciedad superficial que los de gallinas criadas en suelo es congruente con los hallazgos de Djukić-Stojčić *et al.* (2009). Estos autores han indicado que la limpieza de los huevos de las gallinas criadas en suelo depende de las condiciones ambientales, de los porcentajes de huevos puestos fuera del nido y de la organización del trabajo en la explotación (por ejemplo la frecuencia de recolección y la limpieza de los nidos).

El elevado porcentaje medio de cáscaras de huevos contaminadas con cepas de *E. coli* (45%) no ha sido en absoluto sorprendente, ya que es un hecho ampliamente reconocido que los huevos frescos se contaminan frecuentemente con heces tanto durante la puesta como posteriormente por contaminación ambiental (Adesiyun *et al.*, 2006). Así, la mayor prevalencia de *E. coli* en los huevos domésticos podría estar en relación con la elevada frecuencia de suciedad en estas muestras. De forma similar a nuestros resultados, Ali Akond *et al.* (2009) pusieron de manifiesto que el 42% de los huevos analizados en Bangladesh estaban contaminados con *E. coli*.

Resistencia a antimicrobianos

La elevada prevalencia de cepas de *E. coli* resistentes o multi-resistentes observada en huevos de mesa en el presente estudio (80,83%) es comparable a las cifras indicadas por otros autores (Adesiyun y Kaminjolo, 1992; Adesiyun *et al.*, 2007; Ali Akond *et al.*, 2009; NARMS, 2011). Esta elevada prevalencia de resistencia, que puede tener importantes implicaciones terapéuticas, puede ser debida al uso excesivo de agentes antimicrobianos en las explotaciones de gallinas ponedoras (Capita y Alonso-Calleja, 2013). En este sentido hay

que señalar que el uso de antimicrobianos ha creado una enorme presión que favorece la emergencia, selección y diseminación de resistencia a antimicrobianos en las bacterias de la microbiota de las aves (Miles *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2009). Puesto que la cáscara de los huevos se contamina durante la puesta, no es raro que, como consecuencia de una contaminación cruzada y/o un insuficiente cocinado, las cepas de *E. coli* presentes pueden infectar al consumidor. Además se ha demostrado que las bacterias pueden adquirir resistencia a antimicrobianos como consecuencia de la contaminación ambiental, y de esta forma se han encontrado bacterias resistentes a antibióticos en carne de ave y huevos de explotaciones que no emplean estos compuestos (Miles *et al.*, 2006). Las bacterias resistentes de los alimentos pueden colonizar el tracto intestinal humano y así transferir sus genes de resistencia horizontalmente a las bacterias de la microbiota intestinal. Se ha demostrado que la resistencia en el intestino de las aves puede persistir durante largos periodos de tiempo incluso en ausencia de antibióticos (Chaslus-Dancla *et al.*, 1987). Así, tanto los huevos como la carne de ave se han identificado en diferentes países como una fuente de bacterias resistentes a antibióticos en seres humanos (Van den Bogaard *et al.*, 2001).

Un hecho preocupante es que numerosas cepas en el presente estudio (58,33%) mostraron resistencia a dos o más agentes antimicrobianos (multi-resistencia). Un problema asociado con estas cepas multi-resistentes es la reducción del espectro de antimicrobianos efectivos en la práctica clínica. La alta prevalencia de cepas de *E. coli* multi-resistentes en los sistemas de producción convencional (gallinas criadas en jaula, en suelo y camperas), donde el número de antimicrobianos empleado es relativamente restringido, pone de manifiesto que los mecanismos de resistencia a diferentes antibióticos están ligados (Capita y Alonso-Calleja, 2013). La detección de cepas resistentes a nitrofurantoina, un agente antimicrobiano prohibido en la Unión Europea en medicina veterinaria en los años 1990s, proporciona una evidencia adicional a la hipótesis de que la aplicación de un antimicrobiano puede seleccionar para resistencia no solamente al fármaco aplicado, sino también a otros compuestos, hecho que puede provocar la aparición de fenotipos de multi-resistencia.

De manera similar a los resultados de otros autores (Ojeniyi, 1985; Papadopoulou *et al.*, 1997), la mayor prevalencia de resistencia a antimicrobianos en el presente estudio se observó para las cepas de *E. coli* aisladas de cáscaras de huevos procedentes de gallinas

de cría en jaulas convencionales, en suelo y de gallinas camperas, en comparación con las procedentes de sistemas de producción orgánica y doméstica, en los que el uso de antimicrobianos es previsiblemente menor. Este hecho sugiere que estos sistemas de producción pueden limitar el desarrollo y diseminación de resistencia a antibióticos en las bacterias presentes en los alimentos. Además del uso de antibióticos, el hacinamiento y el saneamiento deficiente, dos factores frecuentemente asociados con las explotaciones de cría intensiva (por ejemplo cría en jaula), son también causas principales de la selección de resistencia a antimicrobianos. Existe, por parte de los consumidores, una tendencia a pensar que los huevos de explotaciones ecológicas y domésticas son más saludables y seguros que los productos convencionales (Magkos *et al.*, 2006). Los resultados del presente trabajo justifican en parte la percepción de los consumidores. Por el contrario, se ha señalado que, en comparación con los sistemas de producción convencional en jaulas, los sistemas que permiten el movimiento libre de las aves (cría en suelo, gallinas camperas, de producción orgánica o doméstica) son por definición más difícilmente controlables desde el punto de vista higiénico y las aves pueden contactar más fácilmente con contaminantes a los que son inaccesibles en las explotaciones intensivas convencionales, hecho que se traduce en un incremento del riesgo de infecciones e intoxicaciones por agentes bióticos o abióticos (Kijlstra *et al.*, 2009).

El elevado porcentaje de cepas de *E. coli* resistentes a AUG, SXT y TE observado en el presente estudio es consistente con los hallazgos de otros investigadores (Lanz *et al.*, 2003; Musgrove *et al.*, 2006; NARMS, 2011; Van de Bogaard *et al.*, 2001). Debe tenerse en cuenta que éstos se encuentran entre los principales antibióticos usados para tratar las enfermedades infecciosas en manadas de aves de corral en el ámbito mundial, incluida España. Así, no es extraño que algún grado de resistencia haya emergido a lo largo del tiempo (Adesiyun *et al.*, 2005; Miles *et al.*, 2006). El escaso porcentaje de cepas resistentes a las fluoroquinolonas en el presente estudio (entre el 0% y el 5%) es sorprendente, puesto que estos antibióticos se encuentran entre los compuestos más frecuentemente usados en las granjas avícolas en España (Capita *et al.*, 2007). Estudios previos realizados en España ponen de manifiesto una elevada prevalencia de resistencia a fluoroquinolonas en las cepas de *E. coli* procedentes de aves y de poblaciones humanas (Oteo *et al.*, 2005).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adesiyun, A. y Kaminjolo, J. S. (1992). Susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* strains from diarrhoeic and non-diarrhoeic livestock in Trinidad. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **45**, 260-262.
- Adesiyun, A., Offiah, N. Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V. y Musai, L. (2006). Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. *Food Research International* **39**, 212-219.
- Adesiyun, A., Offiah, N. Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V. y Musai, L. (2007). Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. *Food Control* **18**, 306-311.
- Adesiyun, A., Offiah, N., Lashley, V., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S. y Georges, K. (2005). Prevalence of antimicrobial residues in table eggs in Trinidad. *Journal of Food Protection* **68**, 1501-1505.
- Ali Akond, M., Hassan, S. M. R., Alam, S. y Shirin, M. (2009). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *American Journal of Environmental Sciences* **5**, 47-52.
- Anónimo (2004). Final report of EggDefence project QLRT-2001-01606: improving quality and safety of hen eggs in new production system by reinforcing the antimicrobial natural defence and by developing tools for grading eggs, pp. 127-131. European Commission, Nouzilly, France.
- Barnes, H. J. y Gross, W. B. (1997). Colibacillosis, 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.
- Begun, K., Reza, T. A., Haque, M., Hossain, A., Hassan, F. M. K., Hasan, S. H., Akhter, N., Ahmed, A. y Barua, U. (2010). Isolation, identification and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* spp. from chicken eggs, intestines and environmental samples. *Bangladesh Pharmaceutical Journal* **13**, 23-27.
- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja C. y Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1366-1375.
- Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J. D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E. F. y Salvat, G. (2005). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **56**, 13-16.

- Chaslus-Dancla, E., Gerbaud, G., Lagorce, M., Lafont, J. P. y Courvalin, P. (1987). Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **31**, 784-788.
- CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M. y Herman, L. (2005). The use of total aerobic and Gram-negative flora for quality assurance in the production chain of consumption eggs. *Food Control* **16**, 147-155.
- De Reu, K., Rodenburg, T. B., Grijspeerdt, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Tuytens, F. A. M., Sonck, B., Zoons, J. y Herman, L. (2009). Bacteriological contamination, dirt, and cracks of eggshells in furnished cages and non-cage systems for laying hens: an international on-farm comparison. *Poultry Science* **88**, 2442-2448.
- De Reu, K., Messens, W., Heyndrickx, M., Rodenburg, T. B., Uyttendaele, M. y Herman, L. (2008). Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *World's Poultry Science Journal* **64**, 5-19.
- Djukić-Stojčić, M., Perić, L., Bjedov, S. y Milošević, N. (2009). The quality of table eggs produced in different housing systems. *Biotechnology in Animal Husbandry* **25**, 1103-1108.
- EASAC (2007). Tackling antibacterial resistance in Europe. European Academies Science Advisory Council, June 2007. Accesible en: <http://www.leopoldina-halle.de/easac-report07.pdf>.
- EFSA (2010). The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **8**, 1658-1918.
- EU (1991). Council Regulation (EEC) No 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. *Official Journal of European Communities* **L 198**, 1-15.
- EU (1999a). Council Directive 1999/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens. *Official Journal of European Communities* **L 203**, 53-57.
- EU (1999b). Council Regulation (EC) No 1804/1999 of 19 July 1999 supplementing Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs to include livestock production. *Official Journal of European Communities* **L 222**, 1-28.
- EU (2003). Commission Regulation (EC) No 2295/2003 of 23 December 2003 introducing detailed rules for implementing Council Regulation (EEC) No 1907/90 on certain marketing standard for eggs. *Official Journal of European Communities* **L 340**, 16-34.

- Kijlstra, A., Meerburg, B. G. y Bos, A. P. (2009). Food safety in free-range and organic livestock systems: risk management and responsibility. *Journal of Food Protection* **72**, 2629-2637.
- Lanz, R., Kuhnert, P. y Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology* **91**, 37-84.
- Magkos, F., Arvaniti, F. y Zampelas, A. (2006). Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **46**, 23-56.
- Mallet, S., Guesdon, V., Ahmed, A. M. H. y Nys, Y. (2006). Comparison of eggshell hygiene in two housing systems: standard and furnished cages. *British Poultry Science* **47**, 30-35.
- Matt, D., Veromann, E. y Luik, A. (2009). Effect of housing systems on biochemical composition of chicken eggs. *Agronomy Research* **7**, 662-667.
- Messens, W., Grijspeerdt, L., De Reu, K., De Ketelaere, B., Mertens, K., Bamelis, F., Kemps, B., De Baerdemaeker, J., Decuypere, E. y Herman, L. (2007). Eggshell penetration of various types of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Food Protection* **70**, 623-628.
- Miles, T. D., McLaughlin, W. y Brown, P. D. (2006). Antimicrobial resistance or *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research* **2**, 1-9.
- Miranda, J. M., Mondragón, A., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Cepeda, A. y Franco, C. M. (2009). Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistant to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Science* **82**, 284-288.
- Musgrove, M. T., Jones, D. R., Northcutt, J. K., Cox, N. A., Harrison, M. A., Fedorka-Cray, P. J. y Ladely, S. R. (2006). Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poultry Science* **85**, 1665-1669.
- NARMS (2011). 2008 Animal Arm Annual Report. Accesible en: <https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/66120508/NARMS/NARMS2008/NARMSAnimalArm2008.pdf>.
- Ojeniyi, A. A. (1985). Comparative bacterial drug resistance in modern battery and free-range poultry in a tropical environment. *Veterinary Record* **117**, 11-12.
- Oteo J., Lázaro, E., de Abajo, F. J., Baquero, F., Campos, J. y Spanish EARSS Group (2005). Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerging Infectious Diseases Journal* **11**, 546-553.
- Papadopoulou, C., Dimitriou, D., Levidiotou, S., Gessouli, H., Panagiou, A., Golegou, S. y Antoniadis, G. (1997). Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics:

is there a health hazard for consumers? *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases* **20**, 35-40.

Pascale, M. (2010). Future prospects for the European egg industry. Worldpoultry.net. Accesible en: <http://www.worldpoultry.net/chickens/marketing/eggs/future-prospects-for-the-european-egg-industry-7678.html>.

SCENIHR (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf.

Sinanoglou, V. J., Strati, I. F. y Miniadis-Meimaroglou, S. (2011). Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: a comparative study. *Food Chemistry* **124**, 971-977.

Van den Bogaard, A. E., London, N., Driessen, C. y Stobberingh, E. E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**, 763-771.

Wall, H., Tauson, R. y Sørgerd, S. (2008). Bacterial contamination of eggshells in furnished and conventional cages. *Journal of Applied Poultry Research* **17**, 11-16.

WHO (2009). Related WHO publications and links on antimicrobial resistance. Accesible en: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/publications/en/index.html.

CAPÍTULO IV

**RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS EN AISLAMIENTOS DE *E. coli* PROCEDENTES
DE CARNE DE AVE CONVENCIONAL Y ECOLÓGICA: COMPARACIÓN ENTRE
LOS MÉTODOS DE DIFUSIÓN POR DISCO Y EL SISTEMA MINIATURIZADO**
Sensi Test Gram-negative

RESUMEN

Se adquirieron, en ocho establecimientos de venta al público del noroeste de España seleccionados aleatoriamente, un total de 120 muestras de canales de ave (pollo, pavo y codorniz de sistemas de producción convencionales y pollo de granjas orgánicas; 30 muestras de cada grupo), que fueron sometidas a análisis microbiológicos. Los recuentos de microorganismos psicrotrofos oscilaron entre $4,87 \pm 0,83 \log_{10}$ ufc/cm² de piel en codorniz y $6,01 \pm 0,38 \log_{10}$ ufc/cm² de piel en pavo. Los niveles de coliformes fecales fueron superiores ($P < 0,05$) en las muestras de carne de pollo de producción convencional ($2,95 \pm 0,48 \log_{10}$ ufc/cm² de piel) que en el resto de las muestras (de $1,71 \pm 0,29 \log_{10}$ ufc/cm² de piel en pavo a $2,19 \pm 0,34 \log_{10}$ ufc/cm² de piel en codorniz). Se detectó la presencia de *Escherichia coli* en todas las muestras analizadas. Se examinaron 60 cepas de *E. coli* (15 de cada tipo de muestra) para determinar su susceptibilidad a antimicrobianos, utilizando tanto el método convencional de difusión por disco (12 antimicrobianos) como un sistema miniaturizado disponible comercialmente (*Sensi Test Gram-negative*). La técnica de difusión por disco puso de manifiesto que el 91,7% de los aislamientos eran multi-resistentes (resistentes a dos o más antimicrobianos). La resistencia al ácido nalidíxico fue el hallazgo más común (85,0% de las cepas), seguida por la resistencia a ampicilina (75,0%), ciprofloxacina (73,3%) y tetraciclina (61,7%). El número medio de resistencias por cepa fue superior ($P < 0,05$) en carne de ave de producción convencional (de 5,20 en pollo a 6,40 en codorniz) que en pollo orgánico (2,53). Se observó una concordancia (coeficiente kappa) de 0,74 entre los dos métodos ensayados. Usando como método de referencia el método de difusión por disco, la sensibilidad, especificidad y eficiencia del sistema miniaturizado fueron 71,52%, 97,60% y 89,63%, respectivamente. Los hallazgos de este trabajo apuntan hacia un vínculo entre el uso de antimicrobianos en explotaciones convencionales de aves y la selección de bacterias resistentes a antibióticos en carne, a la vez que aconsejan la necesidad de un uso prudente de antibióticos en producción animal. Puesto que la carne de ave es un reservorio importante de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos, se enfatiza la conveniencia de que el consumidor reciba formación en buenas prácticas higiénicas, para evitar la contaminación cruzada o el insuficiente cocinado de la carne de ave.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La carne de ave supone una parte importante de la dieta humana. De hecho, el consumo medio anual de carne de ave (12,60 kg por persona) se ha ido incrementando a un ritmo constante en los últimos años y actualmente excede al consumo de carne de vacuno (9,60 kg) y se aproxima al del cerdo (15,00 kg) (FAO, 2011). Dado su elevado nivel de consumo, la calidad (incluyendo la calidad microbiológica) de la carne de ave procedente de establecimientos de venta al público es un motivo de preocupación para los distribuidores, los consumidores y los técnicos oficiales de Salud Pública. La contaminación bacteriana de las canales refrigeradas de ave tiene importantes implicaciones desde un punto de vista sanitario y económico. Los niveles de microorganismos psicrotrofos han sido usados para estimar la calidad y seguridad microbiológica de la carne de mamíferos y aves, las condiciones higiénicas durante el procesado y como un indicador general de la vida útil potencial del producto (Guevara-Franco *et al.*, 2010). Los recuentos de coliformes y de *Escherichia coli* se emplean como indicadores de la higiene durante el procesado y del adecuado almacenamiento del producto (Capita *et al.*, 2002).

Los alimentos orgánicos, incluyendo la carne de ave, están habitualmente disponibles en los establecimientos comerciales de los países desarrollados, donde su consumo está creciendo con rapidez (Nie y Zepeda, 2011). Al contrario de lo que ocurre en la producción convencional de carne de ave, donde los agentes antimicrobianos son usados ampliamente para el tratamiento, control y prevención de enfermedades (Capita *et al.*, 2007) (los antibióticos están prohibidos como promotores del crecimiento en la Unión Europea desde 2006; Capita y Alonso-Calleja, 2013), las prácticas de producción orgánica tienen muy restringido el uso de antimicrobianos. Además, las aves de cría ecológica deben ser alimentadas exclusivamente con piensos y suplementos de producción orgánica (Luangtongkum *et al.*, 2006). La percepción de los consumidores en relación con las prácticas de cría de las aves es que la carne orgánica es de mejor calidad que la convencional (de cría intensiva), y esta creencia influye en su intención de compra (Soonthornchaikul *et al.*, 2006). Sin embargo, es escasa la información disponible en relación con el impacto de las prácticas de producción orgánica en los recuentos microbianos y en los patrones de resistencia a antibióticos de las bacterias presentes en la superficie de las aves.

La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en los alimentos es un problema de Salud Pública dada la posibilidad de transferencia de bacterias patógenas a las poblaciones humanas. Además, las bacterias resistentes a antibióticos pueden suponer un reservorio de genes de resistencia transferibles a bacterias patógenas o comensales del tracto digestivo humano (Capita y Alonso-Calleja, 2013). *E. coli* es la bacteria más prevalente en el tracto gastrointestinal de los animales de sangre caliente y de los seres humanos, donde supone aproximadamente entre 10^6 y 10^9 ufc/g de heces. *E. coli* puede contaminar los alimentos fácilmente durante la evisceración en el matadero o por contacto con superficies contaminadas. *E. coli* es también un agente zoonótico, que puede estar involucrado en infecciones intestinales y extraintestinales (Lei *et al.*, 2010). Además, el nivel de resistencia a antimicrobianos en las cepas comensales de *E. coli* se considera un excelente indicador de la presión selectiva ejercida por el uso de antibióticos y puede ayudar a predecir los problemas de resistencia esperables asociados a las bacterias patógenas (SCENIHR, 2009).

Actualmente, la técnica de difusión por disco es el método más frecuentemente usado para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos de las cepas de *E. coli* (Sjölund *et al.*, 2009). Sin embargo, este método es tedioso al implicar gran carga de trabajo y gasto de material, por lo que en los últimos años se han desarrollado pruebas rápidas comerciales para la determinación *in vitro* de la susceptibilidad bacteriana a antimicrobianos. El sistema “*Sensi Test Gram-negative*” (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia) consta de 24 pocillos en los que hay antibióticos deshidratados para la determinación de la susceptibilidad de las bacterias Gram-negativas y enterococos, obteniéndose los resultados en 18-24 horas. No se ha publicado información sobre la concordancia entre el método convencional de difusión por disco y el sistema miniaturizado.

Los objetivos de este estudio han sido comparar (i) la calidad microbiológica y (ii) los patrones de resistencia a antibióticos de cepas de *E. coli* procedentes de muestras de carne de ave convencional (pollo, pavo y codorniz) y de pollo orgánico en el noroeste de España. Además, se han comparado los resultados del método de difusión por disco y del sistema miniaturizado disponible comercialmente “*Sensi Test Gram-negative*”.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Entre septiembre de 2010 y septiembre de 2011, se obtuvieron 120 canales de ave, incluyendo pollo orgánico (n=30), pollo de cría convencional (n=30), pavo de cría convencional (n=30) y codorniz de cría convencional (n=30). Las muestras se adquirieron en ocho establecimientos de venta al público, aleatoriamente seleccionados, de la provincia de León, y todas ellas procedían de granjas y mataderos españoles. Todas las muestras se colocaron en bolsas de plástico estéril individuales para prevenir el goteo y la contaminación cruzada, y fueron inmediatamente transportadas en una nevera portátil al laboratorio, donde se almacenaron a $3^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ hasta el momento del análisis, que tuvo lugar en el plazo máximo de una hora desde la llegada de las muestras al laboratorio.

Recuentos microbianos

Con la ayuda de pinzas y bisturí y de una plantilla estéril, se tomaron de cada canal 25 cm² de piel de la pechuga. Las muestras de piel se homogeneizaron (Masticator IUL, Barcelona, España) durante dos minutos en 225 mL de agua de peptona al 0,1% (p/v) (Oxoid Ltd.). Posteriormente se realizaron diluciones decimales empleando el mismo diluyente. La determinación de los microorganismos psicrotrofos se llevó a cabo en la superficie de agar para recuento en placa (*plate count agar*, PCA; Oxoid Ltd.) incubado durante 10 días a $7^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$. Para la enumeración de coliformes fecales se sembraron, en profundidad y por duplicado, las diluciones apropiadas en placas de agar cristal violeta rojo neutro y sales biliares (*violet red bile agar*, VRBA; Oxoid Ltd.), con sobrecapa, que fueron incubadas a $44^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ durante 24 horas. Las placas se incubaron en condiciones de aerobiosis. El recuento de colonias se realizó en las placas que, tras la incubación, presentaban el crecimiento de entre 30 y 300 colonias (siembra en profundidad) o entre 25 y 250 colonias (siembra en superficie).

Aislamiento e identificación de *E. coli*

Una vez realizados los recuentos bacterianos, entre una y cinco colonias crecidas en VRBA se seleccionaron aleatoriamente a partir de cada muestra, se transfirieron a la superficie de agar triptona de soja (*tryptone soy agar*, TSA; Oxoid Ltd.) y se incubaron bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura anteriormente señalados para este grupo

microbiano. Una vez obtenidos cultivos puros, éstos se examinaron para determinar su morfología y características celulares (tinción de Gram) y actividades oxidasa y catalasa. Las presuntas cepas de *E. coli* fueron confirmadas mediante el sistema miniaturizado de identificación *E. coli test* (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italia).

Determinación de la susceptibilidad a antimicrobianos de los aislamientos de *E. coli*

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos con un total de 60 aislamientos (15 de cada tipo de muestra). Cada cepa procedía de una canal diferente y su selección fue aleatoria. Se llevaron a cabo dos grupos de pruebas. Por un lado, las cepas se examinaron para un panel de 12 antimicrobianos utilizando la técnica convencional de difusión por disco en agar Mueller-Hinton (Oxoid Ltd.), según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). Se emplearon los siguientes discos de antibióticos (Liofilchem s.r.l.): gentamicina (GEN; 10 µg), ampicilina (AMP; 10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30 µg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), fosfomicina (FOS; 200 µg) y nitrofurantoina (F; 300 µg). Las zonas de inhibición se midieron y las cepas se clasificaron como susceptibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes según los criterios del *Clinical and Laboratory Standards Institute* -EE.UU.- (CLSI, 2008). Los 60 aislamientos se examinaron también usando el sistema miniaturizado “*Sensi Test Gram-negative*” (Liofilchem s.r.l.) (23 antimicrobianos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En función del color de los pocillos tras la incubación, las cepas se clasificaron como susceptibles, de susceptibilidad intermedia o resistentes. Las cepas de susceptibilidad intermedia se consideraron conjuntamente con las resistentes *stricto sensu* (Cardinale *et al.*, 2005). *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 se usaron como cepas de referencia para el control de los discos de antibióticos. Un aislamiento se consideró multi-resistente cuando mostraba resistencia o susceptibilidad intermedia a dos o más antimicrobianos (Capita *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Los recuentos microbianos se transformaron en \log_{10} ufc/cm² de piel, calculándose las medias y desviaciones estándar. Los datos se evaluaron mediante técnicas de análisis de

varianza (ANOVA) y la prueba de rango múltiple de Duncan. La prevalencia de cepas resistentes se comparó mediante las pruebas de Fisher y Chi-cuadrado. La prueba de Mann-Whitney U se realizó para comparar el número medio de antimicrobianos al que las cepas fueron resistentes. Las diferencias significativas se establecieron para un nivel de probabilidad del 5% ($P < 0,05$). Las pruebas se realizaron con el programa estadístico Statistica® 6.0 (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, EE.UU.).

La evaluación del sistema miniaturizado se realizó mediante el cálculo de la sensibilidad, especificidad, eficiencia y valor predictivo. Las definiciones y cálculos de estos valores se muestran en la Figura IV.1. Puesto que la verdadera susceptibilidad de las cepas era desconocida, se consideró que el método convencional de difusión por disco era el valor real. Las dos pruebas se compararon mediante el cálculo del coeficiente kappa (Capita *et al.*, 2001).

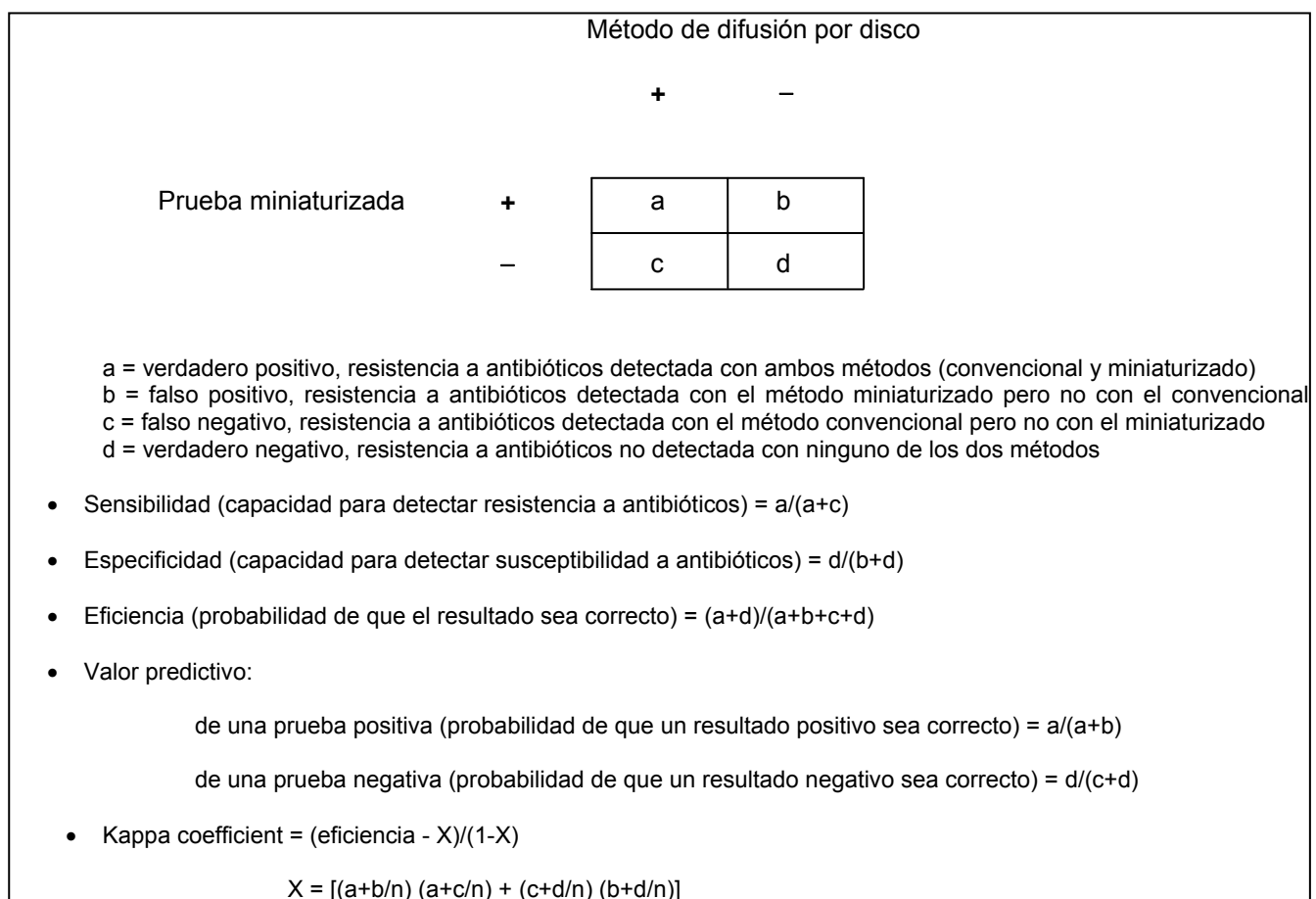


Figura IV.1. Definición y cálculo de la sensibilidad, especificidad, eficiencia, valor predictivo y coeficiente kappa.

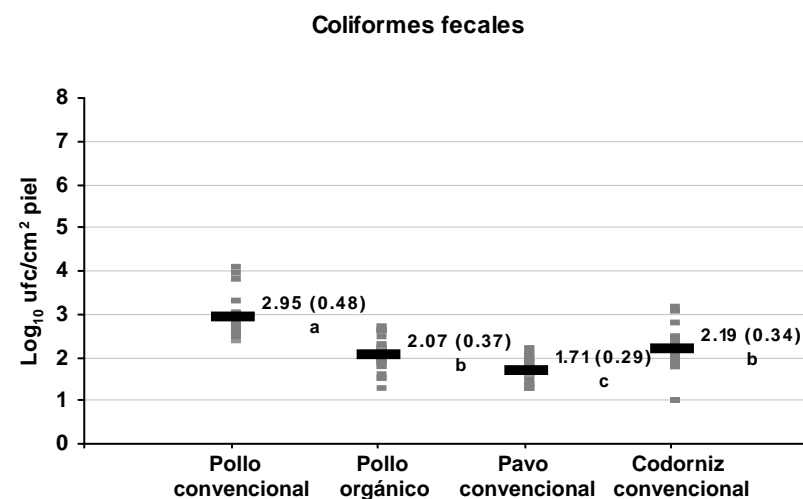
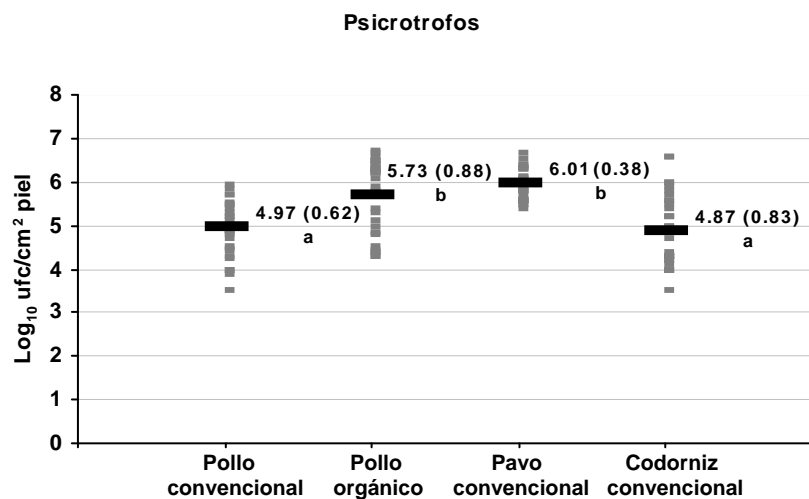
RESULTADOS

Recuentos microbianos

Las 120 muestras examinadas estaban contaminadas con microorganismos psicrotrofos, coliformes fecales y *E. coli*. La Figura IV.2 muestra los recuentos de psicrotrofos y coliformes fecales en pollo (convencional y orgánico), pavo y codorniz. Los niveles de psicrotrofos oscilaron entre $4,87 \pm 0,83 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ (codorniz) y $6,01 \pm 0,38 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$ (pavo). De entre los distintos tipos de muestras estudiadas, las canales de pollo de cría convencional presentaron los mayores ($P < 0,05$) recuentos de coliformes fecales ($2,95 \pm 0,48 \log_{10} \text{ ufc/cm}^2$). El resto de las muestras mostraron niveles similares ($P > 0,05$) de coliformes fecales, que oscilaron entre $1,71 \pm 0,29$ (pavo) y $2,19 \pm 0,34$ (codorniz).

Resistencia a antibióticos

Se estudió la resistencia a antibióticos de 60 cepas (15 de cada tipo de muestra) frente a 12 antibióticos usando la técnica convencional de difusión por disco. Cuatro (6,7%) aislamientos fueron pan-susceptibles, uno (1,7%) resistente a un compuesto y 55 (91,7%) mostraron multi-resistencia (resistencia a dos o más antimicrobianos). Se obtuvieron cepas multi-resistentes frente a dos (3 cepas; 5,0%), tres (7 cepas; 11,7%), cuatro (7 cepas; 11,7%), cinco (14 cepas; 23,4%), seis (10 cepas; 16,7%), siete (7 cepas; 11,7%), ocho (4 cepas; 6,7%) o nueve (3 cepas; 5,0%) antimicrobianos (Tabla IV.1). Todas las cepas de los sistemas de producción convencionales mostraron resistencia frente a dos o más antibióticos diferentes. Por otro lado, en el caso del pollo de cría orgánica, se observaron cepas susceptibles a todos los compuestos (26,7%) y resistentes a un compuesto (6,7%). Se obtuvieron diferencias sustanciales en el número de resistencias por cepa entre los diferentes tipos de aves (Tabla IV.1), con valores medios menores ($P < 0,05$) en pollo orgánico (2,53) que en pollo convencional (5,36).



Los datos son valores medios (desviación estándar); las medias en la misma gráfica que no comparten ninguna letra son significativamente ($P < 0,05$) diferentes.

Figura IV.2. Recuentos microbianos obtenidos en piel de diferentes especies de aves.

Tabla IV.1. Porcentaje de cepas de *E. coli* susceptibles, resistentes y multi-resistentes en cada tipo de muestra.

Tipo de muestra	Número de antibióticos a los que las cepas fueron resistentes										Número medio de resistencias por cepa
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pollo convencional				13,3	13,3	40,0	20,0		13,3		5,20±1,47 ^a
Pollo orgánico	26,7	6,7	13,3	20,0	20,0	6,7		6,7			2,53±2,10 ^b
Pavo convencional			6,7	13,3	6,7	20,0	26,7	13,3	6,7	6,7	5,47±1,92 ^{ac}
Codorniz convencional					6,7	26,7	20,0	26,7	6,7	13,3	6,40±1,50 ^c
Media	6,7	1,7	5,0	11,7	11,7	23,4	16,7	11,7	6,7	5,0	4,90±2,25

Se examinaron un total de 60 cepas (15 en cada tipo de muestra). Los números medios de resistencias por cepa que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

La resistencia al ácido nalidíxico (85,0% de las cepas), ampicilina (75,0%), ciprofloxacina (73,3%) y tetraciclina (61,7%) fue el hallazgo más común, seguido por la resistencia a amoxicilina-ácido clavulánico y sulfametoxazol-trimetoprim (45%). Las cepas aisladas de carne de pollo orgánica mostraron los menores valores de resistencia a estos cuatro compuestos (diferencias significativas para el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina). Se obtuvo una baja prevalencia de resistencia (entre el 0,0% y el 10,0% de las cepas) en el caso de la fosfomicina, piperacilina-tazobactam y cefotaxime (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Porcentaje de pruebas positivas (resistencias).

Antimicrobiano	Tipo de muestra				Media
	Pollo convencional	Pollo orgánico	Pavo convencional	Codorniz convencional	
GEN	40,0 ^a _{ab}	0,0 ^b _a	13,3 ^{bc} _{ab}	33,3 ^{ac} _{ab}	21,7 _{ab}
AMP	100,0 ^a _c	53,3 ^b _b	80,0 ^{ab} _{cd}	86,7 ^{ab} _{cd}	75,0 _{cd}
AMC	73,3 ^a _{bc}	20,0 ^b _{ab}	53,3 ^{ab} _{ac}	33,3 ^{ab} _{ab}	45,0 _{ef}
TZP	13,3 ^a _{ae}	13,3 ^a _{ab}	6,7 ^a _{be}	0,0 ^a _e	8,3 _a
CTX	0,0 ^a _e	26,7 ^a _{ab}	6,7 ^a _{be}	6,7 ^a _{ae}	10,0 _a
SXT	33,3 ^{ab} _{ab}	6,7 ^a _{ac}	60,0 ^{bc} _{cf}	80,0 ^c _{cd}	45,0 _{ef}
C	20,0 ^{ab} _{ae}	6,7 ^a _{ac}	40,0 ^{ab} _{ace}	46,6 ^b _{bc}	28,3 _{bf}
TE	40,0 ^a _{ab}	46,7 ^a _b	66,7 ^{ab} _c	93,3 ^b _d	61,7 _{ce}
NA	100 ^a _c	40,0 ^b _{bc}	100 ^a _d	100 ^a _d	85,0 _d
CIP	73,3 ^a _{bc}	26,7 ^b _{ab}	100 ^a _d	93,3 ^a _d	73,3 _{cd}
FOS	0,0 _e	0,0 _a	0,0 _b	0,0 _e	0,0 _g
F	26,7 ^{ab} _{ae}	13,3 ^a _{ab}	20,0 ^a _{abf}	66,7 ^b _{cd}	31,7 _{bf}
Media	43,3 ^a	21,1 ^b	45,6 ^a	53,3 ^a	40,8

Gentamicina (GEN; 10 µg), ampicilina (AMP; 10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30 µg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), cloranfenicol (C; 30 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), fosfomicina (FOS; 200 µg) y nitrofurantoina (F; 300 µg). Los valores medios en la misma fila que no comparten ninguna letra (superíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$). Los valores medios en la misma columna que no comparten ninguna letra (subíndice) son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Comparación de métodos para determinar la susceptibilidad a antibióticos de *E. coli*

Se examinaron sesenta cepas de *E. coli* frente a nueve antimicrobianos (gentamicina, amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefotaxime, sulfametoxazol-trimetoprim, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, fosfomicina y nitrofurantoina) usando tanto el método convencional de difusión por disco como el método miniaturizado. La Tabla IV.3 muestra la sensibilidad, especificidad y eficiencia del sistema miniaturizado “Sensi Test

Gram-negative”, su valor predictivo para una prueba positiva y negativa, respectivamente, y el coeficiente kappa (concordancia). El método de difusión por disco se empleó como método de referencia. La sensibilidad media del método “*Sensi test Gram negative*” fue 71,52%. Se observaron valores bajos ($\leq 50\%$) de sensibilidad para amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefotaxime, fosfomicina y nitrofurantoina. La especificidad media (capacidad para identificar las cepas susceptibles) fue del 97,60%. La capacidad del sistema miniaturizado para detectar la susceptibilidad a antibióticos fue del 100% para la amoxicilina-ácido clavulánico, piperacilina-tazobactam, cefotaxime, sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina y fosfomicina. La gentamicina (97,89%), ácido nalidíxico (90%) y nitrofurantoina (86%) mostraron una sensibilidad también elevada. La eficiencia media del sistema miniaturizado fue del 89,63%, con los valores más bajos observados en el caso de los compuestos amoxicilina-ácido clavulánico (81,67%), ciprofloxacina (73,33%) y nitrofurantoina (76,67%). El valor predictivo para los tests positivos fue elevado ($\geq 90\%$) para todos los antimicrobianos con la excepción de la nitrofurantoina (30%). El valor predictivo para los tests negativos osciló entre el 52,94% (ciprofloxacina) y el 98,30% (cefotaxime y fosfomicina). Los valores kappa oscilaron entre el 0,16 (nitrofurantoina) y el 0,97 (sulfametoxazol-trimetoprim), con un valor medio de 0,74.

Tabla IV.3. Evaluación del sistema miniaturizado (*Sensi Test Gram-negative*) para la determinación de la susceptibilidad a antibióticos de las cepas de *E. coli*.

	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Eficiencia (%)	Valor predictivo (%)		Coeficiente kappa
				pruebas positivas	pruebas negativas	
ANTIMICROBIANO						
GEN	69,23	97,87	91,67	90,00	92,00	0,73
AMC	31,25	100	81,67	100	80,00	0,40
TZP	25,00	100	95,00	100	94,92	0,39
CTX	50,00	100	98,33	100	98,30	0,66
SXT	96,15	100	98,33	100	97,14	0,97
NA	94,00	90,00	93,33	97,92	75,00	0,78
CIP	61,90	100	73,33	100	52,94	0,49
FOS	50,00	100	98,33	100	98,30	0,66
F	30,00	86,00	76,67	30,00	86,00	0,16
Todos los antibióticos	71,52	97,60	89,63	92,91	88,62	0,74

Gentamicina (GEN; 10 µg), amoxicilina-ácido clavulánico (AMC; 30 µg), piperacilina-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfametoxazol-trimetoprim (SXT; 25 µg), ácido nalidíxico (NA; 30 µg), ciprofloxacina (CIP; 5 µg), fosfomicina (FOS; 200 µg) y nitrofurantoina (F; 300 µg).

DISCUSIÓN

Recuentos microbianos

Los microorganismos psicrotrofos, predominantes en la carne refrigerada de ave, son habitualmente empleados para conocer la verdadera carga microbiológica de las canales a la vez que para proporcionar una estimación de la calidad higiénica de la carne (Álvarez-Astorga *et al.*, 2002). Desde un punto de vista legislativo, no hay criterios microbiológicos establecidos específicamente para carne de ave por lo que respecta los recuentos de microorganismos psicrotrofos. El Reglamento (EC) 2073/2005 hace referencia a los niveles de recuentos de microorganismos totales en carne picada y preparados de carne, que debe estar entre 5,70 y 6,70 \log_{10} ufc/g. Estos valores son similares a los de los niveles orientativos establecidos por Pascual-Anderson (1992) en España (5 \log_{10} ufc/g). Los resultados del presente estudio (de $4,87 \pm 0,83$ a $6,01 \pm 0,38$ \log_{10} ufc/cm²) encajan en los criterios anteriormente mencionados y son similares a los observados con anterioridad en carnes de pollo y pavo (Colmegna *et al.*, 2009; Guevara-Franco *et al.*, 2010). Si bien muchos artículos recogen el nivel de contaminación en carne de pollo y pavo en establecimientos de venta al público en diferentes partes del mundo, hay muy poca información publicada en relación con la calidad microbiológica de la carne de codorniz. En un estudio llevado a cabo con carne de codorniz de caza, El-Dengawy y Nassar (2001) observaron niveles de psicrotrofos de 3,60 \log_{10} ufc/g, un valor inferior que los recuentos obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Los recuentos de coliformes fecales en el presente estudio (entre $1,71 \pm 0,29$ y $2,95 \pm 0,48$ \log_{10} ufc/cm²) son similares a los niveles de coliformes encontrados por otros autores en canales de ave (Capita *et al.*, 2002; Colmegna *et al.*, 2009; El-Dengawy y Nassar, 2001; Fliss *et al.*, 1991; Izat *et al.*, 1989; Mead *et al.*, 1993). Debe señalarse, no obstante, que la mayoría de los autores consultados usan una temperatura de incubación inferior (35-37° C; coliformes totales) que la empleada en el presente trabajo (44° C \pm 1° C; coliformes fecales).

No se obtuvieron diferencias sustanciales (aunque en algunos casos fueron significativas) entre tipos de muestras por lo que respecta a los niveles de microorganismos psicrotrofos o de coliformes. Este hallazgo no es coincidente con los resultados de Miranda

et al. (2008), quienes pusieron de manifiesto que los recuentos microbianos son diferentes dependiendo del tipo de sistema de producción animal considerado. Así, estos autores observaron que los recuentos eran superiores en carne de pavo convencional que en carne de pollo (orgánica o convencional), cuyos procedimientos de manejo implican menor uso de antimicrobianos que en cría convencional de pavo.

E. coli es un contaminante habitual de los alimentos de origen animal, como consecuencia de la presencia de estos microorganismos en el ambiente y en las heces. En el presente estudio, todas las muestras estaban contaminadas con *E. coli*. Estos resultados están en consonancia con los de Soufi *et al.* (2011), que recuperaron *E. coli* a partir de todas las muestras de ave examinadas en Túnez. De manera similar, en trabajos llevados a cabo previamente por nuestro grupo de investigación se ha observado una prevalencia del 93,3% en canales de pollo en España (Capita *et al.*, 2002). Por otro lado, una prevalencia de *E. coli* sustancialmente inferior fue obtenida por Schroeder *et al.* (2003) en carne adquirida en establecimientos comerciales de los EE.UU.: 39% en canales de pollo y 12% en pechugas de pavo. La prevalencia de este microorganismo encontrada por otros autores ha sido 67% en muestras de ave (Bülte y Reuter, 1989) y 74,5% en carne picada (Vorster *et al.*, 1994).

Resistencia a antibióticos

Como se ha comentado con anterioridad, hay una preocupación creciente en relación con el riesgo que supone para la salud humana la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en animales de abasto y en alimentos de origen animal. Los alimentos contaminados con bacterias resistentes a antibióticos (incluso las no patógenas) suponen un problema en el ámbito de la Salud Pública, pues existe la posibilidad de que los genes que codifican resistencia a antibióticos estén presentes en elementos genéticos móviles que pueden transferirse a bacterias de importancia en medicina humana.

La determinación de la susceptibilidad a antibióticos mediante la técnica de difusión por disco indicó que la mayoría (91,6%) de las cepas de *E. coli* eran multi-resistentes (resistentes a dos o más antimicrobianos). En este sentido, estudios publicados con anterioridad han puesto de manifiesto que la mayoría de las cepas de *E. coli* aisladas de carne de mamíferos y aves son multi-resistentes (Jasson *et al.*, 2009; Miranda *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2008).

En el presente estudio, las cepas de *E. coli* mostraron una prevalencia considerable de resistencia a ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, amoxicilina-ácido clavulánico y sulfametoxazol-trimetoprim, hecho que indica que los aislamientos de *E. coli* de carne de ave podrían ser un reservorio de resistencia a antibióticos. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de varios estudios previos, que ponen de manifiesto que la resistencia a tetraciclina, penicilinas, quinolonas y sulfamidas es común en cepas bacterianas aisladas de las aves (Jasson *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2010; Miranda *et al.*, 2008; Schroeder *et al.*, 2003, 2004; Song *et al.*, 2008; Soufi *et al.*, 2011; Van *et al.*, 2008). Los compuestos señalados se encuentran también entre los principales antibióticos a los que las cepas de *E. coli* aisladas de infecciones humanas y de animales productores de alimentos en España son resistentes (Oteo *et al.*, 2002, 2005; Sáenz *et al.*, 2001).

La elevada prevalencia de resistencia a la ampicilina, tetraciclina y ciprofloxacina, compuesto estrechamente relacionado con la enrofloxacin, observada en este estudio podría ser debido al hecho de que durante los últimos años estos antimicrobianos han sido comúnmente usados como agentes profilácticos y terapéuticos en animales productores de alimentos en España. El uso de compuestos antimicrobianos en animales de granja ejerce una presión selectiva que favorece la propagación de bacterias resistentes a antibióticos (Capita y Alonso-Calleja, 2013).

Un hecho destacable fueron las elevadas tasas de resistencia observadas en las cepas de *E. coli* para el ácido nalidíxico (85,0%) y la ciprofloxacina (73,3%). Las fluoroquinolonas son antibióticos de gran importancia para el tratamiento de las infecciones graves por *E. coli* en seres humanos, de forma que es especialmente importante la monitorización continuada para detectar la emergencia de fenotipos resistentes a fluoroquinolonas (Van *et al.*, 2008). En España, la resistencia de *E. coli* de origen clínico humano a las fluoroquinolonas ha sido escasa durante años, hasta que el uso de estos compuestos aumentó a partir de 1990. En el momento actual, la resistencia a la ciprofloxacina en cepas de *E. coli* de origen humano excede el 20%, encontrándose entre las resistencias más frecuentes en Europa (Oteo *et al.*, 2005). La resistencia de *E. coli* a la ciprofloxacina es también frecuente en los animales productores de alimentos. Sáenz *et al.* (2001) observaron mayores porcentaje de resistencia a la ciprofloxacina en cepas de *E. coli* de heces de pollos broiler (38%) que en heces de cerdo (3%), mascotas, ganado vacuno y caballos (0%). Estos autores señalan que la

elevada prevalencia de *E. coli* resistente a ciprofloxacina en pollos broiler es un reflejo de un mayor uso de quinolonas en pollos que en cerdos u otros animales. Las cefalosporinas son los antimicrobianos de primera elección para tratar las infecciones bacterianas humanas (Lei *et al.*, 2010). El bajo porcentaje de cepas resistentes a este compuesto observado en el presente estudio es un resultado satisfactorio.

Nuestros resultados ponen de manifiesto claramente que *E. coli* es un microorganismo muy prevalente en carne de ave, tanto procedente de sistemas de producción orgánicos como convencionales. Sin embargo, las tasas de resistencia a antimicrobianos varían de forma importante entre tipos de sistemas de producción. Las cepas de *E. coli* procedentes de pollos de cría convencional, pavos y codornices presentaron una mayor prevalencia de resistencia a antibióticos que las cepas procedentes de animales de producción orgánica. Puesto que los antimicrobianos son compuestos de amplio uso en los sistemas de producción intensiva (Capita *et al.*, 2007), no es en absoluto sorprendente la elevada tasa de resistencias a estos compuestos obtenida en cepas de *E. coli* procedentes de las granjas de producción convencional. Sin embargo, y a pesar de lo señalado, es sorprendente la elevada prevalencia de cepas de *E. coli* multi-resistentes observada en carne de ave convencional en este estudio, teniendo en cuenta que no todos los antimicrobianos a los que las cepas de *E. coli* fueron resistentes se emplean en producción de carne de ave intensiva en España. Recientemente, diferentes fenotipos de multi-resistencia se han asociado con grandes plásmidos transferibles, los cuales pueden portar elementos móviles de ADN (por ejemplo integrones) que a menudo contienen genes de resistencia a antibióticos que pueden transferirse y expresarse de forma conjunta en una nueva bacteria. Así, la resistencia a antibióticos no usados de forma rutinaria en medicina tiene implicaciones potenciales para la salud humana a través de la co-selección de resistencia a antibióticos de elección (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Schroeder *et al.*, 2004). Los fenómenos de co-selección son de gran relevancia, ya que contribuyen a la persistencia masiva de cepas multi-resistentes (Martins da Costa *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que los clones resistentes a antibióticos son estables y capaces de persistir en las explotaciones después de varias rotaciones, incluso si no ha habido presión selectiva en la granja durante largos periodos de tiempo (Song *et al.*, 2008). Así, se ha sugerido que la tasa de resistencia a antimicrobianos en una explotación no está directamente relacionada con las cantidades de antimicrobianos usadas

(Luangtongkum *et al.*, 2006). Recientemente, Martins da Costa *et al.* (2011) estudiaron el impacto del uso de antimicrobianos en pollos broiler sobre la prevalencia de resistencia a antibióticos en *E. coli*, encontrando que el empleo de antimicrobianos en pienso (enrofloxacina, gentamicina o amoxicilina) provocaba la aparición de nuevos fenotipos de resistencia que continuaban existiendo una vez finalizado el periodo de exposición a los compuestos. Según estos autores, el cambio en el perfil de resistencia podría explicarse por la gran capacidad de *E. coli* para intercambiar genes de resistencia, y podría también ser debido a cambios en la estructura de la comunidad (proliferación selectiva de fenotipos no detectados previamente).

Smith *et al.* (2007) encontraron también que la exposición sucesiva a antimicrobianos creaba una resistencia estable, de forma que las cepas resistentes pueden competir con las cepas susceptibles incluso en la ausencia de los efectos selectivos de los antimicrobianos. Se ha puesto de manifiesto también que aplicaciones sucesivas de antimicrobianos pueden tener un efecto acumulativo, aumentando la prevalencia de cepas multi-resistentes y aumentando su persistencia con cada aplicación sucesiva (Martins da Costa *et al.*, 2011). Esta hipótesis está sustentada en el hecho de que en este estudio se han encontrado cepas de *E. coli* resistentes al cloranfenicol y a la furazolidona, a pesar de que estos compuestos no se emplean en producción animal en España (Anexo IV de la Directiva del Consejo 2377/90). Además, ninguno de los aislamientos resistentes mostró resistencia única al cloranfenicol o a la nitrofurantoina, hecho que sugiere una co-selección debida al uso de alguno de los antimicrobianos (ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina) que estaban generalmente asociados con el cloranfenicol o la nitrofurantoina en los patrones de resistencia observados.

La relativamente elevada prevalencia de resistencia a ampicilina, tetraciclina y quinolonas observada en las cepas de *E. coli* procedentes de aves de cría orgánica en el presente estudio es un resultado sorprendente. Una posible explicación a este hecho radica en que, tal y como se ha indicado en los párrafos precedentes, los patrones de multi-resistencia pueden encontrarse incluso en ausencia de presión selectiva (Martins da Costa *et al.*, 2011). Teniendo en cuenta que estos compuestos (ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina) se han usado en las granjas de pollo en España como agentes terapéuticos durante largos periodos de tiempo (Capita *et al.*, 2007), es posible que *E. coli* haya

evolucionado hasta adquirir resistencia a estos compuestos, permitiendo la amplia distribución de cepas resistentes en reservorios animales independientemente del tipo de sistema productivo. Según Apajalahti *et al.* (2004), la dieta y el ambiente pueden modificar la microbiota de las aves directamente, aportando microorganismos, o indirectamente al modificar los mecanismos de defensa de las aves. Una prevalencia considerable de cepas resistentes a antibióticos en las bacterias procedentes de sistemas de producción orgánica ha sido encontrada también por otros autores (Cui *et al.* 2005; Luangtongkum *et al.*, 2006).

Comparación de métodos para determinar la susceptibilidad a antibióticos de *E. coli*

Los sistemas disponibles comercialmente para determinar la susceptibilidad a antimicrobianos son interesantes para el trabajo rutinario de laboratorio, al permitir monitorizar los patrones de resistencia a antibióticos con mayor rapidez. Dada la importancia de *E. coli* como indicador de resistencia a antibióticos, es deseable contar con sistemas que permitan la detección rápida y precisa de las resistencias a antimicrobianos en este microorganismo. El presente trabajo representa el primer estudio comparativo entre el método convencional de difusión por disco y el sistema miniaturizado “*Sensi Test Gram-negative*” para la determinación de los patrones de resistencia a antibióticos de aislamientos de *E. coli* de carne de ave.

Puesto que el verdadero carácter de la cepa (resistente o susceptible) era desconocido, la evaluación del sistema miniaturizado se llevó a cabo comparando el funcionamiento del método comercial con el del método convencional de difusión por disco.

El coeficiente kappa en el presente estudio osciló entre 0,16 (nitrofurantoína) y 0,97 (sulfametoxazol-trimetoprim). Un valor de 1 indica una concordancia perfecta, mientras que un valor de 0 pone de manifiesto ausencia de concordancia o una concordancia que podría explicarse únicamente por azar. El coeficiente kappa es un parámetro útil cuando se compara una prueba nueva con una prueba estándar cuando no hay información disponible sobre la sensibilidad y especificidad del test clásico (Capita *et al.*, 2001). Según escalas comúnmente aceptadas (Landis y Koch, 1977), el método convencional de difusión por disco y el sistema miniaturizado disponible comercialmente Sensi Test mostraron una concordancia casi perfecta ($\text{kappa} > 0,80$) en el caso de sulfametoxazol-trimetoprim (coeficiente kappa de 0,97). La concordancia fue sustancial (coeficiente kappa de 0,61 a

0,80) para la gentamicina (kappa 0,73), fosfomicina (kappa 0,66), cefotaxime (kappa 0,66) y ácido nalidíxico (kappa 0,78). Para el resto de los antimicrobianos se obtuvo un coeficiente kappa moderado (de 0,41 a 0,60; amoxicilina-ácido clavulánico, ciprofloxacina), medio (de 0,21 a 0,40; piperacilina-tazobactam) o reducido (de 0,01 a 0,20; nitrofurantoina). De acuerdo a la escala señalada, la concordancia media obtenida entre el método convencional de difusión por disco y el método miniaturizado fue sustancial (coeficiente kappa de 0,74).

La mayoría de las discrepancias observadas entre los dos métodos fueron debidas a aislamientos resistentes según el método de difusión por disco pero susceptibles en base al método miniaturizado (falsos negativos). Esto ocurrió para la gentamicina (4 cepas), amoxicilina-ácido clavulánico (11), piperacilina-tazobactam (3), fosfomicina (1), nitrofurantoina (7), cefotaxime (1), ácido nalidíxico (3), ciprofloxacina (16) y sulfametoxazol-trimetoprim (1). Por otro lado, se detectaron falsos positivos (resistencia detectada usando el sistema miniaturizado pero no con método el convencional) solo para la gentamicina (una cepa), ácido nalidíxico (7 cepas) y nitrofurantoina (una cepa). De hecho, el método comercializado puede subestimar la resistencia a varios antimicrobianos dada su relativamente baja sensibilidad (Tabla IV.3). Teniendo en cuenta el hecho de que es más importante la capacidad de un método de antibiografía para identificar la resistencia a un compuesto que para identificar la susceptibilidad (Luber *et al.*, 2003), los resultados del presente estudio sugieren que el método “*Sensi Test Gram-negative*” puede ser poco fiable para predecir la resistencia a varios antimicrobianos en aislamientos de *E. coli* de carne de ave.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. y García-Fernández, C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science* **62**, 45-50.
- Apajalahti, J., Kettunen, A. y Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to chicken. *World's Poultry Science Journal* **60**, 223-232.
- Bülte M. y Reuter G. (1989). Results of a collaborative study using the fluorogenic MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) assay for detection of *Escherichia coli* in meat and meat products. *Archiv fur Lebensmittelhygiene* **40**, 121-144.
- Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **53**, 11-48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C. y Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1366-1375.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Arias, M. T., Moreno, B. y García-Fernández, M. C. (2002). Methods to detect the occurrence of various indicator bacteria on the surface of retail poultry in Spain. *Journal of Food Science* **67** (2), 765-771.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. y García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and evaluation of a cultural immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology* **65** (1/2), 75-82.
- Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J. D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E.F. y Salvat, G. (2005). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux* **56**, 13-16.
- CLSI (2008). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
- Colmegna, S., Invernizzi, A., Mascher, A. L., Corsale, E., Ferrazzi, V. y Grilli, G. (2009). Microbiological characteristics of poultry meats-results of inspections carried out in the province of Milano, Italy. *Italian Journal of Animal Science* **8**, 765-770.
- Cui, S., Ge, B., Zheng, J. y Jianghong, M. (2005). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens in Maryland retail stores. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 4108-4111.
- El-Dengawy, R. A. y Nassar, A. M. (2001). Investigation on the nutritive value and microbiological quality of wild carcasses. *Food/Nahrung* **45** (1), 50-54.

- FAO (2011). Faostat: Food Balance Sheets. Internet site: <http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor>.
- Fliss I., Simard R. E. y Ettriki A. (1991). Microbiological quality of different fresh meat species in tunisian slaughterhouses and markets. *Journal of Food Protection* **54**, 773-777.
- Guevara-Franco, J. A., Alonso-Calleja, C. y Capita, R. (2010). Aminopeptidase activity by spoilage bacteria and its relationship to microbial load and sensory attributes of poultry legs during aerobic cold storage. *Journal of Food Protection* **73** (2), 322-326.
- Izat A. L., Colberg M., Driggers C. D. y Thomas R. A. (1989). Effects of sampling method and feed withdrawal period on recovery of microorganisms from poultry carcasses. *Journal of Food Protection* **52**, 480-483.
- Jasson, V., Sampers, I., Botteldoorn, N., López-Gálvez, F., Baert, L., Denayer, S., Rajkovic, A., Habib, I., De Zutter, L., Debevere, J. y Uyttendaele, M. (2009). Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology* **135**, 248-253.
- Landis, J. R. y Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **33** (1), 159-174.
- Lei, T., Tian, W., He, L., Huang, X.-H., Sun, Y.-X., Deng, Y.-T., Sun, Y., Lv, D.-H., Wu, C.-M., Huang, L.-Z., Shen, J.-Z. y Liu, J.-H. (2010). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary Microbiology* **146**, 85-89.
- Luangtongkum, T., Morishita, T. Y., Ison, A. J., Huang, S., McDermott, P. F. y Zhang, Q. (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Applied and Environmental Microbiology* **72** (5), 3600-3607.
- Luber, P., Bartelt, E., Genschow, E., Wagner, J. y Hahn, H. (2003). Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology* **41** (3), 1062-108.
- Martins da Costa, P., Oliveira, M., Ramos, B. y Bernardo, F. (2011). The impact of antimicrobial use in broiler chickens on growth performance and on the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Livestock Science* **136**, 262-269.
- Mead G. C., Hudson W. R. y Hinton M. H. (1993). Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. *British Poultry Science* **34**, 497-503.
- Miranda, J. M., Guarddon, M., Vázquez, B. I., Gente, C. A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A. y Franco, C. M. (2008). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: a comparative study. *Food Control* **19**, 412-416.
- Nie, C. y Zepeda, L. (2011). Lifestyle segmentation of US food shoppers to examine organic and local food consumption. *Appetite* **57** (1), 28-37.

- Oteo, J., Lázaro, E., de Abajo, F.J., Baquero, F., Campos, J. y Spanish members of EARSS (2005). Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerging Infectious Diseases* **11** (4), 546-553.
- Oteo, J., Campos, J., Baquero, F. y Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (2002). Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**, 945-952.
- Pascual-Anderson, M. R. (1992). Aves y caza, pp. 163-170. En: *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Díaz de Santos, Madrid.
- Sáenz, Y., Zaragaza, M., Briñas, L., Iantero, M., Ruiz-Larrea, F. y Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* **18**, 353-358.
- SCENIHR (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Accesible en: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf.
- Schroeder, C. M., White, D. G., Ge, B., Zhang, Y., McDermott, P. F., Ayers, S., Zhao, S. y Meng, J. (2003). Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 197-202.
- Schroeder, C. M., White, D. G. y Meng, J. (2004). Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiology* **21**, 249-255.
- Sjölund, M., Bengtsson, S., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Olsen, B. y Kahlmeter, G. (2009). Antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* of human and avian origin—a comparison of wild-type distributions. *Clinical Microbiology and Infection* **15**, 461-465.
- Smith, J. L., Drum, D. J. V., Dai, Y., Kim, J. M., Sánchez, S., Maurer, J. J., Hofacre, C. L. y Lee, M. D. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* **73** (5), 1404-1414.
- Song, L., Ning, Y.-B., Zhang, X.-Y., Sheng, Q.-C., Zhang, G.-C., Lin, S.-M., Wu, H.-T., Zhao, H., Gao, G. y Feng, Z.-W. (2008). Comparative research on serogroups distribution and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from poultry in different areas of China. *Agricultural Sciences in China* **7** (3), 381-386.
- Soonthornchaikul, N., Garelick, Jones, H., Jacobs, J., Ball, D. y Choudhury, M. (2006). Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated for organically- and intensively-reared chickens purchased from retail outlets. *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**, 125-130.
- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbasi, M. S., Ruiz, E., Zaragaza, M., Hassen, A. B., Hammami, S. y Torres, C. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology* **144**, 497-502.

- Van, T. T. H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T. y Coloe, P. J. (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* **124**, 217-223.
- Vorster, S. M., Greebe, R. P. y Nortjé, G. L. (1994). Incidence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in ground beef, broilers and processed meats in Pretoria, South Africa. *Journal of Food Protection* **57**, 305.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

PRIMERA. Los resultados de este trabajo sugieren que las estrategias implementadas en los últimos años en la Unión Europea para reducir la prevalencia de *Salmonella* en las manadas y en la carne de aves han sido efectivas. Sin embargo, la presencia en carne de pollo de venta al por menor de serotipos y fagotipos de *Salmonella* frecuentemente asociados con casos de salmonelosis humana constituye una amenaza para la Salud Pública. El aumento significativo en la prevalencia de resistencia a antibióticos producido entre 1993 y 2006 es también un motivo de preocupación.

SEGUNDA. Si bien todos los descontaminantes tuvieron un efecto bactericida y bacteriostático sobre la microbiota de la carne de ave, la exposición a dichos compuestos incrementó durante el almacenamiento la prevalencia de resistencia a antibióticos, respecto a las muestras no tratadas, en las poblaciones de *Escherichia coli* presentes de forma natural en la superficie de la carne. La capacidad de las cepas con resistencia intrínseca para multiplicarse a lo largo del tiempo a expensas de las cepas sensibles y la adquisición de genes de resistencia (favorecida probablemente por el estrés que suponen los tratamientos descontaminantes), podrían ser las causas de este aumento de la prevalencia de resistencia a antibióticos en la carne descontaminada.

TERCERA. La carga microbiana de la cáscara de huevos de mesa varió sustancialmente entre sistemas de producción, presentando los huevos procedentes de explotaciones domésticas los mayores porcentajes de muestras sucias, los mayores niveles de contaminación para la mayoría de los grupos microbianos y la mayor prevalencia de *E. coli*. La influencia del sistema de producción en el grado de contaminación fue poco marcada en el caso de la carne.

CUARTA. Se observó una relación entre resistencia a antibióticos y sistema de producción. Así, la prevalencia de resistencia a antibióticos fue mayor en la carne y en los huevos procedentes de aves de sistemas convencionales de alojamiento que en las de cría orgánica o doméstica. Estos hallazgos podrían ser consecuencia de un menor o nulo empleo de antibióticos en estos sistemas de producción. Se sugiere que, puesto que las bacterias resistentes que emergen como consecuencia del empleo de antibióticos perduran en los alimentos durante más tiempo que los residuos de antibióticos, la

monitorización de las bacterias resistentes en la carne o en los huevos podría ser una medida adecuada para detectar el uso de antibióticos en las explotaciones avícolas y poner de manifiesto su uso fraudulento en producción orgánica.

QUINTA. Se ha observado resistencia a algunos antibióticos cuyo empleo está prohibido desde hace años en producción animal. Este hecho sugiere la presencia de mecanismos de resistencia cruzada o co-resistencia y pone de manifiesto que los genes de resistencia a un compuesto pueden ser capaces de transmitirse y persistir incluso en ausencia de presión selectiva, perdurando en la microbiota de las aves durante largos periodos de tiempo.

SEXTA. En comparación con el método convencional de difusión por disco, el sistema miniaturizado “*Sensi Test Gram-negative*” es sencillo y puede proporcionar resultados en poco tiempo. Sin embargo, este sistema presenta algunas limitaciones en relación con el rango de compuestos antimicrobianos que pueden ser ensayados. Se ha observado una concordancia sustancial entre el método convencional de difusión por disco y el método miniaturizado a la hora de poner de manifiesto las resistencias a antibióticos de *E. coli*. Sin embargo, su limitada capacidad para detectar la resistencia de *E. coli* a varios antibióticos (elevado porcentaje de falsos negativos) podría limitar su uso rutinario con esta finalidad.

SÉPTIMA. Los elevados niveles de resistencia observados, incluyendo resistencia a compuestos de importancia clínica, sugieren que los aislamientos de *Salmonella* y *E. coli* procedentes de productos avícolas son reservorios de genes de resistencia a antibióticos, hecho que supone un riesgo potencial para los consumidores. Estos resultados enfatizan la necesidad de aplicar estrategias encaminadas a reducir la presencia de bacterias resistentes en los alimentos de origen avícola y minimizar así la probabilidad de transferencia horizontal de genes de resistencia a lo largo de la cadena alimentaria. Puesto que la contaminación fecal de la carne y de los huevos de ave es inevitable, deben destinarse esfuerzos para educar a los consumidores en prácticas correctas de higiene con el fin de reducir el riesgo asociado a la transmisión de resistencia a antibióticos a través de los alimentos, evitando el consumo de carne de ave y huevos poco cocinados, así como la contaminación cruzada.

ANEXO I. PUBLICACIONES

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.

Capita, R., Álvarez-Fernández, E., Fernández-Buelta, E., Manteca, J. y Alonso-Calleja, C. (2013). Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry. *Food Microbiology* **34** (1), 112-117.

Álvarez-Fernández, E., Domínguez-Rodríguez, J., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2012). Influence of housing systems on microbial load and antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from eggs produced for human consumption. *Journal of Food Protection* **75** (5), 847-853.

Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díaz-Vega, C., Capita, R. y Alonso-Calleja, C. (2013). Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food Control* **30** (1), 227-234.



Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006

Elena Álvarez-Fernández, Carlos Alonso-Calleja, Camino García-Fernández, Rosa Capita *

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 May 2011

Received in revised form 25 October 2011

Accepted 11 November 2011

Available online 20 November 2011

Keywords:

Salmonella enterica

Poultry

Prevalence

Antimicrobial resistance

Spain

ABSTRACT

A total of 226 chicken samples (carcasses, legs, wings, necks and breasts) were obtained (73 in 1993 and 153 in 2006) from 10 retail outlets in North-Western Spain and screened for the presence of *Salmonella*. Isolates were subjected to serotyping, phage typing (*Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium) and antimicrobial susceptibility testing (15 antimicrobials; disk diffusion method). *Salmonella* was detected in 40 (55%) samples in 1993 and 19 (12.4%) in 2006 ($P < 0.001$). The serotypes (*S. Enteritidis*, *Salmonella* Poona, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Newport and *S. Typhimurium*) and phage types (1, 4, 14b and 35 in the case of *S. Enteritidis* and 193 for *S. Typhimurium*) detected are among the main types responsible for human salmonellosis in Spain. All strains were multi-resistant (resistant to 3–13 antimicrobials). The average number of resistances per strain increased ($P < 0.05$) from 3.98 in 1993 to 5.00 in 2006. An increase in the incidence of resistance was observed between 1993 and 2006 for cephalothin ($P < 0.01$), enrofloxacin ($P < 0.001$) and tetracycline ($P < 0.01$). The decreases in the prevalence of *Salmonella* between 1993 and 2006 suggest that the mandatory measures introduced over the last decade in the European Union to reduce the incidence of *Salmonella* in poultry have apparently been successful. However, the increase in antibiotic resistance rates is of concern and constitutes a threat to public health. Because the data in this study demonstrated that chicken in North-Western Spain is a potential source of antibiotic-resistant *Salmonella* strains, the need of consumer education on good sanitary practices is highlighted.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Salmonella enterica is a leading cause of human gastroenteritis in both developed and developing countries, causing millions of human and animal illnesses and significant economic losses worldwide. In the European Union, the reported incidence of *Salmonella* infections in 2009 was 23.7 per 100,000 people, with a total of 108,614 confirmed cases, this being the second most often reported zoonotic disease in humans, following campylobacteriosis (EFSA, 2011). There are several routes for contracting salmonellosis, but the consumption of contaminated foods is by far the most frequent cause of human infections (Lestari et al., 2009). During 2009, *Salmonella* was responsible for 1722 outbreaks of food-based infection (31.0% of all reported food-borne outbreaks and 33.2% of all verified outbreaks) in the EU, remaining the most commonly recognized causative agent in the food-borne outbreaks reported. *S. enterica* serotype Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium were the predominant serotypes associated with these infections (59.6% and 15.7% of the outbreaks, respectively) (EFSA, 2011).

Industrial food animal production methods and slaughterhouse practices may increase the spread of *Salmonella* among food-producing animals. In primary production, conditions exist which facilitate the spread of bacteria, such as high density of animals. Moreover, in modern slaughterhouses the rapid rate of production keeps the animals in close proximity to each other throughout processing, leading the transfer of bacteria from carcass to carcass (Capita et al., 2007). Thus, foods of animal origin, especially poultry and meat, are the major vehicles for the transmission of human salmonellosis due to cross-contamination events or inadequate cooking (Capita et al., 2007). According to the 2009 RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) annual report, *Salmonella* is the most frequently notified micro-organism, notifications relating to poultry (approximately 70) and to red meat (50) being the commonest (European Commission, 2010). Taking into consideration the high prevalence of *Salmonella* on poultry, control programmes have been implemented in the EU in recent years for flocks of *Gallus gallus* (including breeder, layer and broiler flocks) (EFSA, 2011).

During the past few decades, there has been growing public health concern over the worldwide emergence of antibiotic-resistant strains of a number of pathogenic bacteria, including *Salmonella* (Capita and Alonso-Calleja, in press). Although most cases of human salmonellosis are self-limiting and typically resolved in five to seven days without antimicrobial treatment, antibiotic therapy (e.g. ciprofloxacin in

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

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

adults and ceftriaxone in children) may be necessary for severe cases, extra-intestinal disease or immune-compromised patients (Berrang et al., 2009). In this scenario, *Salmonella* strains that are resistant to antimicrobials are especially threatening because they may compromise the effective treatment of human salmonellosis. People infected with antibiotic-resistant strains are more likely to suffer an adverse health event such as prolonged illness, increased severity of illness, hospitalization or death than those infected with susceptible strains (Cook et al., 2009).

Monitoring of antimicrobial resistance is essential for providing information on the magnitude of, and trends in, resistance, and to plan and monitor the effect of targeted interventions. In the European Union, Member States are obliged to monitor and report antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Campylobacter* from animals and food (EFSA, 2010). However, limited information about the prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates from retail poultry is currently available in North-Western Spain, and it would appear that no reports have been drawn up that compare data obtained from the same establishments over several years. Hence, this study was conducted to: 1) determine the prevalence, serotypes and phage types of *Salmonella* on retail poultry in North-Western Spain, 2) investigate the resistance profiles of *Salmonella* isolates to antibiotics currently used in veterinary and human therapy and 3) compare the prevalence, the types and the antibiotic resistance profiles observed in 1993 and 2006.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

A total of 226 chicken samples, consisting of skin of carcasses and cuts (legs, wings, necks and breasts) from conventionally-reared poultry were analyzed in 1993 (73 samples) and in 2006 (153). Each sample proceeded from a different bird. Samples in both 1993 and 2006 were purchased from the same ten retail stores in the Province of León in North-Western Spain, and belonged to three different brands (each brand preceded from a different slaughterhouse). The number of samples taken in each retail outlet ranged from 6 to 8 in 1993 and from 14 to 16 in 2006. Samples were transported to the laboratory in individual bags in an ice chest, being stored at 3 ± 1 °C for no longer than 1 h before mixing with enrichment broth.

2.2. Isolation procedure

Poultry samples were analyzed for *Salmonella* according to the ISO-6579-1993 standards. Samples of skin (totalling 25 g) were homogenized in a Masticator (IUL, Barcelona, Spain) with 225 ml of buffered peptone water (Oxoid Ltd., Hampshire, England) for pre-enrichment. In the case of wings and necks each sample was constituted for two or more pieces in the same lot (package), in order to obtain 25 g of skin. After incubation at 37 °C for 24 h, 0.1 ml was transferred to 10 ml of selective Rappaport-Vassiliadis broth (Oxoid Ltd.) and incubated for 24 h at 42 °C. A loopful of broth culture was streaked on Rambach agar (Merck, Darmstadt, Germany), xylose lysine desoxycholate agar (XLD, Oxoid Ltd.) and Hektoen enteric agar (Oxoid Ltd.) and incubated at 37 °C for 24 to 48 h. Presumptive *Salmonella* colonies were identified on the basis of Gram stain, catalase reaction, oxidase reaction and oxidation/fermentation of glucose. Bacteria that were Gram negative, catalase positive, oxidase negative and capable of oxidation and fermentation of glucose were inoculated onto microtubes of API 20E strips (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. The bacteria were identified using the database API LAB Plus version 3.2.2. (bioMérieux). One *Salmonella* isolate from each positive sample was typed by means of the tests listed below.

Salmonella strains were kept frozen at -20 °C after re-suspension in tryptic soy broth (Oxoid Ltd.) (TSB) with 20% (v/v) glycerol. Serotyping, phage typing and assessment of antibiotic susceptibility tests were performed in 2006 for all strains.

2.3. Serotyping and phage typing

Assignment to serotypes and phage types (only *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* strains were phage typed) was carried out at the "Laboratorio Nacional de Referencia para *Salmonella* y *Shigella* de España" (LNRSE) at the Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain.

2.4. Assessment of antimicrobial susceptibility

Isolates were screened for susceptibility to a panel of 15 antimicrobials on Mueller-Hinton agar (Oxoid Ltd.) by the disk diffusion method, as described by the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2002; NCCLS, 2000). The following disks (Oxoid) were used: gentamicin (GEN; 10 µg), streptomycin (STR; 10 µg), neomycin (N; 10 µg), rifampicin (RD; 5 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), amoxicillin-clavulanic-acid (AMC; 30 µg), cephalothin (CF; 30 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), erythromycin (E; 15 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), enrofloxacin (ENR; 5 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), tetracycline (TE; 30 µg) and furazolidone (FR; 50 µg). The inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediate susceptibility and resistant according to the NCCLS guidelines. Isolates of intermediate susceptibility were counted together with the isolates that were resistant *stricto sensu* (Cardinale et al., 2005). *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as reference strains for antibiotic disk control. An isolate was defined as resistant if it was resistant to one or more of the agents tested, whereas isolates resistant to two or more antimicrobials were classified as multi-resistant (Capita et al., 2007).

2.5. Statistical analysis

The prevalence of *Salmonella* on poultry and the frequency of strains resistant to antibiotics were compared by means of the chi-square and the two-tailed Fisher's exact tests. The Student *t*-test was performed to compare the average number of antibiotics to which the strains were resistant. The tests were carried out using the Statistica® 6.0 software package (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, USA).

3. Results

3.1. Prevalence of *Salmonella*

Of the total of 226 samples analyzed in 1993 and 2006, 59 (22.7%) were positive for *Salmonella* spp. at a detection limit of one colony-forming unit to 25 g (1 cfu/25 g) of skin. Similar prevalence rates were found among all sample types in both 1993 and 2006. The percentage of samples with *Salmonella* detected significantly ($P < 0.001$) decreased from 1993 (40 out of 73; 55% of positive samples) to 2006 (19 out of 153; 12.4%).

3.2. Serotypes and phage types

Of the 40 *Salmonella* isolates in 1993, 28 (70.0%) were identified as *S. enterica* serovar Enteritidis and 12 (30.0%) as *Salmonella* Poona. Among the 19 samples positive for *Salmonella* in 2006, 14 (73.7%) were contaminated with *S. Enteritidis*, 2 (10.5%) with *Salmonella* Infantis, 2 (10.5%) with *Salmonella* Newport and 1 (5.3%) with *S. Typhimurium*. Four phage types (4 and 35 in 1993 and 1 and 14b in

2006) were identified among the *S. Enteritidis* isolates. The *S. Typhimurium* strain was assigned to the phage type 193.

3.3. Antimicrobial susceptibility

Antimicrobial susceptibility of 59 *S. enterica* strains (40 isolated in 1993 and 19 in 2006) from retail poultry samples was determined. Tables 1 and 2 summarize the resistance patterns to 15 antimicrobials of the strains isolated in 1993 (9 different patterns) and 2006 (13 patterns). The predominant pattern was resistant to RD/E/NA, which was shown by 8 strains in 1993 and 5 strains in 2006. All strains tested showed resistance to the above-mentioned antibiotics. There did not appear to be any association between antimicrobial resistance patterns and a particular serotype or phage type.

All strains exhibited multiple resistances to three or more antimicrobial drugs. The 40 *Salmonella* isolates from 1993 were resistant to 3 (25.0%), 4 (52.5%) or 5 (22.5%) antibiotics, while strains obtained in 2006 (19) showed resistance to 3 (26.3%), 4 (26.3%), 5 (10.5%), 6 (26.3%), 7 (5.3%), or even 13 (5.3%) different antibiotics (Fig. 1). The average number of antibiotics to which the strains were resistant was lower ($P<0.05$) in 1993 (3.98) than in 2006 (5.00). Of the serotypes identified in this study, *S. Enteritidis* showed the lowest average number of resistances per strain, in both 1993 (3.71) and 2006 (4.64). Data for other serotypes were 4.58 (*S. Poona*), 5.5 (*S. Infantis*), 6.5 (*S. Newport*) and 6.0 (*S. Typhimurium*).

The highest incidence of resistance ($P<0.001$) in 1993 and 2006 were found for rifampicin, erythromycin and nalidixic acid (100% of strains). Drug resistance was also found in 1993 for SXT (40%), N (30%) and STR (27.5%). In 2006, an intermediate incidence of resistance was observed against STR, N, CF, ENR and TE, with between 4 and 8 (from 21.1% to 42.1%) resistant strains. Some strains in 2006 showed resistance to AMC, AMP (10.5%), SXT, C and FR (5.3%) (Fig. 2). An increase in the incidence of resistance was observed between 1993 and 2006 for CF ($P<0.01$), ENR ($P<0.001$) and TE ($P<0.01$). The resistance to SXT fell ($P<0.01$) from 1993 to 2006.

4. Discussion

4.1. Prevalence of *Salmonella*

The prevalence of *Salmonella* in chicken products observed by other authors, using various chicken parts and different sample weights, varied between 0 and 100% (Foley et al., 2008; Waldroup, 1996), with generally lower contamination percentages in more developed countries (Dallal et al., 2010; Galanis et al., 2006). Rates of *Salmonella* contamination of poultry similar to those found in the present study (22.7%) were reported in South Africa (19% in whole chicken carcasses from retail outlets using the non-destructive rinse method; van Nierop et al., 2005), Morocco (20.83% in chicken

Table 1
Antibiotic resistant profiles of the 40 *Salmonella* isolates from poultry in 1993.

Serotype/phage type	Resistance profile	Number of strains
<i>S. Enteritidis</i> /4	RD/E/NA	8
<i>S. Enteritidis</i> /4	STR/RD/E/NA	5
<i>S. Enteritidis</i> /4	N/RD/E/NA	3
<i>S. Enteritidis</i> /4	RD/SXT/E/NA	7
<i>S. Enteritidis</i> /35	RD/SXT/E/NA	5
<i>S. Poona</i>	RD/E/NA	2
<i>S. Poona</i>	STR/RD/E/NA	1
<i>S. Poona</i>	STR/N/RD/E/NA	5
<i>S. Poona</i>	N/RD/SXT/E/NA	4

GEN (gentamicin; 10 µg), STR (streptomycin; 10 µg), N (neomycin; 10 µg), RD (rifampicin; 5 µg), AMP (ampicillin; 10 µg), AMC (amoxicillin-clavulanic acid; 30 µg), CF (cephalothin; 30 µg), SXT (sulfamethoxazole-trimethoprim; 25 µg), E (erythromycin; 15 µg), C (chloramphenicol; 30 µg), ENR (enrofloxacin; 5 µg), CIP (ciprofloxacin; 5 µg), NA (nalidixic acid; 30 µg), TE (tetracycline; 30 µg) and FR (furazolidone; 50 µg).

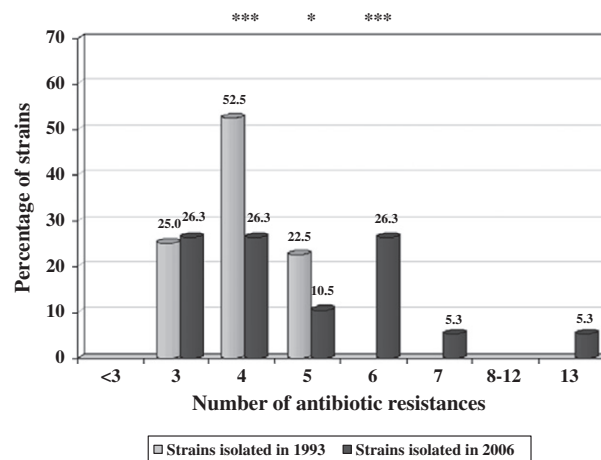
Table 2
Antibiotic resistant profiles of the 19 *Salmonella* isolates from poultry in 2006.

Serotype/phage type	Resistance profile	Number of strains
<i>S. Enteritidis</i> /1	RD/E/NA/TE	1
<i>S. Enteritidis</i> /1	STR/RD/E/NA/TE	1
<i>S. Enteritidis</i> /1	RD/AMP/E/NA	1
<i>S. Enteritidis</i> /1	RD/E/ENR/NA	3
<i>S. Enteritidis</i> /1	STR/N/RD/CF/E/NA	1
<i>S. Enteritidis</i> /1	STR/RD/E/ENR/NA/TE	1
<i>S. Enteritidis</i> /1	STR/N/RD/AMP/AMC/CF/SXT/E/C/ENR/NA/TE/FR	1
<i>S. Enteritidis</i> /14b	RD/E/NA	5
<i>S. Infantis</i>	STR/N/RD/E/NA	1
<i>S. Infantis</i>	STR/N/RD/E/ENR/NA	1
<i>S. Newport</i>	N/RD/CF/E/ENR/NA	1
<i>S. Newport</i>	STR/N/RD/CF/E/ENR/NA	1
<i>S. Typhimurium</i> /193	N/RD/AMC/CF/E/NA	1

For interpretation see Table 1.

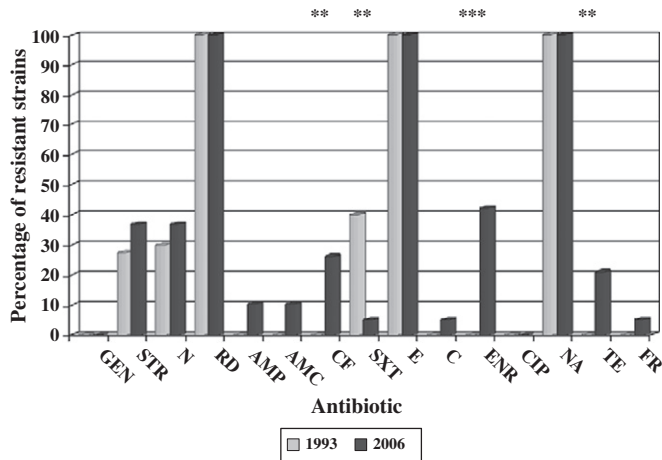
carcasses, chicken parts and giblets from retail outlets when analyzing 25 g of each sample; Abdellah et al., 2009), Louisiana (20.8–22.0%, conventionally and organically whole chicken carcasses from retail grocery stores, rinse method; Lestari et al., 2009), Quebec (21.2%, chicken carcasses from slaughterhouses, rinse method; Arsenalet al., 2007), Ontario (24%, turkey pieces from retail outlets, 25 g of skin; Cook et al., 2009) and Turkey (29.3%, poultry from delicatessens, 25 g of meat; Arslan and Eyi, 2010). In a similar way to what is reported here, Cook et al. (2009) did not observe significant differences in prevalence among varying types of turkey pieces (breasts, wings or legs) in Canada. In retail outlets from Southern India, Suresh et al. (2011) reported similar prevalences for *Salmonella* on various different chicken body parts (using sterile cotton swabs). On the other hand, Miranda et al. (2009) observed a higher prevalence of *Salmonella* on neck skin than on the rest of the broiler chicken samples (drumsticks, breasts and wings) collected in supermarkets and retail stores in Mexico, and Abdellah et al. (2009) noted in Morocco higher contamination rates among chicken parts than on chicken carcasses.

A decrease in the prevalence of *Salmonella* on poultry between 1993 and 2006 was observed in the present study. Taking into account that the incidence of *Salmonella* on poultry may be a reflection of the incidence of this micro-organism at the farms from which the chickens emanated (Rodrigo et al., 2006), the relatively low contamination rates found here could be due to a combination of various factors. Firstly, over recent years producers in Spain have been



*, $P<0.05$; ***, $P<0.001$

Fig. 1. Distribution of the *Salmonella* strains isolated from poultry according to the number of antibiotics to which they were resistant.



** , $P < 0.01$; *** , $P < 0.001$

Fig. 2. Percentage of *Salmonella* isolates resistant to each antibiotic tested.

vaccinating certain flocks (e.g. broiler-breeding and laying flocks) against *Salmonella*. Moreover, a compulsory slaughter and compensation policy was introduced in Spain, as well as in other European Union countries, for commercial breeding and laying flocks infected with *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* (Capita et al., 2007; EFSA, 2011). Legislation also requires traceability and surveillance of breeders and hatcheries, as well as details of bird movements. The introduction of mandatory systems based on Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) into EU poultry processing plants during the 1990s (Anonymous, 1993) may also have played an important part in the reduction of *Salmonella* on poultry in the last few years. Recent publications in the European Union also show a decrease in the prevalence of *Salmonella* on poultry as a consequence of recent mandatory Regulations (Hue et al., 2011).

4.2. Serotypes and phage types

Four out of the five serotypes detected in the present study (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, *S. Newport* and *S. Typhimurium*) are in the top 5 most frequent serotypes associated with human salmonellosis in Spain (Velasco et al., 2009) and the European Union in the last years (EFSA, 2011). In the USA, the Centers for Disease Control and Prevention have reported that *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* and *S. Newport*, in this order, are the most prevalent serotypes reported by public health laboratories (CDC, 2011). This fact confirms the view that many cases of human salmonellosis may have a poultry-borne origin, as previously suggested (Capita et al., 2007).

The serotypes of *Salmonella* detected in the present study are in agreement with data in the European Union, in which *S. Infantis* and *S. Enteritidis* were reported as the most prevalent serotypes in broiler carcasses in 2009, with *S. Typhimurium* reaching fourth place (EFSA, 2011). *S. Enteritidis* was the most common serotype identified in the research being presented here (70% of positive samples in 1993 and 73.7% in 2006). This serotype was also found to be the predominant serotype in poultry products in earlier survey studies, in which poultry meats and eggs have been identified as the major reservoir of *S. Enteritidis* (Cardinale et al., 2005; Dogru et al., 2010; Hernández et al., 2005). The high prevalence of *S. Enteritidis* in poultry reflects the presence of these organisms in the intestinal tract of live broilers, contaminating carcasses during slaughter and processing (Capita et al., 2007). This leads to an increase in the prevalence of infection in chicken and humans. Thus, data from Asia, Europe and Latin America have indicated that *S. Enteritidis* is the most common serovar among human isolates (EFSA, 2011; Galanis et al., 2006).

Mathematical models combining epidemiological data with poultry flocks biology suggest that *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* (responsible for pullorum disease and fowl typhoid, respectively) competitively excluded *S. Enteritidis* from poultry (Rabsch et al., 2000). During 1960s and 1970s control measures were implemented to decrease both avian infections. Therefore, it appears likely that *S. Enteritidis* filled an ecologic niche that was created by the decrease of *S. Gallinarum* and *S. Pullorum* in poultry (Foley et al., 2008).

S. Typhimurium strains have a greater ability to cause human salmonellosis than other serotypes (Sarwari et al., 2001). Although *S. Typhimurium* is widespread, strains from this serotype are frequently detected in poultry (Arslan and Eyi, 2010; Parveen et al., 2007; Yildirim et al., 2011). In Spain, *S. Typhimurium* was the second serotype, after *S. Enteritidis*, in its frequency of detection in human clinical isolates in 2000–2008 (Martínez et al., 2008).

Several researchers (Abdellah et al., 2009; Cetinkaya et al., 2008; Cook et al., 2009; Yildirim et al., 2011) have reported the isolation of *S. Infantis* and *S. Newport* from poultry. The isolation of *S. Poona* from chicken has been reported by some authors (Dione et al., 2009). Nevertheless, this serotype is more often associated with water than with food (Capita et al., 2007).

The phage types of *S. Enteritidis* (1, 4, 14b and 35) and *S. Typhimurium* (193) identified in the present research are in agreement with previous findings in poultry (Chung et al., 2004; Ellerbroek et al., 2010; Valdezate et al., 2007). These phage types are among those most frequently implicated in human salmonellosis both in Spain (Echeita et al., 2005a,b; Hernández et al., 2005) and worldwide (Anaraki et al., 2005; Gillespie et al., 2005).

4.3. Antimicrobial susceptibility

Salmonella strains were tested for susceptibility to 15 antimicrobial drugs of veterinary and human health significance. It is worthy of note that numerous strains in the present study showed resistance to a range of antimicrobial agents. The high incidence of the combination of resistance to rifampicin, erythromycin and nalidixic acid, observed in all the 59 tested strains, could be indicative of the presence of gene transfer systems, such as bacterial conjugative plasmids or transposable elements, carrying genes conferring resistance to these antimicrobials (Capita and Alonso-Calleja, in press).

The percentage of multi-resistant *S. enterica* strains observed in this study (100%) is far higher than those found in Southern Italy (2.3% of resistant strains; Nastasi et al., 2000). On the other hand, high percentages of resistant or multi-resistant strains, similar to those observed in the research being presented here, have been reported for poultry in Turkey (100%; Arslan and Eyi, 2010; Dogru et al., 2010; Yildirim et al., 2011), Spain (100%; Carramiñana et al., 2004), Brazil (100%; Dias de Oliveira et al., 2005), Nepal (100%; Shrestha et al., 2010), the USA (92%; Zhao et al., 2005), Mexico (85.4%; Miranda et al., 2009), China (80%; Yang et al., 2010), Morocco (75.43%; Abdellah et al., 2009) and Portugal (75%; Antunes et al., 2003). In a study recently performed in Korea, Hur et al. (2010) observed that all *Salmonella* isolates from poultry were resistant to at least one antimicrobial, and many (65.2%) of the strains were resistant to three or more drugs. These findings confirm that poultry is a major reservoir of multi-resistant *Salmonella*, and suggest it is difficult to achieve successful antimicrobial therapy for salmonellosis caused by strains of poultry origin.

It is known that antimicrobial use in food-producing animals selects for resistance in both pathogens and commensal bacteria (Capita and Alonso-Calleja, in press). Therefore, the high incidence of resistant or multi-resistant *Salmonella* isolates in the work presented here and in earlier studies may be due to the worldwide over-use of antimicrobials in different fields. In order to prevent the generation, selection and dissemination of antimicrobial resistances, Regulation (EC) No 1831/2003 prohibits the use of antimicrobials

within the EU as growth-promoters in animal husbandry. From January 2006 antibiotics may be used only therapeutically or prophylactically. The effect of this ban is as yet unknown (Capita and Alonso-Calleja, in press). Antibiotics usage for growth promotion and to increase the rate of weight gain is permitted in the USA, Canada and much of the rest of the world (Yildirim et al., 2011).

The large number of antibiotics to which the strains were resistant in the present study (it is noteworthy that one strain isolated in 2006 was resistant to 13 drugs) is consistent with the findings of other authors. Yang et al. (2010) reported that approximately 28% of chicken isolates were resistant to 9 or more antimicrobials. Parveen et al. (2007) detected resistance to eight antimicrobials in two *Salmonella* isolates from poultry. Shrestha et al. (2010) reported that high percentages of *Salmonella* isolates from poultry in Nepal were resistant to 5 (15.4%), 6 (69.2%), 7 (7.7%) and 8 (5.2%) antimicrobials. Pan et al. (2010) detected in China two *S. Pullorum* strains resistant to 12 antimicrobials. In Korea, Hur et al. (2010) reported a *S. Enteritidis* strain isolated from poultry resistant to 15 antimicrobials.

The average number of antibiotics to which the strains were resistant (3.98 in 1993 and 5.00 in 2006) is a result consistent with the figures from Logue et al. (2003), who found an average of resistance to 4 antimicrobials in *Salmonella* from poultry in the USA. The increase in antibiotic resistance observed in 2006 in comparison with 1993 is in accordance with surveillance data, which showed an increase in overall antimicrobial resistance among salmonellae from a range of 20% to 30% in the early 1990s to as high as 70% in some countries in the 2000s (Su et al., 2004).

The fact that *S. Typhimurium* is among the serotypes showing the highest average antimicrobial resistances in the present study is a result consistent with most surveys (Abdellah et al., 2009; Barton, 2000; Berrang et al., 2009; Capita et al., 2007; Hernández et al., 2005; Shrestha et al., 2010; Usera et al., 2002). This is an alarming information because, as previously indicated, *S. Typhimurium* causes more serious consequences on human health than most *Salmonella* serotypes. On the other hand, as demonstrated in Spain (Capita et al., 2007), England (Jones et al., 2002), Korea (Yang et al., 2002) and China (Yang et al., 2010), *Salmonella* serotype Enteritidis was less prone to developing resistances than other serotypes.

Ampicillin and chloramphenicol have been for decades the drugs of choice in the treatment of human salmonellosis. Because of increasing resistance to these antimicrobials, the use of fluoroquinolones (in adults) and extended spectrum cephalosporins (in children) has become common (Miranda et al., 2009). In the research being presented here, only two and one strains were resistant in 2006 to ampicillin and chloramphenicol, respectively. The low rate of resistance to chloramphenicol could be attributed to its non-use in animal production. Due to the toxicological hazard for human consumers (carcinogenicity and mutagenicity) provoked by chloramphenicol and nitrofurans (including furazolidone), a ban on their use in food-producing animals was imposed in the EU in the mid 1990s. Both antimicrobials are included in Annex IV of the Council Directive 2377/90, which establishes a zero tolerance for these drugs in all foodstuffs of animal origin. It should be pointed out, however, that despite the fact that these antimicrobials have not been used on Spanish poultry farms for years, cross-resistance or co-resistance mechanisms (Capita and Alonso-Calleja, in press) could be the cause of the resistance observed to both drugs in the present report and other research (van Duijkeren et al., 2003; Yildirim et al., 2011). It has long been reported that antibiotic usage alters the antibiotic resistance genes encoded by a microbial community (resistome), and the effects on antimicrobial resistome persist for decades after the cessation of antibiotic use (Sommer and Dantas, 2011). Thus, genes conferring resistance to chloramphenicol and nitrofurans are expected to persist in life stock microbiota after abolishment of the use of both antibiotics (Johnsen et al., 2011).

It is an issue for concern that the resistance observed for cephalothin has increased significantly over the period of time studied, from 0% of strains in 1993 to 26.3% in 2006. Isolates with decreased susceptibility to cephalosporins have been previously identified (Lestari et al., 2009).

The increase in resistance to tetracycline and enrofloxacin observed in the present study between 1993 and 2006 is not surprising because these drugs have been among the antibiotics most frequently used therapeutically on poultry farms in Spain (Capita et al., 2007). Fluoroquinolones were approved in numerous European countries from the 1980s onwards. In the decades following the licensing of these drugs, there has been an increasing prevalence of quinolone-resistant salmonellae, observed in clinical and poultry isolates both in Spain (Sáenz et al., 2001) and worldwide (Dias de Oliveira et al., 2005; Ellerbroek et al., 2010; Schroeter et al., 2004; Shrestha et al., 2010; Wilson, 2004). This fact is extremely worrisome, because, as indicated above, fluoroquinolones have long been considered a drug of choice to treat salmonellosis in human adults when necessary.

As in the present study, resistance to streptomycin, neomycin, erythromycin, tetracycline, amoxicillin–clavulanic acid, and sulfamides have also been frequently reported in a number of other studies on poultry products (Arslan and Eyi, 2010; Barton, 2000; Cardinale et al., 2005; Carramiñana et al., 2004; Dias de Oliveira et al., 2005; Hur et al., 2010; Parveen et al., 2007; Shrestha et al., 2010; Usera et al., 2002; Yildirim et al., 2011). Luckily, no isolates were identified that were resistant to gentamicin and ciprofloxacin, suggesting that these are potentially effective treatments for *Salmonella* infections. As in this current piece of work, no resistance was observed to these antimicrobials by Yildirim et al. (2011).

Results in the present work suggest that the strategies implemented in recent years in the EU for the control of *Salmonella* in avian flocks and poultry meat have been satisfactory. However, the presence on retail chicken of serotypes and phage types of *Salmonella* associated with human disease constitutes a threat to public health. The increase in the incidence of antibiotic resistance between 1993 and 2006 is also a matter for concern. These results suggest the risk of human salmonellosis if chicken is consumed under-cooked or cross-contamination during meal preparation occurs. The need to find strategies to minimize the risk of development and spread of antimicrobial resistance is highlighted.

Acknowledgments

This study has been supported by grants from the *Junta de Castilla y León* (Project 39/LE16/10) and the *Universidad de León* (Project ULE 2009-1). The authors would like to thank the *Laboratorio Nacional de Referencia para Salmonella y Shigella de España* (LNRSS, Majadahonda, Madrid, Spain) for the serotyping and phage typing of strains.

References

- Abdellah, C., Fouzia, R.F., Abdelkader, C., Rachida, S.B., Mouloud, Z., 2009. Prevalence and anti-microbial susceptibility of *Salmonella* isolates from chicken carcasses and giblets in Meknès, Morocco. *African Journal of Microbiology Research* 3, 215–219.
- Anaraki, S., Giraudon, I., Cathcart, S., 2005. Large outbreak of *Salmonella* Enteritidis in northeast London. *Eurosurveillance* 10 article 2. Available at: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2664> Date last accessed: May 2, 2011.
- Anonymous, 1993. Council Directive 93/43/EEC of 14 June 1993 on the hygiene of foodstuffs. *Official Journal of the European Union* 175, 1–11.
- Antunes, P., Reu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N., 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology* 82, 97–103.
- Arsenault, J., Letellier, A., Quessy, S., Boulianne, M., 2007. Prevalence and risk factors for *Salmonella* and *Campylobacter* spp. carcass contamination in broiler chickens slaughtered in Quebec. *Journal of Food Protection* 70, 1820–1828.
- Arslan, S., Eyi, A., 2010. Occurrence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* species in retail meat products. *Journal of Food Protection* 73, 1613–1617.
- Barton, M.D., 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research* 13, 279–299.

- Berrang, M.E., Bailey, J.C., Altekruze, S.F., Shaw, W.K., Patel, B.L., Mainersmann, R.J., Fedorka-Cray, P.J., 2009. Prevalence, serotype, and antimicrobial resistance of *Salmonella* on broiler carcasses postpock and postchill in 20 U.S. processing plants. *Journal of Food Protection* 72, 1610–1615.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., in press. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* doi:10.1080/10408398.2010.519837.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto, M., 2007. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1366–1375.
- Cardinale, E., Perrier Grosclaude, J.D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E.F., Salvat, G., 2005. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* 56, 13–16.
- Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I., Herrera, A., 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* 104, 133–139.
- CDC, 2011. Preliminary FoodNet Data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 states, 2008 Available on: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5813a2.htm?s_cid=mm5813a2_e2011 Date last accessed: May 4, 2011.
- Cetinkaya, F., Cibik, R., Soyutemiz, G.E., Ozakin, C., Kayali, R., Levent, B., 2008. *Shigella* and *Salmonella* contamination in various foodstuffs in Turkey. *Food Control* 19, 1059–1063.
- Chung, Y.-H., Know, Y.-I., Kim, S.-Y., Kim, S.-H., Lee, B.-K., Chang, Y.-H., 2004. Antimicrobial susceptibilities and epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis isolates in Korea by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Food Protection* 67, 264–270.
- CLSI, 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
- Cook, A., Reid-Smith, R., Irwin, R., McEwen, S.A., Valdivieso-García, A., Ribble, C., 2009. Antimicrobial resistance in *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* isolated from retail turkey meat from Southern Ontario, Canada. *Journal of Food Protection* 72, 473–481.
- Dallal, M.M.S., Doyle, M.P., Rezadehbash, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, S., Bakhtiari, R., Sharifiy, K., Taremi, M., Zali, M.R., Sharifi-Yazdi, M.K., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. *Food Control* 21, 388–392.
- Dias de Oliveira, S., Siqueira Flores, F., Ruschel dos Santos, L., Brandelli, A., 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology* 97, 297–305.
- Dione, M.M., Ieven, M., Garin, B., Marcotty, T., Geerts, S., 2009. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broiler farms, chicken carcasses, and street-vended restaurants in Casamance, Senegal. *Journal of Food Protection* 72, 2423–2427.
- Dogru, A.K., Ayaz, N.D., Gencay, Y.E., 2010. Serotype identification and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* spp. isolated from chicken carcasses. *Tropical Animal Health and Production* 42, 893–897.
- Echeita, A., Aladueña, A., González-Sanz, R., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, F., Arrollo, M., Gutiérrez, R., 2005a. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (I). *Boletín Epidemiológico Semanal* 13, 73–76.
- Echeita, A., Aladueña, A., González-Sanz, R., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, F., Arrollo, M., Gutiérrez, R., 2005b. Análisis de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas de muestras clínicas de origen humano en España. Años 2002 y 2003 (II). *Boletín Epidemiológico Semanal* 13, 85–88.
- EFSA, 2010. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* 8, 1658–1918 Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1658.pdf> Date last accessed: May 4, 2011.
- EFSA, 2011. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and foodborne outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9 (3), 2090–2477 Available at: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf> Date last accessed: May 4, 2011.
- Ellerbroek, L., Narapati, D., Phu Tai, N., Pooaran, N., Pinthong, R., Sirimalaisuwan, A., Tshering, P., Fries, R., Zessin, K.-H., Baumann, M., Schroeter, A., 2010. Antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from imported chicken carcasses in Bhutan and from pig carcasses in Vietnam. *Journal of Food Protection* 73, 376–379.
- European Commission, 2010. The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual Report 2009. EU Directorate General for Health and Consumers, Luxembourg. Available at: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2009_en.pdf. Date last accessed: May 4, 2011.
- Foley, S.L., Lynne, A.M., Nayak, R., 2008. *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science* 86 (E. Suppl.), E149–E162.
- Galanis, E., Lo Fo Wong, D., Patrick, M.E., Binsztein, N., Cieslik, A., Chalermchaiakit, T., Aidara-Kane, A., Ellis, A., Angulo, F.J., Wegener, H.C., 2006. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerging Infectious Diseases* 12, 381–388.
- Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Ward, L.R., Smith, H.R., 2005. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks? *Epidemiology and Infection* 133, 795–801.
- Hernández, T., Sierra, A., Rodríguez-Álvarez, C., Torres, A., Areal, M.P., Calvo, M., Arias, A., 2005. *Salmonella enterica* serotypes isolated from imported frozen chicken meat in the Canary Islands. *Journal of Food Protection* 68, 2702–2706.
- Hue, O., Le Bouquin, S., Lalande, F., Allain, V., Rouxel, S., Petetin, I., Quesne, S., Laisney, M.-J., Gloaguen, P.-Y., Picherot, M., Salvat, G., Bougeard, S., Chemaly, M., 2011. Prevalence of *Salmonella* spp. on broiler chicken carcasses and risk factors at the slaughterhouse in France in 2008. *Food Control* 22, 1158–1164.
- Hur, J., Kim, J.H., Park, J.H., Lee, Y.-J., Lee, J.H., 2010. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. *The Veterinary Journal* 189, 306–311.
- Johnsen, P.J., Townsend, J.P., Bohn, T., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., Nielsen, K.M., 2011. Retrospective evidence for a biological cost of vancomycin resistance determinants in the absence of glycopeptide selective pressures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66, 608–610.
- Jones, Y.E., Chappell, S., McLaren, I.M., Davies, R.H., Wray, C., 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals and their environment in England and Wales from 1988 to 1999. *Veterinary Record* 150, 649–654.
- Lestari, S.I., Han, F., Wang, F., Ge, B., 2009. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in conventional and organic chickens from Louisiana retail stores. *Journal of Food Protection* 72, 1165–1172.
- Logue, C.M., Sherwood, J.S., Olah, P.A., Elijah, L.M., Dockter, M.R., 2003. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *Journal of Applied Microbiology* 94, 16–24.
- Martínez, E.V., Varela, M.C., Cevallos, C., Hernández-Pezzi, G., Torres, A., Ordóñez, P., 2008. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004–2007 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal* 16, 241–252.
- Miranda, J.M., Mondragón, A.C., Martínez, B., Guarddon, M., Rodríguez, J.A., 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *Journal of Food Protection* 72, 966–971.
- Nastasi, A., Mamma, C., Cannova, L., 2000. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis*, southern Italy, 1990–1998. *Emerging Infectious Diseases* 6, 401–403.
- NCCLS, 2000. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard M2-A7. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
- Pan, Z.M., Geng, S.Z., Zhou, Y.Q., Liu, Z.Y., Fang, Q., Liu, B.B., Jiao, X.A., 2010. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* sp. isolated from domestic animals in eastern China. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 2290–2294.
- Parveen, S., Taabodi, M., Schwarz, J.G., Oscar, T.P., Harter-Dennis, J., White, D.G., 2007. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* recovered from processed poultry. *Journal of Food Protection* 70, 2466–2472.
- Rabsch, W., Hargis, B.M., Tsois, R.M., Kingsley, R.A., Hinz, K.-H., Tschäpe, H., Bäuml, A.J., 2000. Competitive exclusion of *Salmonella* Enteritidis by *Salmonella Gallinarum* in poultry. *Emerging Infectious Diseases* 6, 443–448.
- Rodrigo, S., Adesiyun, A., Asgarali, Z., Swanston, W., 2006. Occurrence of selected foodborne pathogens on poultry and poultry giblets from small retail processing operations in Trinidad. *Journal of Food Protection* 68, 1096–1105.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 353–358.
- Sarwari, A.R., Magder, L.S., Levine, P., McNamara, A.M., Knower, S., Armstrong, G.L., Etzel, R., Hollingsworth, J., Morris, J.G., 2001. Serotype distribution of *Salmonella* isolates from food animals after slaughter differs from that of isolates found in humans. *Journal of Infectious Diseases* 183, 1295–1299.
- Schroeter, A., Hoog, B., Helmuth, R., 2004. Resistance of *Salmonella* isolates in Germany. *Journal of Veterinary Medicine* 51, 389–392.
- Shrestha, A., Regmi, P., Dutta, R.K., Khanal, D.R., Aryal, S.R., Thakur, R.P., Karki, D., Singh, U.M., 2010. First report on antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry in Nepal. *Veterinary Microbiology* 144, 522–524.
- Sommer, M.O.A., Dantas, G., 2011. Antibiotics and the resistant microbiome. *Current Opinion in Microbiology* 14, 556–563.
- Su, L.H., Chiu, C.H., Chu, C., Ou, J.T., 2004. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* serotypes: a global challenge. *Clinical Infectious Diseases* 39, 546–551.
- Suresh, T., Hatha, A.A.M., Harsha, H.T., Lakshmanaperumalsamy, P., 2011. Prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore city of southern India. *Food Research International* 44, 823–825.
- Usera, M.A., Aladueña, A., González, R., De la Fuente, M., García-Peña, J., Frías, N., Echeita, M.A., 2002. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection* 65, 768–773.
- Valdezate, S., Arroyo, M., González-Sanz, R., Ramiro, R., Herrera-León, S., Usera, M.A., De la Fuente, M., Echeita, A., 2007. Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food human consumption in Spain. *Journal of Food Protection* 70, 2741–2748.
- van Duijkere, E., Wannet, W.J.B., Houwers, D.J., van Pelt, W., 2003. Antimicrobial susceptibilities of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 3574–3578.
- van Nierop, W., Duse, A.G., Marais, E., Aithma, N., Thothobolo, N., Kassel, M., Stewart, R., Potgieter, A., Fernandes, B., Galpin, J.S., Bloomfield, S.F., 2005. Contamination of chicken carcasses in Gauteng, South Africa, by *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter*. *International Journal of Food Microbiology* 99, 1–6.
- Velasco, L., Sobrino, L., García, M., Soler, P., Martínez, L., 2009. Infecciones por *Salmonella* no tifoidea de origen humano en España. *Sistema de Información Microbiológica*. Años 2000–2008. *Boletín Epidemiológico Semanal* 17, 193–204.
- Waldrop, A.L., 1996. Contamination of raw poultry with pathogens. *Worlds Poultry Science Journal* 52, 7–25 84, 87, 90, 93.
- Wilson, I.G., 2004. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. *Journal of Food Protection* 67, 1220–1225.

- Yang, S.J., Park, K.Y., Kim, S.H., No, K.M., Besser, T.E., Yoo, H.S., Lee, B.K., Park, Y.H., 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology* 86, 295–301.
- Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Xi, M., Sheng, M., Zhi, S., Meng, J., 2010. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food Microbiology* 141, 63–72.
- Yildirim, Y., Gonulalan, Z., Pamuk, S., Ertas, N., 2011. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp. on raw chicken carcasses. *Food Research International* 44, 725–728.
- Zhao, S., Fedorka-Cray, P.J., Friedman, S., McDermott, P.F., Walker, R.D., Qaiyumi, S., Foley, S.L., Hubert, S.K., Ayers, S., English, L., Dargatz, D.A., Salamone, B., White, D.G., 2005. Characterization of *Salmonella* Typhimurium of animal origin obtained from the national antimicrobial resistance monitoring system. *Foodborne Pathogens and Disease* 2, 169–181.



Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry

Rosa Capita*, Elena Álvarez-Fernández, Esther Fernández-Buelta, Jennifer Manteca, Carlos Alonso-Calleja

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 July 2012

Received in revised form

8 November 2012

Accepted 20 November 2012

Available online 5 December 2012

Keywords:

Antimicrobial resistance

Poultry decontaminants

Escherichia coli

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine the ability of various decontaminants to increase the prevalence of resistance to antibiotics in *Escherichia coli* populations on poultry. Chicken legs were dipped for 15 min into aqueous solutions (wt/vol) of trisodium phosphate (TSP; 12%), acidified sodium chlorite (ASC; 1200 ppm), ascorbic acid (AA; 2%) or citric acid (CA; 2%), or tap water (control). Samples were analyzed immediately after treatment (day 0) and after five days of storage at 7 ± 1 °C. A total of 250 *E. coli* isolates (50 from each group of samples; 25 on day 0 and 25 on day 5) were tested against twelve antibiotics of clinical significance by means of a standard disc-diffusion technique. A high prevalence of resistance to antibiotics was observed for *E. coli* strains from control samples, with three (6.0%) isolates sensitive, three (6.0%) resistant to one antibiotic and 44 (88.0%) isolates resistant to two or more antibiotics. Isolates from control samples had a lower prevalence of resistance than those from treated samples to ampicillin-sulbactam ($P < 0.01$, samples treated with TSP), amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.001$, ASC, AA and CA), cephalexin ($P < 0.05$, TSP), trimethoprim-sulphamethoxazole ($P < 0.05$, AA; $P < 0.01$, CA), tetracycline ($P < 0.01$, CA), ciprofloxacin ($P < 0.001$, ASC; $P < 0.05$, AA; $P < 0.01$, CA) and nitrofurantoin ($P < 0.01$, TSP). These results suggest that the chemical decontaminants tested could favor the emergence, selection and/or proliferation of antibiotic-resistant strains in microbial populations on poultry meat.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Red meat and poultry are vectors for pathogenic micro-organisms. In 2010, a total of 5262 food-borne outbreaks (43,473 cases) were reported in the European Union, with meat and poultry products being implicated in 20.2% of these (EFSA, 2012). In an attempt to overcome this risk, solutions of antimicrobials, such as trisodium phosphate (TSP), acidified sodium chlorite (ASC), or organic acids can be applied to meat and poultry during the carcass-dressing process. The effectiveness of decontaminants in reducing pathogenic and spoilage micro-organisms on foods of animal origin is well documented (Buncic and Sofos, 2012; Del Río et al., 2007a).

Decontamination procedures have been permitted for years in North America. However, within the European Union (EU) decontaminants are not permitted for treating red meat or poultry carcasses, neither parts nor viscera (Buncic and Sofos, 2012). In recent years, European authorities and scientists have expressed

concern with regard to the use of chemical treatments in meat and poultry facilities, owing to the possible selection of micro-organisms with reduced susceptibility to decontaminants when bacteria encounter sub-optimal concentrations of compounds (EFSA, 2008; SCHER/SCENIHR, 2008). It has been suggested that decontamination could allow preferential growth of bacteria having intrinsic or acquired tolerance, because of the removal of sensitive competitive micro-biota (Capita and Alonso-Calleja, 2013).

A relationship between tolerance to biocides and resistance to antibiotics has been suggested. Mechanisms contributing to biocide tolerance often relate to changes in the permeability of the cell membrane and to altered activities of membrane-associated efflux pumps, which are also involved in resistance to antibiotics (Sheridan et al., 2012). Thus, bacteria that survive biocides are likely to be resistant to antibiotics (Karatzas et al., 2008). The contribution of certain biocides, other than decontaminants, to the increased occurrence of antibiotic-resistant bacteria is supported by current scientific evidence (SCENIHR, 2009). However, very little is known about the possible contribution of decontaminants to such a resistance. In the light of the increasing threat to public health from antibiotic-resistant bacteria, it has been recommended that the decontamination of meat and poultry should not be allowed in the

* Corresponding author. Tel.: +34 987 29 1000x5633; fax: +34 987 44 20 70.
E-mail address: rosa.capita@unileon.es (R. Capita).

European Union unless it is demonstrated that such techniques are safe, taking into account the potential pathogenic micro-biota involved (EFSA, 2008; FVE, 2005).

In two recent studies (Alonso-Hernando et al., 2009a,b) it was demonstrated that growing *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in culture broths containing increasing sub-inhibitory concentrations of decontaminants led to reduced susceptibilities to both decontaminants and antibiotics. Moreover, when *S. enterica* isolates from poultry were used, a relationship between the number of antibiotics to which the strains were resistant and their tolerance of decontaminants was found (Capita, 2007). However, the effects of decontaminants on the antimicrobial resistance of bacteria in complex food system, such as red meat or poultry, have not been investigated.

Escherichia coli is common in the gastrointestinal tracts of animals and human beings. Although most isolates are non-pathogenic they are considered to be indicators of faecal contamination of food, and between 10% and 15% of *E. coli* strains are pathogenic (Barnes and Gross, 1997). *E. coli* is regarded as a useful indicator of antibiotic resistance and plays a prominent role in many existing surveillance systems for antibiotic resistance in animals and foodstuffs (SCENIHR, 2009). The main objective of this research was to investigate whether a single exposure of poultry tissues to concentrations of decontaminants used in commercial practice can increase the prevalence of resistance to clinically important antibiotics in natural *E. coli* populations. The antimicrobial effectiveness of such decontaminants and the antibiotic resistance profiles in *E. coli* isolates from poultry were also determined.

2. Materials and methods

2.1. Poultry samples

Fifty chicken legs were collected from carcasses immediately after they were eviscerated at a local poultry processing plant. Each leg was placed in a separate sterile plastic bag and transported to the laboratory in an ice chest, where samples were stored at 3 ± 1 °C for no longer than 5 h before being used.

2.2. Antimicrobial treatments

The chicken legs were randomly divided into five batches, each containing ten legs. Samples from four batches were individually dipped for 15 min into 500 mL of sterile solutions (wt/vol) of trisodium phosphate (TSP; Merck, Darmstadt, Germany); 1200 ppm sodium chlorite (SC; Fluka, Madrid, Spain) acidified (ASC) to pH 2.7 by adding citric acid (Panreac, Barcelona, Spain); 2% ascorbic acid (AA; Sigma–Aldrich Química S.A., Madrid, Spain); and 2% citric acid (CA; Panreac, Barcelona, Spain). The pH values of the chemical solutions measured at the time of application were: TSP, 13.06 ± 0.08 ; ASC, 2.70 ± 0.01 ; AA, 2.17 ± 0.02 ; and CA, 2.19 ± 0.02 . Legs in the remaining batch were dipped into 500 mL of sterile tap water (control). The temperature of the solutions was 20 ± 1 °C. After treatment, the chicken legs were drained in aseptic conditions on absorbent paper for 15 min at room temperature (20 ± 1 °C), with the external side of the legs facing upwards. Thereafter the samples were placed in individual sterile plastic containers and stored at 7 ± 1 °C.

2.3. Microbiological analysis

Samples were evaluated for microbiological quality after 0 and 5 days of storage. On day 0 the legs were tested immediately after the dipping treatment had been completed. Each sample was prepared

by excising 5 g of skin with a sterile knife blade. The samples were placed in a sterile stomacher bag containing 45 mL of sterile buffered peptone water (Oxoid Ltd., Basingstoke, England) and homogenized (Masticator IUL, Barcelona, Spain) for 2 min. Decimal dilutions in sterile 0.1% (wt/vol) peptone water (Oxoid) were prepared from the homogenate. Aerobic plate counts (APC) were determined on plate count agar (PCA; Oxoid) incubated for 72 h at 30 ± 1 °C. For faecal coliform enumeration, duplicate pour plates of violet red bile agar (VRBA; Oxoid), with overlay, prepared using 1 ml volumes of appropriate dilutions were incubated at 44 ± 1 °C for 24 h. Plates with between 25 and 250 colonies (spread-plate technique) or between 30 and 300 colonies (pour plate technique) were counted, and mean counts were calculated.

2.4. Isolation and identification of *E. coli* strains

Three to six colonies in VRBA were selected from plates of each sample, transferred onto tryptone soy agar (TSA; Oxoid) and incubated at 44 ± 1 °C for 24 h in order to obtain pure cultures. These pure cultures were examined for colony and cell morphology, Gram stain, and oxidase and catalase activities. Presumptive *E. coli* strains were inoculated into API 20E strips (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) in accordance with the manufacturer's instructions. The bacteria were identified using the database API LAB Plus version 3.2.2. (bioMérieux). The *E. coli* strains were kept frozen at -20 °C after re-suspension in tryptone soy broth (TSB; Oxoid) with 20% (vol/vol) glycerol.

2.5. Antibiotic susceptibility testing

A total of 250 isolates (25 taken on day 0 and 25 taken on day 5 from each group of samples) were screened, on Mueller–Hinton agar (Oxoid), for susceptibility to a panel of twelve antibiotics by the disc-diffusion method as described in the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2008). The following discs (Oxoid) were used: gentamicin (GEN; 10 µg), ampicillin-sulbactam (AMP; 20 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC; 30 µg), piperacillin-tazobactam (TZP; 110 µg), cephalexin (CTX; 30 µg), trimethoprim-sulphamethoxazole (SXT; 25 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), fosfomycin (FOS; 200 µg) and nitrofurantoin (F; 300 µg). The inhibition zones were measured and scored as showing sensitivity, intermediate susceptibility or resistance in accordance with the CLSI guidelines. *E. coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as reference strains for antibiotic disc activities. Isolates of intermediate susceptibility were counted together with the isolates that were wholly resistant. A strain was considered multi-resistant when it showed resistance or intermediate susceptibility to two or more antimicrobials (Álvarez-Fernández et al., 2013).

2.6. Statistical analysis

Ten replicate chicken legs were sampled for each microbial group, treatment and sampling day. Replications were performed on separate days. Microbial counts (cfu g^{-1}) were converted to \log_{10} values, and mean and standard deviations were calculated. Means were separated using Duncan's multiple range test. An ANOVA was performed for the three factors: microbial group (G), type of treatment (T) and sampling day (D) and their interactions. Also, ANOVAs for both microbial groups were performed. Hypothesis tests were conducted to determine whether average microbial counts were equal for type of treatment and day of storage. The interactions $T \times D$ were also tested. The prevalence of resistant isolates was compared by means of the two-tailed Fisher's exact

and Chi-square tests. To compare the average number of antibiotics to which the isolates were resistant the Mann–Whitney U (comparisons between treatments in the same sampling day) and the Wilcoxon (comparisons between days 0 and 5 for the same treatment) tests were performed. Significance was set at the level $P < 0.05$. The tests were carried out using the Statistica® 6.0 software package (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, USA).

3. Results

3.1. Microbial counts

The antimicrobials used and the sampling day significantly ($P < 0.001$) affected APC and faecal coliform loads. The T × D interactions were also significant ($P < 0.001$) for both microbial groups.

All antimicrobial solutions significantly reduced ($P < 0.05$) initial bacterial loads compared with control samples (Tables 1 and 2). Similar APC were observed on day 0 for all decontamination treatments. Legs treated with ascorbic acid showed the lowest initial faecal coliform loads. Microbial counts increased during storage in all groups of poultry legs. On day 5 of storage, APC were least on legs treated with TSP or CA, and faecal coliform counts were least on legs treated with TSP or ASC.

3.2. Antibiotic resistance

The *E. coli* isolates showed some degree of resistance to between 0 and 10 antibiotics (Table 3). The mean numbers of antibiotics to which the strains in control (3.76 ± 2.01) and treated (all treatments taken together) samples (4.23 ± 1.94) showed some degree of resistance were not significantly different ($P > 0.05$) on day 0. However, after storage for 5 days, the mean number of antibiotics to which the strains showed resistance was significantly higher ($P < 0.001$) in treated (4.68 ± 2.16) than in control (3.44 ± 1.42) samples. The mean number of antibiotics to which the strains from treated samples showed resistance was significantly higher ($P < 0.001$) after storage for five days than on day 0.

Fig. 1 shows the percentages of *E. coli* isolates resistant to each antibiotic in both control and decontaminated samples. With the results for all decontaminants considered together, a higher prevalence of resistance in *E. coli* from treated than from control samples was observed for amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.01$) on day 0, and for amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.001$), trimethoprim-sulphamethoxazole ($P < 0.05$) and ciprofloxacin ($P < 0.01$) on day 5 of storage. When each decontaminant was considered separately, the prevalence of resistant *E. coli* was higher on day 0 in treated than in control samples for ampicillin-sulbactam ($P < 0.05$, legs treated with TSP) and amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.01$, ASC and CA; $P < 0.001$, AA). On day 5, higher prevalence of resistant *E. coli* in

Table 1
Aerobic plate counts (APC; \log_{10} cfug⁻¹ of skin) recovered from chicken legs dipped in tap water or in solutions of decontaminants before or after storage for 5 days at 7 ± 1 °C.

Treatment	Storage time (days)	
	0	5
Control (tap water)	5.66 ± 0.92 Aa	8.27 ± 0.80 Ba
Trisodium phosphate (12%)	4.90 ± 0.24 Ab	7.35 ± 0.87 Bb
Acidified sodium chlorite (1200 ppm)	4.71 ± 0.48 Ab	8.05 ± 0.51 Bac
Ascorbic acid (2%)	4.75 ± 0.64 Ab	7.72 ± 0.63 Bbc
Citric acid (2%)	5.15 ± 0.70 Ab	7.31 ± 0.80 Bb

Each reported value is the mean \pm standard deviation of ten determinations. Data in the same row with no capital letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

Data in the same column with no lowercase letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2

Numbers of fecal coliforms (\log_{10} cfug⁻¹ of skin) recovered from chicken legs dipped in tap water or in solutions of decontaminants before or after storage for 5 days at 7 ± 1 °C.

Treatment	Storage time (days)	
	0	5
Control (tap water)	3.08 ± 0.64 Aa	4.38 ± 0.78 Ba
Trisodium phosphate (12%)	2.07 ± 0.69 Abc	3.13 ± 0.56 Bb
Acidified sodium chlorite (1200 ppm)	1.77 ± 0.64 Abd	3.41 ± 0.44 Bb
Ascorbic acid (2%)	1.39 ± 0.64 Ad	4.32 ± 0.35 Ba
Citric acid (2%)	2.22 ± 0.56 Ac	4.36 ± 0.40 Ba

Each reported value is the mean \pm standard deviation of ten determinations.

Data in the same row with no capital letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

Data in the same column with no lowercase letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

treated than control samples was observed for amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.01$, ASC; $P < 0.001$, AA; $P < 0.05$, CA), trimethoprim-sulphamethoxazole ($P < 0.01$, AA; $P < 0.05$, CA), tetracycline ($P < 0.05$, CA), ciprofloxacin ($P < 0.001$, ASC and CA; $P < 0.05$, AA) and nitrofurantoin ($P < 0.05$, TSP). A greater ($P < 0.05$) prevalence of resistance to antibiotics in control than in treated samples was observed on day 0 for gentamicin (AA and CA).

Because chicken may be consumed after different times of refrigerated storage, data from both sampling days were combined to obtain mean values for the prevalence of resistant *E. coli*. For all decontaminants together, a higher prevalence of *E. coli* resistant to antibiotics in test than in control samples was observed for amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.001$), trimethoprim-sulphamethoxazole ($P < 0.05$) and ciprofloxacin ($P < 0.01$). For individual treatments, isolates from control samples showed a lower prevalence of resistance than those in treated samples with respect of ampicillin-sulbactam ($P < 0.01$, samples treated with TSP), amoxicillin-clavulanic acid ($P < 0.001$, ASC, AA and CA), cephotaxime ($P < 0.05$, TSP), trimethoprim-sulphamethoxazole ($P < 0.05$, AA; $P < 0.01$, CA), tetracycline ($P < 0.01$, CA), ciprofloxacin ($P < 0.001$, ASC; $P < 0.05$, AA; $P < 0.01$, CA) and nitrofurantoin ($P < 0.01$; TSP).

The increase in the prevalence of resistance in isolates from treated samples as compared with isolates from control samples was a consequence of marked differences in the diameter of inhibition zones, scored as “sensitive” (control samples) and “intermediately sensitive” or “resistant” (treated samples), in accordance with the guidelines used. Moreover, in some cases, the diameter of the inhibition zones in isolates from treated samples decreased relative to the isolates from control samples, even though both groups of strains were classified in the same group (“sensitive” or “resistant”).

The prevalence of resistance in *E. coli* isolates from control samples was similar ($P > 0.05$) on days 0 and 5 of storage for all the antibiotics tested. However, for isolates from treated samples (all treatments considered together) a greater frequency of resistance to antibiotics for isolates recovered on day 5 than on day 0 was observed for TZP ($P < 0.001$), C ($P < 0.001$) and CIP ($P < 0.01$). When the effect of each decontaminant was considered separately, the prevalence of resistance to antibiotics increased during storage for TZP ($P < 0.05$, samples treated with TSP and ASC), C ($P < 0.01$, ASC) and CIP ($P < 0.05$, CA).

4. Discussion

4.1. Microbial counts

The present study extends previous findings about the effects of TSP, ASC and organic acids on the microbial contaminants of

Table 3

Number (percentage) of sensitive, resistant and multi-resistant *Escherichia coli* isolates from groups of chicken legs treated with antimicrobial^a solutions and not-stored or stored for 5 days at 7 ± 1 °C.

Storage time (days)	Treatment	Number of antibiotics to which the strains were resistant										Mean number per strain	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9		10
0	Control	2 (8)	2 (8)	2 (8)	5 (20)	5 (20)	2 (8)	6 (24)	1 (4)				3.76 ± 2.01 ^a
	TSP		9 (36)	1 (4)	1 (4)	1 (4)	6 (24)	4 (16)	1 (4)	2 (8)			3.80 ± 2.48 ^a
	ASC				6 (24)	10 (40)	4 (16)	2 (8)	3 (12)				4.44 ± 1.29 ^a
	AA		2 (8)	1 (4)	2 (8)	4 (16)	10 (40)	6 (24)					4.48 ± 1.48 ^a
5	CA	4 (16)	1 (4)		1 (4)	5 (20)	6 (24)	5 (20)	3 (12)				4.20 ± 2.29 ^a
	Control	1 (4)	1 (4)	3 (12)	8 (32)	7 (28)	3 (12)	2 (8)					3.44 ± 1.42 ^a
	TSP		5 (20)	3 (12)		4 (16)		6 (24)	5 (20)	1 (4)		1 (4)	4.64 ± 2.64 ^b
	ASC				3 (12)	7 (28)	7 (28)	3 (12)	3 (12)		2 (8)		5.16 ± 1.65 ^b
5	AA	1 (4)	3 (12)	2 (8)	3 (12)	5 (20)	3 (12)	4 (16)	2 (8)		1 (4)	1 (4)	4.32 ± 2.50 ^{ab}
	CA			6 (24)		3 (12)	9 (36)	5 (20)		2 (8)			4.60 ± 1.78 ^b

A total of 250 strains (25 in each group of samples) were tested. The average numbers of resistances per strain on the same day (different treatments) with no letters in common (superscript), are significantly different ($P < 0.05$). The average numbers of resistances per strain within the same treatment (day 0 versus day 5) with no letters in common (subscript), are significantly different ($P < 0.05$).

^a Antimicrobials are TSP, 12% trisodium phosphate; ASC, 1200 ppm acidified sodium chlorite; AA, 2% ascorbic acid; and CA, 2% citric acid.

poultry carcasses, which shows that use of the decontaminants tested reduced bacterial loads both initially and on chill stored product (Del Río et al., 2007b; Loretz et al., 2010). The findings of this study are comparable with a previous report (Del Río et al., 2007a), which identified CA and TSP as the antimicrobials most effective against Gram-positive bacteria, and ASC and TSP as the most effective against Gram-negative bacteria. Ascorbic acid alone has apparently not previously been tested as a decontaminant of poultry carcasses.

4.2. Antimicrobial resistance

Concerns about drug resistance in bacteria isolated from farm animals and from foods of animal origin have been growing for a number of years and have been raised at both national and international levels. Food-borne pathogenic bacteria that are resistant to clinically important antibiotics can cause problems for treatment of people contracting infections caused by them. Morbidity and mortality in infections by antibiotic-resistant bacteria are therefore considerably higher than those caused by bacteria sensitive to antibiotics (Capita and Alonso-Calleja, 2013). Moreover, antibiotic-resistant bacteria (including bacteria that are not pathogenic) may provide a reservoir of resistance genes which can be transferred to bacteria of clinical significance for humans (Nijsten et al., 1994).

In this study, the majority of *E. coli* isolated from control samples were resistant to two or more antimicrobials. These findings are similar to those of others (Álvarez-Fernández et al., 2013). The relatively high prevalence of resistance to AMC, SXT, TE, NA and CIP found in this study agrees with the findings from several previous studies, and could be related with the widespread use of these antibiotics in poultry production in a number of countries around the world, including Spain (Álvarez-Fernández et al., 2012; Sáenz et al., 2001). The very high rates of resistance to CIP in *E. coli* isolates are of note, because fluoroquinolones are critically important for treating serious *E. coli* infections in humans (Van et al., 2008).

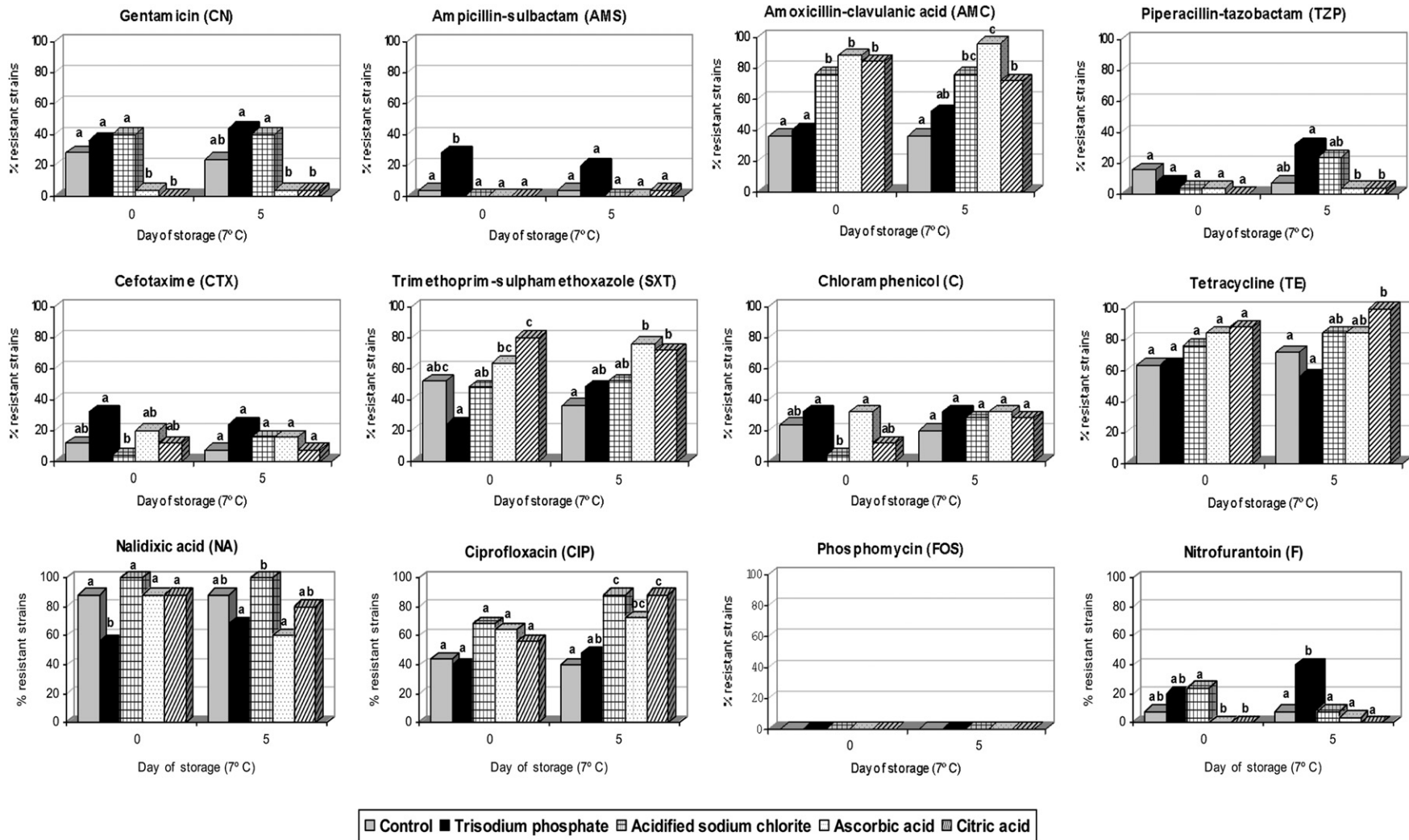
Bacteria on poultry carcasses may be exposed to sub-lethal concentrations of biocides because of inadequate distribution or doses of the chemicals, or excessive amounts of organic matter, which can inactivate biocides (Alonso-Hernando et al., 2009a), in the dipping tank. Sub-lethal concentrations may also occur in selected niches on the poultry skin. It has been demonstrated that bacteria may be retained mechanically in ridges, crevices, channels and feather follicles of poultry skin (Capita et al., 2002). It is difficult for chemical compounds to reach the bacteria attached to, or entrapped in, these sites. Sub-lethal concentrations of

decontaminants could provide selective pressure for the selection and proliferation of strains resistant to these compounds, and cross resistance to antibiotics. It is thus to be expected that *E. coli* populations on poultry held in refrigerated storage will be very heterogeneous and comprise strains with intrinsic or acquired reduced susceptibility to a range of antimicrobials, including antibiotics. This state of affairs might explain the results of the present study, in which the highest prevalence of resistance to antibiotics was observed for isolates recovered from treated samples, both on day 0 and, especially, after 5 days of storage. Previous laboratory studies have also shown that use of different decontaminants can select for antibiotic-resistant bacteria, particularly when exposure to sub-optimal concentrations is either prolonged or repeated (SCENIHR, 2009).

The increase in the prevalence of resistance to the antibiotics AMS, AMC, CTX, SXT, TE, CIP and F in *E. coli* populations after decontaminant treatments is of concern, because these antibiotics are among the drugs of choice for treating human infections (Alonso-Hernando et al., 2012; Finch et al., 2010). The greater prevalence of resistance in control samples than in samples treated with AA or CA observed on day 0 for gentamicin is in agreement with the report of Cottell et al. (2009), who observed that biocide-tolerant *E. coli* strains showed a decreased susceptibility to five aminoglycoside antibiotics. These authors suggested loss of plasmids encoding aminoglycoside tolerance, or changes to the outer membrane, might explain the relationship between biocide tolerance and aminoglycoside hypersusceptibility in *E. coli*.

No substantial differences were found between decontaminants in respect of their potentiality to increase the prevalence of resistance to antibiotics in *E. coli* populations on poultry. These results are not in agreement with previous findings in culture broth (Alonso-Hernando et al., 2009b; Whitehead et al., 2011), in which it was suggested that the potential to increase antibiotic resistance varies among biocides. The differences between studies would be probably due to the different microbial groups and growth media (culture broth or poultry meat) used.

Our results suggest that extended use of chemicals may have a substantial effect on antibiotic resistance among *E. coli* populations on poultry, but additional research would be needed to verify these findings. There is a need for further studies to reveal the mechanisms of increase of resistance, and to determine the contributions of different types of decontaminants and conditions of treatment to the emergence of antibiotic resistance in several microbial populations on poultry, in order to prevent or minimize the selection of bacteria for resistance to antibiotics. Even though minor differences were found in the mean numbers of antibiotics to



Data from the same day with no letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

A total of 250 isolates (25 taken on day 0 and 25 taken on day 5 from each group of samples) were screened for susceptibility.

Fig. 1. Percentages of antibiotic-resistant *E. coli* isolates from chicken legs dipped in tap water (control) or in solutions of chemical decontaminants and stored for 5 days at 7 ± 1 °C.

which strains in control and treated samples showed resistance (about one drug difference), the increase in the prevalence of resistance after decontamination is a matter for concern because drugs of choice for treating human infections were affected. Additional studies should also be performed to determine if increases in the mean number of antibiotics to which isolates from treated samples are resistant are of clinical significance.

Acknowledgments

The authors would like to thank the *Junta de Castilla y León* (Project LE013A10-2) and the *Ministerio de Ciencia e Innovación* (Project AGL2011-29645) for the financial support.

References

- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 2009a. Adaptation and cross-adaptation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* to poultry decontaminants. *The Journal of Microbiology* 47, 142–146.
- Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., 2009b. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* 20, 1108–1111.
- Alonso-Hernando, A., Prieto, M., García-Fernández, C., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2012. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates from *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. *Food Control* 23, 37–41.
- Álvarez-Fernández, E., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Capita, R., 2012. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. *International Journal of Food Microbiology* 153, 281–287.
- Álvarez-Fernández, E., Cancelo, A., Díaz-Vega, C., Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: a comparison of agar disc diffusion and *Sensi-test Gram-negative* methods. *Food Control* 30, 227–234.
- Barnes, H.J., Gross, W.B., 1997. Colibacillosis. In: Calnek, B.W., et al. (Eds.), *Diseases of Poultry*, tenth ed. Mosby-Wolfe Medical Publication Ltd, London, pp. 131–139.
- Buncic, S., Sofos, J., 2012. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International* 45, 641–665.
- Capita, R., 2007. Variation in *Salmonella* resistance to poultry chemical decontaminants, based on serotype, phage type, and antibiotic resistance patterns. *Journal of Food Protection* 70, 1835–1843.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., 2013. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53, 11–48.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Rodríguez-Pérez, R., Moreno, B., García-Fernández, M.C., 2002. Influence of poultry carcass skin sample site on the effectiveness of trisodium phosphate against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 65, 853–856.
- CLSI, 2008. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated From Animals. Approved Standard M31-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania.
- Cottell, A., Denyer, S., Hanlon, G., Ochs, D., Maillard, J., 2009. Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *Journal of Hospital Infection* 72, 71–76.
- Del Río, E., Muriente, R., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2007a. Effectiveness of trisodium phosphate, acidified sodium chlorite, citric acid, and peroxyacids against pathogenic bacteria on poultry during refrigerated storage. *Journal of Food Protection* 70, 2063–2071.
- Del Río, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R., 2007b. Effect of various chemical decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology* 115, 268–280.
- EFSA, 2008. Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *The EFSA Journal* 659, 2–26.
- EFSA, 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10, 2597–3038.
- FVE, 2005. Public Health. Implementing Measures of the Hygiene Package May Newsletter. Federation of Veterinarians of Europe, Brussels, pp. 4–6.
- Finch, R.G., Greengood, D., Norrby, S.R., Whitley, R.J., 2010. Antibiotic and Chemotherapy. *Anti-infective Agents and Their Use in Therapy*, ninth ed. Saunders Elsevieresan, London.
- Karatzas, K.A.G., Randall, L.P., Webber, M., Piddock, L.J.V., Humphrey, T.J., Woodward, M.J., Coldham, N.G., 2008. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 1508–1516.
- Loretz, M., Stephan, R., Zweifel, C., 2010. Antimicrobial activity of decontamination treatments for poultry carcasses: a literature survey. *Food Control* 21, 791–804.
- Nijsten, R., London, N., van den Bogaard, A., Stobberingh, E., 1994. Resistance in faecal *Escherichia coli* isolated from pig farmers and abattoir workers. *Epidemiology and Infection* 113, 45–52.
- Sáenz, Y., Zaragoza, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18, 353–358.
- SCENIHR, 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. 19 January 2009. Available at: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/scenih_r_o_021.pdf (accessed 06.10.12).
- 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. Available at: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenih/docs/scenih_r_o_015.pdf (accessed 06.10.12).
- Sheridan, À., Lenahan, M., Duffy, G., Fanning, S., Burgess, C., 2012. The potential for biocide tolerance in *Escherichia coli* and its impact on the response to food processing stresses. *Food Control* 26, 98–106.
- Van, T.T.H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L.T., Coloe, P.J., 2008. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology* 124, 217–223.
- Whitehead, R.N., Overton, T.W., Kemp, C.L., Webber, M.A., 2011. Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level of biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step. *PLoS ONE* 6 (7), e22833. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022833>.

Influence of Housing Systems on Microbial Load and Antimicrobial Resistance Patterns of *Escherichia coli* Isolates from Eggs Produced for Human Consumption

ELENA ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, JESSICA DOMÍNGUEZ-RODRÍGUEZ, ROSA CAPITA, AND CARLOS ALONSO-CALLEJA*

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, 24071 León, Spain

MS 11-182: Received 12 April 2011/Accepted 23 October 2011

ABSTRACT

Microbial counts (aerobic bacteria, psychrotrophs, *Enterobacteriaceae*, coliforms, *Pseudomonas* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., and molds and yeasts) were obtained for the shells of 240 table eggs in northwestern Spain. Eggs from six sources (40 samples in each) were analyzed: chicken eggs from five different housing systems (conventional battery cages, barn, free range, organic, and domestic breeding) and quail eggs (cages). A total of 120 *Escherichia coli* strains (20 from each source) were tested by the disk diffusion method for resistance to 12 antimicrobial drugs of veterinary and human health significance. Aerobic plate counts ranged from 1.96 ± 1.0 (barn) to 3.69 ± 0.7 (domestic) log CFU/cm². Counts for most microbial groups differed significantly between sources. Eggs from domestic production had the highest contamination loads ($P < 0.05$) for aerobic bacteria, *Enterococcus* spp., and molds and yeasts and the highest prevalence of *E. coli*. Twenty-three *E. coli* isolates (19.17%) were susceptible to all antimicrobials tested, and 80.83% were resistant to one (22.50%) or more (58.33%) antimicrobials. The housing system had a significant influence ($P < 0.05$) on the average resistance per strain, with the highest resistance in conventional cage (2.85) and barn (3.10) systems followed by free range (1.55) and quail (1.95). Eggs from organic (1.00) and domestic (0.75) production systems had the lowest resistance per strain. The highest prevalence of resistance was observed for the groups of antimicrobials more frequently used on poultry farms. Our results suggest that a relationship exists between the prevalence of antimicrobial resistance in *E. coli* strains and the more frequent use of antimicrobials in conventional (cage, barn, and free range) than in domestic and organic chicken housing systems. Education covering good sanitary practices for handling eggs to avoid cross-contamination or inadequate cooking is needed.

Escherichia coli is one of the common microorganisms of the gastrointestinal tract of animals and human beings. Although most isolates are nonpathogenic and are considered merely indicators of fecal contamination in food, 10 to 15% of *E. coli* strains are opportunistic and pathogenic (7). *E. coli* and *Enterococcus* spp. also are considered indicators of antibiotic resistance (37).

Serious concerns about bacterial resistance to drugs have been increasing at both national and international levels (9). Antimicrobial resistance has been defined as a global pandemic (18), one of the major global public health threats, and one of the major health challenges of the 21st century (40). The widespread use (especially overuse or misuse) of antimicrobials in humans and animals often is involved in the emergence, selection, and dissemination of multidrug-resistant bacterial strains. A link between the agricultural use of antibiotics and the emergence of drug-resistant bacterial strains causing human infections has been suggested, and many resistant bacteria have been isolated from food samples in recent years (8). Antibiotic resistance

among *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, and *Enterococcus* isolates from animals and foodstuffs is monitored in the European Union (20). However, few published studies have included information on antimicrobial resistance in bacteria, particularly *E. coli*, recovered from eggshells (31).

The European Union is the second highest producer of table eggs, following China, with more than 6.5 million tons and an average consumption of 235 eggs per capita (36). In recent years, several different methods and systems for producing eggs have evolved and have been addressed by European Council Directive 1999/74/EC (22), Council Regulation (EEC) No 2092/91 (21), Council Regulation (EC) No 1804/1999 (23), and Commission Regulation (EC) No 2295/2003 (19). These systems differ in how the birds are housed, fed, and managed. Hens can be confined in battery cages, which are small enclosures with welded wire mesh sloping floors. In barn systems, the layers are kept on litter, and the birds have freedom to move around within the poultry house, whereas in free-range systems the layers also have access to an outdoor run. In organic (ecological) production facilities, hens must be free range and must be ranged on organic land. In contrast to conventional production of poultry, where antimicrobial agents are

* Author for correspondence. Tel: 34 987 291000, Ext 5633; Fax: 34 987 442070; E-mail: carlos.alonso.calleja@unileon.es.

TABLE 1. Culture media and techniques, incubation times, and temperatures used for microbiological analysis

Microorganism	Culture medium	Culture technique	Incubation	
			Temp (°C)	Time (h)
Aerobic bacteria	Plate count agar	Spread plate (0.1 ml)	30	72
Psychrotrophs	Plate count agar	Pour plate (1 ml)	7	240
<i>Enterobacteriaceae</i>	Violet red bile glucose agar	Pour plate (1 ml) (plates were overlaid)	35	24
Fecal coliforms	Violet red bile agar	Pour plate (1 ml) (plates were overlaid)	44	24
<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Pseudomonas</i> agar with cephaloridine, fucidin, and cetrinide	Spread plate (0.1 ml)	25	24
<i>Enterococcus</i> spp.	Kanamycin aesculin azide agar	Pour plate (1 ml)	42	24
<i>Staphylococcus</i> spp.	Baird-Parker agar	Spread plate (0.1 ml)	35	48
Yeasts and molds	Oxytetracycline glucose yeast extract agar	Spread plate (0.1 ml)	25	120

widely used for treatment, control, and prevention of diseases, organic production practice involves restricted use of antimicrobials. In addition to being subjected to strict rules regarding the use of antimicrobials, organic birds must be given only organically produced feed and supplements.

Consumption in the European Union by type of eggs is 75% from conventional cages, 14% from barns, 9% from free range, and 2% from organic production (36). Domestically produced eggs from small family holdings frequently are sold in Spanish traditional local markets. Thus, consumers face a broad range of products at very different prices but without any real information about specific qualities. European Council Directive 1999/74/EC (22) imposes a full ban that took effect on 1 January 2012 on the housing of laying birds in conventional battery cages, which are considered poor for poultry welfare.

Because high numbers of microorganisms on the eggshell can increase the risk of microbial penetration of the eggshell, contamination of the egg content, and of cross-contamination of other eggs, the microbial load on eggshells is an issue of concern (28). To date, information on the microbiological contamination of the shells of eggs in northwestern Spain has been unavailable, and no investigations have been undertaken to determine the level of resistance to commonly used antimicrobial agents by bacteria present on table eggs. This study was therefore conducted to determine the microbial loads on the shells of chicken and quail eggs collected at retail outlets in northwestern Spain and to gather information about the antimicrobial resistance of *E. coli* isolates from eggshells. The influence of housing systems (conventional cage, barn, free range, organic, and domestic breeding) on microbial counts and bacterial drug resistance was assessed for chicken eggs.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. Fifty samples of commercial grade A chicken eggs (size L (19)) and 10 samples of quail eggs were collected from October 2008 to September 2009 in different supermarkets in the Province of León in northwestern Spain 5 days before their expiration dates. Each sample consisted of 12 eggs from the same batch (one boxed dozen). Quail eggs were from conventional cage systems, and the chicken eggs came from five different housing systems: conventional battery cages, barn, free range, organic, and domestic production. Eggs were collected

based on the code numbers stamped on the packages (0 for organic production, 1 for free range, 2 for barn, and 3 for cage systems). Eggs from small family holdings were purchased in traditional local markets within the week in which the eggs were laid. Five brands (two samples for each brand) of quail eggs and chicken eggs were tested for all housing systems. Four eggs were randomly selected and tested individually in each sample. Thus, a total of 240 eggs were studied. On arrival in the laboratory, the eggs were kept at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ and analyzed within 24 h of purchase.

Microbial counts. To recover bacteria, individual eggshells (after removal of egg content) were placed in a mortar of sterile porcelain and crushed for 1 min. The contents of the mortar were placed in a plastic bag with 66 ml (chicken eggs) or 22 ml (quail eggs) of buffered peptone water (Oxoid Ltd., Hampshire, UK), and homogenized (Masticator IUL, Barcelona, Spain) for 2 min. Previous experiments revealed that the average surface areas of chicken and quail eggs were 66 and 22 cm², respectively. Details of the culture media (all from Oxoid) and incubation parameters used are shown in Table 1. Duplicate culture plates were incubated under aerobic conditions. Eggshell dirt (e.g., feces, dust, egg yolk, egg white, feathers, and blood) was evaluated visually. To detect cracked eggs, eggs were examined visually using candle light.

Isolation and identification of *E. coli*. Once the bacterial counts were determined, one to four colonies on violet red bile agar (VRBA) were selected for each egg sample, transferred onto tryptone soy agar (Oxoid), and incubated under the same time and temperature conditions as used for isolation, to obtain pure cultures. The pure cultures were evaluated preliminarily for their colony and cell morphology, Gram staining, and oxidase and catalase activities. Presumptive *E. coli* strains were confirmed on the basis of the presence of beta-glucuronidase (ability to hydrolyze 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide), beta-galactosidase (ability to hydrolyze ortho-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside), and tryptophanase (ability to produce indole from tryptophan) using the *E. coli* test (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy).

Determination of the antimicrobial sensitivity of *E. coli* isolates. A total of 120 isolates (20 from each housing system) were used for antimicrobial susceptibility testing. Isolates were screened for susceptibility to a panel of 12 antibiotics on Mueller-Hinton agar (Oxoid) by a disk diffusion method as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (13). The following disks (Liofilchem) were used: gentamicin (CN; 10 µg), ampicillin-sulbactam (AMS; 20 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AUG; 30 µg), piperacillin-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), nalidixic

acid (NA; 30 µg), tetracycline (TE; 30 µg), nitrofurantoin (F; 300 µg), and phosphomycin (FOS; 200 µg). The inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediate, and resistant according to the CLSI guidelines. Isolates of intermediate susceptibility were counted together with the isolates that were resistant *sensu stricto* (11). *E. coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as reference strains for antibiotic disk controls. An isolate was considered multidrug resistant when it was resistant or intermediately resistant to two or more antimicrobials (10).

Statistical analysis. Microbial counts were converted to log CFU per square centimeter. Means and standard deviations were calculated. Data were evaluated with an analysis of variance (ANOVA) and Duncan's multiple range test. An ANOVA was performed for the two variables of microbial group and housing system and their interactions. ANOVAs for all microbial groups also were performed. Hypothesis tests were conducted to determine whether means differed significantly between housing systems. The prevalence of resistant strains and the multiresistance patterns were compared with the two-tailed Fisher's exact and chi-square tests. Student's *t* test was performed to compare the average number of antibiotics to which the strains were resistant. Significance was set at *P* < 0.05. The tests were carried out using the Statistica 6.0 software package (Statsoft Ltd., Tulsa, OK).

RESULTS

Microbial counts. ANOVA of the two variables, microbial group and housing system, revealed a significant influence (*P* < 0.01) of both variables and their interaction. The aerobic plate counts (APCs) were similar for all chicken and quail eggshells (*P* > 0.05) at 2.49 ± 1.1 and 2.59 ± 1.6 log CFU/cm², respectively. No difference was found between chicken and quail eggshells for *Enterococcus* spp. (0.49 ± 1.0 and 0.65 ± 0.9 log CFU/cm², respectively) and *Staphylococcus* spp. (1.85 ± 1.0 and 1.85 ± 0.7 log CFU/cm², respectively). In contrast, chicken eggshells had higher counts (*P* < 0.05) than did quail eggs for psychrotrophs (1.79 ± 0.8 and 1.19 ± 0.8 log CFU/cm², respectively), *Enterobacteriaceae* (0.81 ± 1.0 and 0.19 ± 0.5 log CFU/cm², respectively), fecal coliforms (0.65 ± 0.9 and 0.16 ± 0.4 log CFU/cm², respectively), and *Pseudomonas* spp. (1.89 ± 1.1 and 1.27 ± 0.6 log CFU/cm², respectively). Counts for molds and yeasts were higher (*P* < 0.05) on quail eggshells (2.44 ± 1.6 log CFU/cm²) than chicken eggshells (1.52 ± 1.2 log CFU/cm²).

The influence of the housing system on microbial counts on chicken eggs is shown in Table 2. APCs, *Enterococcus* spp. counts, and yeast and mold counts were highest (*P* < 0.05) on eggshells from domestic production. The highest microbial counts (*P* < 0.05) for psychrotrophs were found in free-range and domestic eggs, for *Enterobacteriaceae* were found in cage, barn, organic, and domestic eggs, for coliforms were found in barn and domestic eggs, for *Pseudomonas* spp. were found in free-range eggs, and for *S. aureus* were found in cage, barn, and domestic eggs. The percentages of eggs on which each microbial group was detected were 80 to 100% for psychrotrophs, 20 to 75% for *Enterobacteriaceae*, 10 to 75% for fecal coliforms, 25 to 80% for *Enterococcus* spp., and 70 to 100% for yeasts and molds. All eggs were

TABLE 2. Microbial counts on shells of eggs collected from retail outlets in northwestern Spain^a

Microorganism	Chicken eggs					
	Conventional cage	Barn	Free range	Organic	Domestic production	Quail eggs (conventional cage)
Aerobic plate counts	2.34 ± 1.2 AB a (100%)	1.96 ± 1.0 A a (100%)	2.18 ± 0.9 AB a (100%)	2.25 ± 1.1 AB a (100%)	3.69 ± 0.7 C a (100%)	2.59 ± 1.6 B a (100%)
Psychrotrophs	1.54 ± 1.2 AB bc (80%)	1.71 ± 1.1 A ab (100%)	2.19 ± 0.5 C a (100%)	1.41 ± 0.5 AB b (100%)	2.11 ± 0.4 C bc (100%)	1.19 ± 0.8 B b (100%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.91 ± 1.2 A d (45%)	0.89 ± 0.6 A c (75%)	0.26 ± 0.8 B b (20%)	0.90 ± 1.3 A c (50%)	1.10 ± 0.9 A d (65%)	0.19 ± 0.5 B c (20%)
Fecal coliforms	0.10 ± 0.2 A e (15%)	1.35 ± 1.0 B bc (70%)	0.19 ± 0.8 A b (10%)	0.25 ± 0.5 A d (25%)	1.35 ± 0.9 B de (75%)	0.16 ± 0.5 A c (15%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	1.94 ± 1.3 ABC ab (100%)	1.56 ± 0.8 AB ac (100%)	2.39 ± 1.1 C a (100%)	1.49 ± 1.02 AB b (100%)	2.08 ± 1.2 AC bf (100%)	1.27 ± 0.6 B bd (100%)
<i>Enterococcus</i> spp.	0.13 ± 0.4 A e (25%)	0.13 ± 0.3 A d (25%)	0.10 ± 0.4 A b (25%)	0.27 ± 0.4 A d (55%)	1.84 ± 1.4 B be (80%)	0.65 ± 0.9 C bc (60%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2.14 ± 1.0 AB a (100%)	1.94 ± 1.0 AC a (100%)	1.30 ± 0.7 D c (100%)	1.36 ± 0.4 CD b (100%)	2.49 ± 1.2 A cfg (100%)	1.85 ± 0.7 BCD de (100%)
Molds and yeasts	1.02 ± 1.1 A cd (75%)	1.11 ± 1.0 A c (70%)	1.22 ± 0.8 A c (100%)	1.30 ± 0.9 A bc (80%)	2.97 ± 1.0 B g (100%)	2.44 ± 1.7 C ae (80%)

^a Values are log CFU per square centimeter. Within a row, means with no uppercase letters in common are significantly different (*P* < 0.05). Within a column, means with no lowercase letters in common are significantly different (*P* < 0.05). Values in parentheses are the percentage of eggs contaminated with each microbial group.

TABLE 3. Sensitive, resistant, and multiresistant patterns in *Escherichia coli* strains isolated from the shells of eggs collected from retail outlets in northwestern Spain^a

No. of antimicrobials to which eggs were resistant	Chicken eggs					Quail eggs (conventional cage) (n = 20)	Mean (n = 120)
	Conventional cage (n = 20)	Barn (n = 20)	Free range (n = 20)	Organic (n = 20)	Domestic production (n = 20)		
0	1 (5) A a	1 (5) A a	1 (5) A a	6 (30) B a	14 (70) C a	0 (0) A a	23 (19.17) a
1	0 (0) A a	0 (0) A a	9 (45) B b	8 (40) B a	2 (10) AC b	8 (40) B b	27 (22.50) a
≥2	19 (95) A b	19 (95) A b	10 (50) B b	6 (30) BC a	4 (20) C b	12 (60) B b	70 (58.33) b

^a Values are the number (percentage) of *E. coli* isolates. Within a row, means with no uppercase letters in common are significantly different ($P < 0.05$). Within a column, means with no lowercase letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

contaminated with aerobic bacteria, *Pseudomonas* spp., and *S. aureus* (Table 2).

Of the 240 samples tested, 45% were positive for *E. coli*, with a range of 20% (conventional cages) to 85% (domestic production). Barn, free-range, and organic chicken eggs and quail eggs had *E. coli* prevalences of 80, 25, 35, and 25%, respectively.

A total of 42 (17.5%) of 240 eggs analyzed had dirt on the shell. None of the conventional cage, free-range, or organic eggs had dirt, whereas 10, 15, and 80% of barn, quail, and domestic eggs, respectively, had dirt. Intact shells (without cracks) were confirmed for all eggs sampled.

Antimicrobial resistance. A total of 120 *E. coli* strains (20 from each type of housing system) were analyzed. Twenty-three (19.17%) of these isolates were susceptible to all antimicrobials tested, 27 (22.50%) were resistant to one antimicrobial, and 70 (58.33%) were multiresistant (resistant to two or more antimicrobials) (Table 3). Resistance to two (21 strains; 17.50%), three (43 strains; 35.83%), four (4 strains; 3.33%), and five (2 strains; 1.67%) antimicrobials

was observed among multiresistant strains. The highest frequency ($P < 0.05$) of multiresistance (95% strains) was observed in isolates from conventional cage and barn systems. The highest frequency ($P < 0.05$) of sensitive strains was detected in eggs from domestic (70%) and organic (30%) production.

The mean number of antimicrobials to which each strain type was resistant differed among housing systems, with the highest ($P < 0.001$) resistance observed in conventional cage (2.85 antimicrobials) and barn (3.10 antimicrobials) systems and the lowest in free-range (1.55 antimicrobials), organic (1.00 antimicrobials), and domestic (0.75 antimicrobials) production. Chicken eggs (all production types) and quail eggs had a similar ($P > 0.05$) mean number of antimicrobials to which each strain type was resistant: 1.85 and 1.95 antimicrobials, respectively.

The highest prevalence of resistance was observed for TE (60.83% of strains tested) and AUG (51.67%), followed by SXT (27.50%), and F and FOS (17.50%). Low prevalence of resistance (from 0.83 to 2.50% of strains) was detected for the rest of antimicrobials tested (Table 4).

TABLE 4. Frequency of resistance to antimicrobial agents among *Escherichia coli* isolates from the shells of eggs collected from retail outlets in northwestern Spain^a

Drug ^b	Chicken eggs					Quail eggs (conventional cage) (n = 20)	Mean (n = 120)
	Conventional cage (n = 20)	Barn (n = 20)	Free range (n = 20)	Organic (n = 20)	Domestic production (n = 20)		
CN	0 (0) A a	2 (10) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	2 (1.67) a
AMS	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	3 (15) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	3 (2.50) a
AUG	18 (90) A b	18 (90) A b	7 (35) BC b	4 (20) B a	4 (20) B a	11 (55) AC b	62 (51.67) b
TZP	0 (0) A a	2 (10) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	2 (1.67) a
CTX	0 (0) A a	1 (5) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	1 (0.83) a
SXT	17 (85) A b	10 (50) B c	1 (5) C a	3 (15) C a	2 (10) C a	0 (0) C a	33 (27.50) c
C	0 (0) A a	3 (15) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	3 (2.50) a
CIP	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	1 (5) A a	0 (0) A a	1 (0.83) a
NA	0 (0) A a	1 (5) A a	0 (0) A a	0 (0) A a	1 (5) A a	0 (0) A a	2 (1.67) a
TE	19 (95) A b	18 (90) AB b	14 (70) B c	0 (0) C a	4 (20) C a	18 (90) AB d	73 (60.83) b
F	3 (15) A a	4 (20) AB a	9 (45) B bc	0 (0) A a	1 (5) A a	4 (20) AB c	21 (17.5) d
FOS	0 (0) A a	3 (15) A a	0 (0) A a	10 (50) B b	2 (10) A a	6 (30) AB bc	21 (17.50) d

^a Values are the number (percentage) of *E. coli* isolates resistant. Within a row, means with no uppercase letters in common are significantly different ($P < 0.05$). Within a column, means with no lowercase letters in common are significantly different ($P < 0.05$).

^b Drugs tested were gentamicin (CN; 10 µg), ampicillin-sulbactam (AMS; 20 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AUG; 30 µg), piperacillin-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), tetracycline (TE; 30 µg), nitrofurantoin (F; 300 µg), and phosphomycin (FOS; 200 µg).

TABLE 5. Resistance patterns among resistant and multiresistant *Escherichia coli* isolates from eggshells^a

Resistance pattern	No. of strains
CN, AUG, TZP, CTX, FOS	1
AUG, SXT, CIP, NA, TE	1
AUG, C, TE, FOS	2
AUG, TZP, NA, TE	1
AUG, TE, F, FOS	1
CN, AUG, TE	1
AUG, SXT, TE	30
AUG, TE, FOS	12
AUG, SXT	1
AUG, TE	8
TE, F	10
TE, FOS	2
AMS	3
AUG	4
SXT	1
C	1
TE	5
F	10
FOS	3

^a Drugs tested were gentamicin (CN; 10 µg), ampicillin-sulbactam (AMS; 20 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AUG; 30 µg), piperacillin-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), tetracycline (TE; 30 µg), nitrofurantoin (F; 300 µg), and phosphomycin (FOS; 200 µg).

Table 5 shows the antimicrobial resistance patterns among *E. coli* isolates. The most common patterns were AUG, SXT, TE (30 strains; 25%), AUG, TE, FOS (12 strains; 10%), TE, F (10 strains; 8.33%), and F (10 strains; 8.33%). The remaining 35 resistant or multiresistant strains had 16 different patterns.

DISCUSSION

Microbial counts. With the exception of eggs from domestic production ($3.69 \pm 0.7 \log \text{CFU/cm}^2$), APCs in the present study were lower than reported values of 2.61 to 5 log CFU per eggshell (6, 16, 27, 39). However, most reports refer to initial eggshell contamination, whereas the samples in the present study were analyzed after several days of retail display. Storage of table eggs, whether temporarily refrigerated or not, resulted in a significant decrease in bacterial eggshell contamination (15). The method used for the recovery of bacteria from the eggshell could also be partially responsible for the lower counts obtained in the present study. De Reu et al. (14) found that washing of intact eggs in buffered peptone water or phosphate buffer saline by rubbing resulted in statistically higher counts than obtained when the shell was crushed in buffered peptone water. The APCs for eggshells in this study were below 5 log CFU per eggshell, a limit considered as acceptable as an indicator of hygienic quality (15).

Other researches have found differences in bacterial contamination of eggshells depending on housing systems. Eggs from hens kept in floor systems were more

contaminated with aerobic bacteria than were eggs from cage systems (15, 16). Differences in farm construction or management also could influence bacterial eggshell contamination (15), which may explain certain discrepancies between the findings in the present study and those in previous reports. The handling of eggs in the food supply chain also may explain some of the differences.

The higher microbial counts on eggs from domestic production compared with eggs from other housing systems could be associated with the higher prevalence of dirty eggs. However, Wall et al. (39) suggested that the correlation between visual shell contamination and bacterial contamination is poor. Thus, rating bacterial contamination of eggshells based on visual examination may not be highly reliable. The fact that eggs produced in the conventional cage system were cleaner than those from barn production is congruent with the findings of Djukić-Stojčić et al. (17), who reported that cleanliness of eggs from hens kept in floor systems depends on the conditions of the environment, the percentage of eggs taken out of the nest, and the organization of the work on the farm (e.g., how often eggs are collected and the cleanliness of the nests).

The high average percentage of eggshells contaminated with *E. coli* strains (45%) was expected because freshly laid eggs are readily contaminated with feces during laying and in their environment (3). Thus, the high prevalence of *E. coli* on domestic eggs could be related to the frequent presence of dirt on these samples. Similar to our results, Ali Akond et al. (5) reported in Bangladesh that 42% of eggshells were contaminated with *E. coli*.

Antimicrobial resistance. The high prevalence of resistant or multiresistant *E. coli* strains on table eggs in the present study (80.83%) is comparable to the figures reported by other authors (1, 4, 5, 32). This high prevalence of resistance, which may have important therapeutic implications, may be due to the overuse of antimicrobial agents on birds laying eggs (9). This overuse of antimicrobials favors the emergence, selection, and dissemination of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and birds' endogenous fecal microbiota (29, 30). Because eggshells become contaminated during laying, resistant fecal *E. coli* strains from poultry can infect humans via the food chain. Bacteria can acquire antimicrobial resistance from environmental exposure, and multidrug-resistant bacteria have been detected in poultry and eggs from farms that did not report antibiotic use (29). Resistant bacteria from food may colonize the human intestinal tract and pass on resistance genes horizontally to endogenous human bacteria. Drug resistance in the avian intestinal tract may persist for a long time even in the absence of antibiotics (12). Thus, in several countries chickens (both their meat and their eggs) have been described as a source of antibiotic resistant bacteria in humans (38).

Numerous strains in the present study (58.33%) were resistant to two or more antimicrobial agents. An outcome of the proliferation of these multidrug-resistant strains is a reduction in the number and types of antimicrobials that are effective in clinical practice. The high prevalence of

multidrug-resistant *E. coli* isolates in conventional chicken housing systems (cage, barn, and free range), where only a limited number of antimicrobials are frequently used, highlights the fact that resistance mechanisms may be linked (9). The detection of strains resistant to nitrofurantoin, an antimicrobial agent banned in the middle 1990s for veterinary use in the European Union, provides additional support for the hypothesis that drug application may select for resistance not merely to the applied drug but to multiple drugs.

Similar to findings by other authors (33, 35), the higher prevalence of antimicrobial resistance in the current study was observed in *E. coli* strains isolated from conventional cage, barn, and free-range housing compared with organic and domestic production systems, in which antimicrobial use was assumed to be less, suggesting that these alternative housing systems may limit the development and spread of antimicrobial resistance among foodborne bacteria. In addition to antibiotic use, crowding and poor sanitation, two factors typically associated with intensive poultry farming (e.g., cage systems), also are major forces selecting for antimicrobial resistance. A prevalent belief on the part of consumers is that organic and domestic production eggs are healthier and safer than conventional eggs (26). Results found in the present study justify in part this consumer perception. However, compared with conventional cage systems outdoor (barn, free-range, domestic, or organic) systems are inherently less controllable from a hygienic point of view and can be affected by pollutants that have not been an issue for intensive farms, resulting in increased food safety risk from microbial infections or environmental contamination (24).

The high percentage of *E. coli* strains resistant to AUG, SXT, and TE in the present study is consistent with findings by other authors (25, 31, 32, 38). These agents are among the main drugs used against infectious diseases in chicken flocks in numerous countries worldwide, including Spain. Hence, some level of resistance is expected to have emerged over time (2, 29). The small percentage of strains resistant to fluoroquinolones in the current study (0 to 5%) is surprising because these drugs are among those most frequently used in poultry farms in Spain (10). Previous studies in Spain revealed a high prevalence of resistance to fluoroquinolones in *E. coli* strains from both chicken and human populations (34).

The microbiological contamination of eggshells differed substantially between housing systems. Domestically produced eggs had the highest percentage of dirty samples, the highest counts for most microbial groups, and the highest prevalence of *E. coli*. The high prevalence on eggshells of *E. coli* strains resistant or multiresistant to antimicrobial agents, some of which are used in treating human diseases, poses a potential health hazard to consumers. The results obtained in this study suggest a relationship between antibiotic resistance and housing system. The prevalence of antimicrobial resistance was significantly higher in conventional egg production systems than in organic and domestic systems. These findings could reflect the less prevalent use of antibiotics in these housing

systems and highlight the need for more prudent use of antimicrobials in all food-producing animals. Because resistant bacteria that survive antimicrobial treatment survive longer than do the drug residues in foods, the monitoring of antimicrobial-resistant bacteria on eggshells could be one method for detecting antibiotic use in laying hens and uncovering fraudulent use of antimicrobial treatments in organic breeding systems.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank the Junta de Castilla y León (project LE013A10-2) for financial support.

REFERENCES

- Adesiyun, A., and J. S. Kaminjolo. 1992. Susceptibility to antibiotics of *Escherichia coli* strains from diarrhoeic and non-diarrhoeic livestock in Trinidad. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 45:260–262.
- Adesiyun, A., N. Offiah, V. Lashley, N. Seepersadsingh, S. Rodrigo, and K. Georges. 2005. Prevalence of antimicrobial residues in table eggs in Trinidad. *J. Food Prot.* 68:1501–1505.
- Adesiyun, A., N. Offiah, N. Seepersadsingh, S. Rodrigo, V. Lashley, and L. Musai. 2006. Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. *Food Res. Int.* 39:212–219.
- Adesiyun, A., N. Offiah, N. Seepersadsingh, S. Rodrigo, V. Lashley, and L. Musai. 2007. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from table eggs. *Food Control* 18:306–311.
- Ali Akond, M., S. M. R. Hassan, S. Alam, and M. Shirin. 2009. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. *Am. J. Environ. Sci.* 5:47–52.
- Anonymous. 2004. Improving quality and safety of hen eggs in new production system by reinforcing the antimicrobial natural defence and by developing tools for grading eggs, p. 127–131. In Final report of EggDefence project QLRT-2001-01606. European Commission, Nouzilly, France.
- Barnes, H. J., and W. B. Gross. 1997. Colibacillosis, p. 131–139. In B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDonald, and Y. M. Saif (ed.), *Diseases of poultry*, 10th ed. Mosby-Wolfe Medical Publication Ltd., London.
- Begun, K., T. A. Reza, M. Haque, A. Hossain, F. M. K. Hassan, S. H. Hasan, N. Akhter, A. Ahmed, and U. Barua. 2010. Isolation, identification and antibiotic resistance pattern of *Salmonella* spp. from chicken eggs, intestines and environmental samples. *Bangladesh Pharm. J.* 13:23–27.
- Capita, R., and C. Alonso-Calleja. Antibiotic resistant bacteria: a challenge for the food system. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, in press. doi:10.1080/10408398.2010.519837.
- Capita, R., C. Alonso-Calleja, and M. Prieto. 2007. Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *J. Appl. Microbiol.* 103:1366–1375.
- Cardinale, E., J. D. Perrier Gros-Claude, F. Tall, M. Cissé, E. F. Guèye, and G. Salvat. 2005. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.* 56:13–16.
- Chaslus-Dancla, E., G. Gerbaud, M. Lagorce, J. P. Lafont, and P. Courvalin. 1987. Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:784–788.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. Approved standard M31-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- De Reu, K., K. Grijspeerd, M. Heyndrickx, M. Uyttendaele, and L. Herman. 2005. The use of total aerobic and gram-negative flora for quality assurance in the production chain of consumption eggs. *Food Control* 16:147–155.
- De Reu, K., W. Messens, M. Heyndrickx, T. B. Rodenburg, M. Uyttendaele, and L. Herman. 2008. Bacterial contamination of table

- eggs and the influence of housing systems. *World's Poult. Sci. J.* 64: 5–19.
16. De Reu, K., T. B. Rodenburg, K. Grijspeerdt, W. Messens, M. Heyndrickx, F. A. M. Tuytens, B. Sonck, J. Zoons, and L. Herman. 2009. Bacteriological contamination, dirt, and cracks of eggshells in furnished cages and non-cage systems for laying hens: an international on-farm comparison. *Poult. Sci.* 88:2442–2448.
 17. Djukić-Stojčić, M., L. Perić, S. Bjedov, and N. Milošević. 2009. The quality of table eggs produced in different housing systems. *Biotechnol. Anim. Husb.* 25:1103–1108.
 18. European Academies Science Advisory Council. 2007. Tackling antibacterial resistance in Europe. European Academies Science Advisory Council, June 2007. Available at: http://www.leopoldina.org/fileadmin/user_upload/politik/Empfehlungen/EASAC/EASAC_Statement_Antibacterial-resistance_2007.pdf. Accessed 8 April 2011.
 19. European Commission. 2003. Commission Regulation (EC) No 2295/2003 of 23 December 2003 introducing detailed rules for implementing Council Regulation (EEC) No 1907/90 on certain marketing standard for eggs. *Off. J. Eur. Communities L* 340:16–34.
 20. European Food Safety Authority. 2010. The community summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA J.* 8: 1658–1919.
 21. European Union Council. 1991. Council Regulation (EEC) No 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. *Off. J. Eur. Communities L* 198:1–15.
 22. European Union Council. 1999. Council Directive 1999/74/EC of 19 July 1999 laying down minimum standards for the protection of laying hens. *Off. J. Eur. Communities L* 203:53–57.
 23. European Union Council. 1999. Council Regulation (EC) No 1804/1999 of 19 July 1999 supplementing Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs to include livestock production. *Off. J. Eur. Communities L* 222:1–28.
 24. Kijlstra, A., B. G. Meerburg, and A. P. Bos. 2009. Food safety in free-range and organic livestock systems: risk management and responsibility. *J. Food Prot.* 72:2629–2637.
 25. Lanz, R., P. Kuhnert, and P. Boerlin. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91:37–84.
 26. Magkos, F., F. Arvaniti, and A. Zampelas. 2006. Organic food: buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 46:23–56.
 27. Mallet, S., V. Guesdon, A. M. H. Ahmed, and Y. Nys. 2006. Comparison of eggshell hygiene in two housing systems: standard and furnished cages. *Br. Poult. Sci.* 47:30–35.
 28. Messens, W., L. Grijspeerdt, K. De Reu, B. De Ketelaere, K. Mertens, F. Bamelis, B. Kemps, J. De Baerdemaeker, E. Decuypere, and L. Herman. 2007. Eggshell penetration of various types of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Food Prot.* 70: 623–628.
 29. Miles, T. D., W. McLaughlin, and P. D. Brown. 2006. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Vet. Res.* 2:1–9.
 30. Miranda, J. M., A. Mondragón, B. I. Vázquez, C. A. Fente, A. Cepeda, and C. M. Franco. 2009. Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistant to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Sci.* 82:284–288.
 31. Musgrove, M. T., D. R. Jones, J. K. Northcutt, N. A. Cox, M. A. Harrison, P. J. Fedorka-Cray, and S. R. Ladely. 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. *Poult. Sci.* 85:1665–1669.
 32. National Antimicrobial Resistance Monitoring System. 2011. 2008 Animal arm annual report. Available at: https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/66120508/NARMS/NARMS2008/NARMSAnimal_Arm2008.pdf. Accessed 8 April 2011.
 33. Ojeniyi, A. A. 1985. Comparative bacterial drug resistance in modern battery and free-range poultry in a tropical environment. *Vet. Rec.* 117:11–12.
 34. Oteo, J., E. Lázaro, F. J. de Abajo, F. Baquero, J. Campos, and Spanish Members of EARSS. 2005. Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 11:546–553.
 35. Papadopoulou, C., D. Dimitriou, S. Levidiotou, H. Gessouli, A. Panagiou, S. Golegou, and G. Antoniadis. 1997. Bacterial strains isolated from eggs and their resistance to currently used antibiotics: is there a health hazard for consumers? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 20:35–40.
 36. Pascale, M. 2010. Future prospects for the European egg industry. Available at: <http://www.worldpoultry.net/chickens/marketing/eggs/future-prospects-for-the-european-egg-industry-7678.html>. Accessed 11 April 2011.
 37. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. 2009. Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides. 19 January 2009. Available at: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf. Accessed 8 April 2011.
 38. Van den Bogaard, A. E., N. London, C. Driessen, and E. E. Stobberingh. 2001. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 47:763–771.
 39. Wall, H., R. Tauson, and S. Sjørgjerd. 2008. Bacterial contamination of eggshells in furnished and conventional cages. *J. Appl. Poult. Res.* 17:11–16.
 40. World Health Organization. 2009. Related WHO publications and links on antimicrobial resistance. Available at: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/publications/en/index.html. Accessed 8 April 2011.



Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods

Elena Álvarez-Fernández, Amaya Cancelo, Carmen Díaz-Vega, Rosa Capita, Carlos Alonso-Calleja*

Department of Food Hygiene and Food Technology, Veterinary Faculty, University of León, Campus de Vegazana, s/n, 24071 León, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 March 2012

Received in revised form

25 May 2012

Accepted 2 June 2012

Keywords:

Organic poultry

Conventional poultry

Microbiological quality

Escherichia coli

Antimicrobial resistance

ABSTRACT

A total of 120 poultry carcasses (chicken, turkey and quail from conventional poultry farms, and chicken from organic farms; 30 samples in each group), collected from eight randomly selected retail outlets in North-Western Spain, was subjected to microbiological examination. Psychrotrophic counts ranged from $4.87 \pm 0.83 \log_{10}$ cfu/cm² skin in quail to $6.01 \pm 0.38 \log_{10}$ cfu/cm² skin in turkey. Higher ($P < 0.05$) faecal coliform load was found on conventionally produced chicken ($2.95 \pm 0.48 \log_{10}$ cfu/cm² skin) than in the other types of sample (from $1.71 \pm 0.29 \log_{10}$ cfu/cm² skin in turkey to $2.19 \pm 0.34 \log_{10}$ cfu/cm² skin in quail). All the samples harboured *Escherichia coli*. Sixty *E. coli* strains (15 from each type of sample) were tested for antimicrobial susceptibility using both the conventional agar disc diffusion method (12 antimicrobials) and a commercially available miniaturized test (Sensi Test Gram-negative). The disc diffusion method showed that 91.7% of isolates were multi-resistant (resistant to two or more antimicrobials). Resistance to nalidixic acid was the commonest finding (85.0% of strains), followed by resistance to ampicillin (75.0%), ciprofloxacin (73.3%) and tetracycline (61.7%). A significantly ($P < 0.05$) higher average number of resistances per strain was found in conventionally raised poultry (from 5.20 in chicken to 6.40 in quail) than in organic chicken (2.53). An agreement (kappa coefficient) of 0.74% was found between the two testing methods. Using the agar disc diffusion as the reference method, the sensitivity, specificity and accuracy of the miniaturized test were 71.52%, 97.60% and 89.63%, respectively. Findings in this study suggest a linkage between the use of antimicrobials on conventional poultry farms and selection for antimicrobial-resistant bacteria on meat, and highlight the need for the prudent use of antimicrobials with food-producing animals. Because poultry meat is an important reservoir of antimicrobial-resistant *E. coli*, the need for consumer education on good hygiene practices is emphasized.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Poultry meat constitutes a substantial portion of the human diet. In fact, the world average annual consumption of poultry (12.60 kg per person) has increased steadily and now exceeds beef (9.60 kg) and is approaching pork (15.00 kg) (FAO, 2011). Because of this high level of consumption, the quality (including the microbiological quality) of poultry purchased in retail markets is a concern for suppliers, consumers and public health officials worldwide. Bacterial contamination of fresh poultry carcasses has important implications for food safety and product shelf life. Psychrotrophic plate counts have been used to assess the microbiological safety and quality of meat and poultry, hygiene conditions during processing, and as a general indicator of the potential shelf-

life of the product (Guevara-Franco, Alonso-Calleja, & Capita, 2010). Coliforms and *Escherichia coli* counts have an indicator function for processing hygiene and storage quality (Capita, Alonso-Calleja, García-Arias, Moreno, & García-Fernández, 2002).

Organic foods, including poultry, are now readily available from retail outlets in developed countries and their consumption is growing rapidly (Nie & Zepeda, 2011). In contrast to the conventional production of poultry, where antimicrobial agents are widely used for the treatment, control and prevention of diseases (Capita, Alonso-Calleja, & Prieto, 2007) (antibiotics have been banned for growth promotion in the European Union since 2006; Capita & Alonso-Calleja, in press), organic production practice has restricted the use of antimicrobials. In addition to being subjected to strict rules regarding the use of antimicrobial substances, organically reared birds must be fed only on organically produced feed and supplements (Luangtongkum et al., 2006). Consumers' perceptions of rearing practices on chicken farms would be that

* Corresponding author. Tel.: +34 987 29 12 84; fax: +34 987 44 20 70.

E-mail address: carlos.alonso.calleja@unileon.es (C. Alonso-Calleja).

organic poultry is of better quality than conventional (intensively-reared) poultry. This view influences their choice of purchase (Soonthornchaikul, Garelick, Jones, Jacobs, Ball, & Choudhury, 2006). However, relatively little is known about the impact of organic production practices on the microbial loads and the antimicrobial resistance patterns of bacteria on poultry.

The presence of antimicrobial-resistant bacteria in food products is a public health issue of concern because of the potential for the transfer of antimicrobial-resistant food-borne pathogens to human populations. Moreover, antimicrobial-resistant bacteria may represent a reservoir of resistance genes transferable to pathogenic or commensal bacteria of the human digestive tract (Capita & Alonso-Calleja, in press). *E. coli* are the most prevalent bacteria in the intestinal tract in warm-blooded animals and humans, where they constitute approximately 10^6 to 10^9 cfu/g of stool. *E. coli* can easily contaminate food products during animal evisceration after slaughter, through contact with tainted water or during food handling. *E. coli* are also a major zoonotic agent, which can be involved in intestinal and extra-intestinal infectious diseases (Lei et al., 2010). In addition, the level of antimicrobial resistance in commensal *E. coli* is considered to be an excellent indicator of the selection pressures exerted by the use of antibiotics and of the resistance problems to be expected in pathogenic bacteria (SCENIHR, 2009).

At present, the agar disc diffusion method is most often used for the susceptibility testing of *E. coli* strains (Sjölund et al., 2009). However, as this method is very time- and labour- intensive, fast commercial tests for the *in vitro* determination of bacterial susceptibility to antimicrobials have been developed. The “Sensi Test Gram-negative” (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy) is a 24-well system containing dried antibiotics for the susceptibility testing of Gram-negative bacteria and enterococci, which produces results in 18–24 h. No information has been published on agreement between the conventional disc diffusion method and the miniaturized system.

The objectives of this study were to compare (i) the microbiological quality and (ii) the antimicrobial resistance patterns of *E. coli* strains on conventional poultry (chicken, turkey and quail) and organic chicken retail samples in North-Western Spain. In addition, the results of the disc diffusion method and the commercially available miniaturized “Sensi Test Gram-negative” system were compared.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

From September 2010 to September 2011, 120 poultry carcasses, including organic chicken ($n = 30$), conventional chicken ($n = 30$), conventional turkey ($n = 30$) and conventional quail ($n = 30$) were purchased at random from eight retail outlets in the Province of León in North-Western Spain. Poultry samples proceeded from Spanish farms and slaughterhouses. All the samples were placed in separate sterile plastic bags to prevent spilling and cross-contamination, and were immediately transported in an ice chest to the laboratory, being stored at $3\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ for no longer than 1 h before analysis.

2.2. Microbial counts

With the aid of a sterile scalpel and template, 25 cm² of breast skin were removed from each carcass. These skin samples were homogenized (Masticator IUL, Barcelona, Spain) for 2 min in 225 ml of 0.1% (w/v) peptone water (Oxoid Ltd.). Decimal dilutions were carried out using the same diluent. The determination of

psychrotrophs was carried out on plate count agar (PCA; Oxoid Ltd.) incubated for 10 days at $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. For faecal coliform enumeration, duplicate 1 ml pour plates of violet red bile agar (VRBA; Oxoid Ltd.), with overlay, were prepared using appropriate dilutions and incubated at $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ for 24 h. Duplicate plates were incubated under aerobic conditions. Plates with between 25 and 250 colonies (spread-plate technique) or between 30 and 300 colonies (pour plate technique) were counted, and mean counts were calculated.

2.3. Isolation and identification of *E. coli*

Once the bacterial counts had been determined, one to four colonies on VRBA were selected in each sample, transferred onto tryptone soy agar (TSA, Oxoid Ltd.) and incubated under the same conditions of time and temperature as previously during isolation in order to obtain pure cultures. Such pure cultures were investigated preliminarily for their colony and cell morphology, Gram stain, oxidase and catalase activities. Presumptive *E. coli* strains were confirmed by the *E. coli* test (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy) identification system.

2.4. Determination of the antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates

A total of 60 isolates (15 from each sample type) was used for antimicrobial susceptibility testing. Each isolate proceeded from a different carcass and was selected at random. Isolates were screened in two ways. Firstly, strains were tested for susceptibility to a panel of twelve antimicrobials on Mueller-Hinton agar (Oxoid Ltd.) by the disc diffusion method as described in the National Committee for Clinical and Laboratory Standards (CLSI, 2008). The following discs (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy) were used: gentamicin (GEN; 10 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC; 30 µg), piperacillin-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulphamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), fosfomicin (FOS; 200 µg) and nitrofurantoin (F; 300 µg). The inhibition zones were measured and scored as sensitive, intermediate susceptibility and resistant according to the National Committee for Clinical and Laboratory Standards guidelines (CLSI, 2008). The sixty isolates were also tested using the miniaturized “Sensi Test Gram-negative” (Liofilchem s.r.l., Teramo, Italy) (23 antimicrobial drugs) in accordance with the manufacturers’ instructions. The susceptibility testing was interpreted by assessing the change in colour of the wells in the system, and the strains defined as sensitive, intermediate or resistant. Isolates of intermediate susceptibility were counted together with the isolates that were resistant *stricto sensu* (Cardinale et al., 2005). *E. coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 were used as reference strains for antibiotic disc control. An isolate was considered multi-resistant when it showed resistance or intermediate resistance to two or more antimicrobials (Capita et al., 2007).

2.5. Statistical analysis

Microbial counts were converted to log₁₀ cfu/cm² skin values. Means and standard deviations were calculated. Data were evaluated by analysis of variance techniques (ANOVA) and Duncan’s multiple-range test. The prevalence of resistant strains was compared by means of the two-tailed Fisher’s exact and Chi-square tests. The Mann–Whitney *U*-test was performed to compare the average number of antimicrobials to which the strains were resistant. Significance was set at the level $P < 0.05$. The tests were carried out using the Statistica[®] 6.0 software package (Statsoft Ltd., Tulsa, Oklahoma, USA).

Evaluation of the commercial miniaturized test was made by calculation of sensitivity, specificity, efficiency and predictive values. Definitions and calculations of these values are shown in Fig. 1. As the true sensitivity of strains was not known, the method of calculation assumed that the conventional agar disc diffusion method was the true value. Furthermore, the two tests were compared by calculation of the kappa coefficient (Capita, Alonso-Calleja, Moreno, & García-Fernández, 2001).

3. Results

3.1. Microbial counts

The 120 samples tested were positive for psychrotrophs, faecal coliforms and *E. coli*. Fig. 2 shows the psychrotrophic and faecal coliform counts on chicken (conventional and organic), turkey and quail from North-Western Spain. Loads of psychrotrophs ranged from $4.87 \pm 0.83 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ (quail) to $6.01 \pm 0.38 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$ (turkey). Among all the various poultry meat samples tested in this study, conventional chicken carcasses had the highest ($P < 0.05$) counts for faecal coliforms ($2.95 \pm 0.48 \log_{10} \text{ cfu/cm}^2$). The remaining samples showed similar ($P > 0.05$) counts for faecal coliforms, which ranged from 1.71 ± 0.29 (turkey) to 2.19 ± 0.34 (quail).

3.2. Antimicrobial resistance

A total of 60 *E. coli* strains (15 from each sample type) were tested for their resistance to twelve antimicrobial drugs using the conventional agar disc diffusion method. Four (6.7%) isolates were pan-susceptible, one (1.7%) resistant to one compound, and 55 (91.7%) showed multi-resistance (resistance to two or more antimicrobials). Multi-resistance was observed to two (3 strains; 5.0%), three (7 strains; 11.7%), four (7 strains; 11.7%), five (14 strains;

23.4%), six (10 strains; 16.7%), seven (7 strains; 11.7%), eight (4 strains; 6.7%) or nine (3 strains; 5.0%) antimicrobials (Table 1). All strains from conventional production systems showed multi-resistance. On the other hand, sensitive (26.7%) and resistant (to one compound; 6.7%) strains were detected in organic chicken. Substantial differences were observed in the number of resistances per strain between different poultry types (Table 1), with lower ($P < 0.05$) average values observed in organic chicken (2.53) than in conventional poultry (5.36).

Resistance to nalidixic acid (85.0% of strains tested), ampicillin (75.0%), ciprofloxacin (73.3%) and tetracycline (61.7%) was the most common finding, followed by resistance to amoxicillin-clavulanic acid and sulphamethoxazole-trimethoprim (45%). Strains isolated from organic chicken meat showed the lowest level of resistance to these four compounds (significant for nalidixic acid and ciprofloxacin). A low prevalence of resistance (from 0.0 to 10.0% of strains) was detected for fosfomicin, piperacillin-tazobactam and cefotaxime (Table 2).

3.3. Comparison of methods for testing the antimicrobial susceptibility of *E. coli*

Sixty *E. coli* strains were tested against nine antimicrobials (gentamicin, amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, sulphamethoxazole-trimethoprim, nalidixic acid, ciprofloxacin, fosfomicin and nitrofurantoin) using both the conventional and the miniaturized testing methods. Table 3 displays the sensitivity, specificity, efficiency of the “Sensi Test Gram-negative” system, its predictive value for a positive and a negative test, respectively, and the calculation of the kappa coefficient (agreement). Agar disc diffusion was used as the reference method. The average sensitivity of the “Sensi test Gram negative” method was 71.52%. Low ($\leq 50\%$) sensitivity values were observed with the miniaturized test for amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-

		Disc diffusion method	
		+	-
Miniaturized method	+	a	b
	-	c	d

a = true positive, antibiotic resistance detected with both conventional and miniaturized methods

b = false positive, antibiotic resistance detected with miniaturized but not with disc diffusion method

c = false negative, antibiotic resistance detected with disc diffusion but not with miniaturized method

d = true negative, antibiotic resistance not detected with disc diffusion or miniaturized method

- Sensitivity (the ability to detect antibiotic resistance) = $a/(a+c)$
- Specificity (the ability to detect antibiotic susceptibility) = $d/(b+d)$
- Accuracy (the probability of a given result being correct) = $(a+d)/(a+b+c+d)$
- Predictive value:

of a positive test (the probability of a positive result being correct) = $a/(a+b)$

of a negative test (the probability of a negative result being correct) = $d/(c+d)$

- Kappa coefficient = $(\text{accuracy} - X)/(1-X)$

$$X = [(a+b/n) (a+c/n) + (c+d/n) (b+d/n)]$$

Fig. 1. Definition and calculation of sensitivity, specificity, efficiency, predictive value and kappa coefficient.

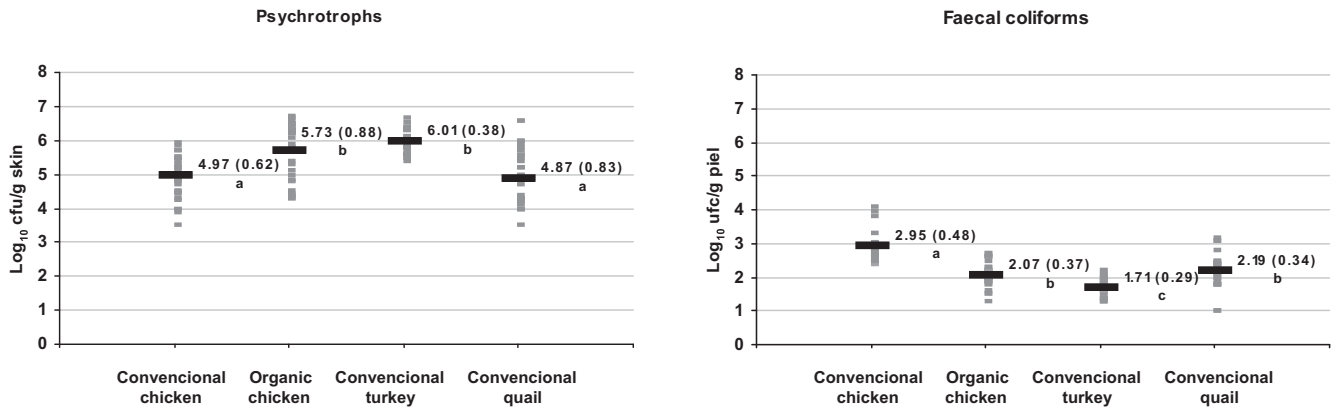


Fig. 2. Microbial loads obtained on skin from different poultry species. Data are means (standard deviations); means in the same graph with no letters in common are significantly ($P < 0.05$) different.

tazobactam, cefotaxime, fosfomicin and nitrofurantoin. The average specificity (identification of sensitive isolates) was 97.60%. The ability to detect antimicrobial sensitivity of the miniaturized test was 100% for amoxicillin-clavulanic acid, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, sulphamethoxazole-trimethoprim, ciprofloxacin and fosfomicin. Slightly lower specificity was shown for gentamicin (97.89%), nalidixic acid (90%) and nitrofurantoin (86%). The average accuracy was 89.63%, with the lowest values observed for amoxicillin-clavulanic acid (81.67%), ciprofloxacin (73.33%) and nitrofurantoin (76.67%). The predictive value for a positive test was high ($\geq 90\%$) for all antimicrobials with the exception of nitrofurantoin (30%). The predictive values for a negative test ranged from 52.94% (ciprofloxacin) to 98.30% (cefotaxime and fosfomicin). Kappa values ranging from 0.16 (nitrofurantoin) to 0.97 (sulphamethoxazole-trimethoprim), with an average of 0.74, were found.

4. Discussion

4.1. Microbial counts

Psychrotrophs are the predominant bacteria in refrigerated poultry meats, and are the microorganisms chosen to indicate the true microbiological loads of poultry and provide a better estimate of the keeping qualities of a product (Álvarez-Astorga, Capita, Alonso-Calleja, Moreno, & García-Fernández, 2002). It is to be noted, from a legislative point of view, that there are no reference limits established specifically for poultry meats with regard to psychrotrophic counts. Regulation (EC) 2073/2005 refers solely to the values for total bacterial contamination in minced meat and meat preparations, which must be within 5.70 and 6.70 \log_{10} cfu/g. These limits are similar to the guidelines established by Pascual-Anderson (1992) in Spain (5 \log_{10} cfu/g). Results in the present study (from 4.87 ± 0.83 to $6.01 \pm 0.38 \log_{10}$ cfu/cm²) fit the above-mentioned criteria and are similar to those previously observed in

chicken and turkey meats (Colmegna et al., 2009; Guevara-Franco et al., 2010). Although many papers have reported on the level of contamination in retail chicken and turkey meat worldwide, very little work has been carried out on quail meat. In a study performed on wild quail carcasses, El-Dengawy and Nassar (2001) observed psychrotrophic loads of 3.60 \log_{10} cfu/g, a figure lower than those obtained in the study being presented here.

Levels of faecal coliforms in the present study (from 1.71 ± 0.29 to $2.95 \pm 0.48 \log_{10}$ cfu/cm²) are similar to the coliform loads found by other authors in poultry carcasses (Capita et al., 2002; Colmegna et al., 2009; El-Dengawy & Nassar, 2001; Fliss, Simard, & Ettriki, 1991; Izat, Colberg, Driggers, & Thomas, 1989; Mead, Hudson, & Hinton, 1993). It should be pointed out, however, that most authors consulted use a lower temperature for incubation (35–37 °C; total coliforms) than that in the present study (44 °C \pm 1 °C; faecal coliforms).

No substantial differences in psychrotrophic or coliform loads were observed between sample types. This finding are not congruent with those of Miranda et al. (2008), who indicated that microbial loads varied depending on the type of animal production system considered. Thus, these authors observed higher microbial counts in conventional turkey than in conventional and organic chicken, for which farming procedures require a lesser use of antimicrobials than does conventional turkey farming.

E. coli isolates frequently contaminate food of animal origin, owing due to the presence of these microorganisms in the environment and in faeces. In the present study, all samples harboured *E. coli*. These results are in agreement with those of Soufi et al. (2011), who recovered *E. coli* from all the poultry samples that they tested in Tunisia. Similarly, a prevalence of 93.3% has previously been observed in chicken carcasses from Spain (Capita et al., 2002). On the other hand, a substantially lower prevalence of *E. coli* was found by Schroeder et al. (2003) in meat offered for retail sale in the USA: 39% in chicken carcasses and 12% in turkey breasts.

Table 1
Percentage of sensitive, resistant and multi-resistant *Escherichia coli* strains in each type of sample.

Sample type	Number of antibiotics to which the strains were resistant										Average number of resistances per strain
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Conventional chicken				13.3	13.3	40.0	20.0		13.3		5.20 \pm 1.47 ^a
Organic chicken	26.7	6.7	13.3	20.0	20.0	6.7		6.7			2.53 \pm 2.10 ^b
Conventional turkey			6.7	13.3	6.7	20.0	26.7	13.3	6.7	6.7	5.47 \pm 1.92 ^{ac}
Conventional quail					6.7	26.7	20.0	26.7	6.7	13.3	6.40 \pm 1.50 ^c
Average	6.7	1.7	5.0	11.7	11.7	23.4	16.7	11.7	6.7	5.0	4.90 \pm 2.25

A total of 60 strains (15 in each sample type) were tested. The average number of resistances per strain with no letters in common (superscript) are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2
Percentage of positive tests (resistance).

Antimicrobial	Sample type				Average
	Conventional chicken	Organic chicken	Conventional turkey	Conventional quail	
GEN	40.0 ^a _{ab}	0.0 ^b _a	13.3 ^{bc} _{ab}	33.3 ^{ac} _{ab}	21.7 _{ab}
AMP	100.0 ^a	53.3 ^b	80.0 ^{cd}	86.7 ^{cd}	75.0 _{cd}
AMC	73.3 ^a _{bc}	20.0 ^b _{ab}	53.3 ^{ab} _{ac}	33.3 ^{ab} _{ab}	45.0 _{ef}
TZP	13.3 ^a _{ae}	13.3 ^a _{ab}	6.7 ^a _{be}	0.0 ^a _e	8.3 _a
CTX	0.0 ^a	26.7 ^a _{ab}	6.7 ^a _{be}	6.7 ^a _{ae}	10.0 _a
SXT	33.3 ^{ab} _{ab}	6.7 ^a _{ac}	60.0 ^{bc} _{cf}	80.0 ^{cd} _{cd}	45.0 _{ef}
C	20.0 ^{ab} _{ab}	6.7 ^a _{ac}	40.0 ^{ab} _{ac}	46.6 ^b _{bc}	28.3 _{bf}
TE	40.0 ^a _{ab}	46.7 ^a _b	66.7 ^c _{eb}	93.3 ^d _d	61.7 _{ce}
NA	100 ^a _c	40.0 ^b _{bc}	100 ^a _d	100 ^a _d	85.0 _d
CIP	73.3 ^a _{bc}	26.7 ^a _{ab}	100 ^a _d	93.3 ^a _d	73.3 _{cd}
FOS	0.0 ^a	0.0 ^a	0.0 ^b	0.0 ^e	0.0 _g
F	26.7 ^a _{ae}	13.3 ^a _{ab}	20.0 ^a _{abf}	66.7 ^c _{cd}	31.7 _{bf}
Average	43.3 ^a	21.1 ^b	45.6 ^a	53.3 ^a	40.8

All types of sample and antimicrobial tested were considered together.

Gentamicin (GEN; 10 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), amoxicillin-clavulanic acid (AMC; 30 µg), piperacillin-tazobactam (TZP; 110 µg), cefotaxime (CTX; 30 µg), sulphamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg), chloramphenicol (C; 30 µg), tetracycline (TE, 30 µg), nalidixic acid (NA; 30 µg), ciprofloxacin (CIP; 5 µg), fosfomycin (FOS; 200 µg) and nitrofurantoin (F; 300 µg). Means in the same row with no letters in common (superscripts) are significantly different ($P < 0.05$). Means in the same column with no letters in common (subscripts) are significantly different ($P < 0.05$).

Incidence percentages found by other authors have been 67% in poultry samples (Bülte & Reuter, 1989) and 74.5% in minced meat (Vorster, Greebe, & Nortjé, 1994).

4.2. Antimicrobial resistance

There is on-going concern about the risks posed to human health by antimicrobial-resistant bacteria isolated from farm animals and from foods of animal origin. Foods contaminated with antimicrobial-resistant bacteria (even non-pathogenic bacteria) are a major threat to public health, as there is the possibility that genes encoding antimicrobial resistance determinants that are carried on mobile genetic elements may be transferred to other bacteria of human clinical significance.

Antimicrobial susceptibility testing of isolates by the disc diffusion method indicated that the majority (91.6%) of *E. coli* strains in the study being presented here were multi-resistant (resistant to two or more antimicrobials). Previous published reports indicate that most *E. coli* recovered from meat and poultry are antimicrobial-resistant (Schroeder, White, & Meng, 2004). Multi-resistant *E. coli* strains are also frequently reported on poultry (Jasson et al., 2009; Miranda et al., 2008; Song et al., 2008; Soufi et al., 2011; Van, Chin, Chapman, Tran, & Coloe, 2008).

In the present study, the *E. coli* strains showed a considerable prevalence of resistance to ampicillin, tetracycline, nalidixic acid, ciprofloxacin, amoxicillin-clavulanic acid and sulphamethoxazole-trimethoprim, indicating that *E. coli* isolates of poultry meat origin could be a reservoir of antimicrobial resistance. These results agree with the data from several previous studies, which found that resistance to tetracycline derivatives, penicillins, quinolones and sulpha drugs is common among bacterial strains isolated from poultry (Jasson et al., 2009; Lei et al., 2010; Miranda et al., 2008; Schroeder et al., 2003, 2004; Song et al., 2008; Soufi et al., 2011; Van et al., 2008). These are also among the main drugs to which the *E. coli* strains isolated from human patients and food-producing animals in Spain are resistant (Oteo, Campos, Baquero, & Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS), 2002; Oteo et al., 2005; Sáenz et al., 2001).

The high rate of antimicrobial resistance to ampicillin, tetracycline and ciprofloxacin, which is closely related to enrofloxacin, observed in this study might be due to the fact that during the last few years these antimicrobials have been commonly used for prevention or treatment in food producing animals in Spain. The use of antimicrobial agents on farm animals exerts a selective pressure favourable to the propagation of antimicrobial-resistant bacteria (Capita & Alonso-Calleja, in press).

It was noteworthy that the study being presented here revealed very high rates of nalidixic acid (85.0%) and ciprofloxacin (73.3%) resistance in *E. coli* isolates. Fluoroquinolones are critically important for treating serious infections by *E. coli* in humans, and continued surveillance is required to detect emerging fluoroquinolone-resistant phenotypes (Van et al., 2008). In Spain, resistance of *E. coli* from human patients to quinolones has remained rare for years, until their use increased in 1990s. Currently, ciprofloxacin resistance in *E. coli* isolates from human clinical infections exceeds 20% and is among the highest of Europe (Oteo et al., 2005). Resistance of *E. coli* to ciprofloxacin is also frequent in food-producing animals. Sáenz et al. (2001) observed higher percentages of ciprofloxacin resistance in *E. coli* strains from faeces of broilers (38%) than in faeces of pigs (3%), pets, bulls or horses (0%). These authors conclude that the high prevalence of *E. coli* resistant to ciprofloxacin in broilers might reflect a higher use of quinolones for chickens than in pigs or other animals. Cephalosporins are the first-line antimicrobials for treating human bacterial infections (Lei et al., 2010). The low percentage of strains resistant to this drug in the present result is a satisfactory result.

Our findings clearly show that *E. coli* is strongly prevalent in both organic and conventional poultry production systems. However, the antimicrobial resistance rates vary significantly between production types. Conventionally raised broilers, turkeys and quail harbour *E. coli* strains with a greater average number of

Table 3
Evaluation of the miniaturized test (Sensi Test Gram-negative) for checking the antibiotic susceptibility of *E. coli* strains.

Antimicrobial	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	Predictive value (%)		Kappa coefficient
				Positive tests	Negative tests	
GEN	69.23	97.87	91.67	90.00	92.00	0.73
AMC	31.25	100	81.67	100	80.00	0.40
TZP	25.00	100	95.00	100	94.92	0.39
CTX	50.00	100	98.33	100	98.30	0.66
SXT	96.15	100	98.33	100	97.14	0.97
NA	94.00	90.00	93.33	97.92	75.00	0.78
CIP	61.90	100	73.33	100	52.94	0.49
FOS	50.00	100	98.33	100	98.30	0.66
F	30.00	86.00	76.67	30.00	86.00	0.16
All antibiotics	71.52	97.60	89.63	92.91	88.62	0.74

Gentamicin (GEN), amoxicillin-clavulanic acid (AMC), piperacillin/tazobactam (TZP), cefotaxime (CTX), sulphamethoxazole-trimethoprim (SXT), nalidixic acid (NA), ciprofloxacin (CIP), fosfomycin (FOS) and nitrofurantoin (F).

resistances per strain than chicken from organic farms. Because antimicrobials are widely used in conventional poultry operations (Capita et al., 2007), it was not surprising that there was considerable resistance to these compounds in *E. coli* strains isolated from intensive poultry farms. However, the great prevalence of multi-resistant *E. coli* strains observed in conventional poultry in this study is striking, since not all the antimicrobial agents to which *E. coli* isolates from conventionally-raised poultry were resistant are used in intensive poultry production in Spain. In recent years, a number of multi-drug resistance phenotypes have been associated with large transferable plasmids, which may carry mobile DNA elements (e.g. integrons) which often contain several antimicrobial resistance genes that are transferred in a single event and expressed jointly in a new bacterial host. Thus, resistance to antimicrobial drugs not used routinely in clinical medicine has potential human health implications through co-selection for resistance to those drugs that are so used (Capita & Alonso-Calleja, in press; Schroeder et al., 2004). The extent of co-selection phenomena has been found to be particularly relevant, contributing to the massive persistence of multi-resistant strains (Martins da Costa, Oliveira, Ramos, & Bernardo, 2011). Moreover, it has been established that antimicrobial-resistant clones are stable and able to persist in flocks during several rotations, even though there has been no selective pressure on the farm concerned for a long period of time (Song et al., 2008). Thus, the antimicrobial resistance rate in a flock may not be directly correlated with the antimicrobial usage data (Luangtongkum et al., 2006). Recently, Martins da Costa et al. (2011) assessed the impact of antimicrobial use in broiler chickens on the occurrence of antimicrobial-resistant *E. coli*, reporting that the use of antimicrobials in feed (enrofloxacin, gentamicin, or amoxicillin) resulted in the emergence of new resistant phenotypes that continued beyond the period of antimicrobial exposure. According to these authors, this shift in resistance profile could be explained by the strong capacity of *E. coli* to exchange resistance genes, and could also be due to changes in the *E. coli* community structure (selective proliferation of previously non-detected phenotypes).

Smith et al. (2007) also found that successive antimicrobial exposure creates stable resistance, so that the resistant strains can compete with susceptible strains even in the absence of antimicrobial-selective effects. It has also been shown that successive antimicrobial applications may result in cumulative effects, with multi-resistant strains becoming more prevalent and persisting longer with each successive application (Martins da Costa et al., 2011). This hypothesis is supported by the fact that *E. coli* strains resistant to chloramphenicol and furazolidone have been found in the study being presented here, although they are not used for animal production in Spain (Annex IV of the Council Directive 2377/90). Moreover, none of the resistant isolates showed single resistance to chloramphenicol or nitrofurantoin, suggesting co-selection due to any of the antimicrobials (ampicillin, tetracycline, ciprofloxacin) which were almost always observed with chloramphenicol or nitrofurantoin in multiple resistance patterns.

The relatively high prevalence of resistance to ampicillin, tetracycline and quinolones observed in *E. coli* strains from organically raised birds in the study being presented here is an apparently surprising result. As indicated in previous paragraphs, multi-resistant patterns are also found in the absence of selective antimicrobial pressure (Martins da Costa et al., 2011). Since these compounds have been used on poultry farms in Spain for therapeutic purposes for a long period (Capita et al., 2007), it is possible that *E. coli* may have evolved to become resistant to these classes of antimicrobials, leading to the widespread distribution of resistant strains in animal reservoirs regardless of the type of production. According to Apajalahti, Kettunen, and Graham (2004), the diet and the environment can change the microbiota of poultry directly,

providing a source of bacteria, or indirectly by influencing the birds' defence mechanisms. A considerable prevalence of antimicrobial-resistant strains in bacteria isolated from organic production systems has also been found by other authors (Cui, Ge, Zheng, & Jianghong, 2005; Luangtongkum et al., 2006).

4.3. Comparison of methods for testing the antimicrobial susceptibility of *E. coli*

Commercially prepared systems for antimicrobial susceptibility testing are very suitable for routine laboratory work, which enables the monitoring of the patterns of resistance of bacteria to a greater extent. Because of the importance of *E. coli* as an indicator for antimicrobial resistance, reliable systems for detecting resistant *E. coli* strains are highly desirable. The present study represents the first comparative study between the conventional disc diffusion and the "Sensi Test Gram-negative" methods for determining the antibiotic resistance patterns of *E. coli* strains from poultry.

Because the true status of the isolates (resistant or sensitive) was not known, the evaluation of the miniaturized test was assessed by a comparison of the performance of the commercial method with that of the conventional agar diffusion disc method.

The kappa coefficient in the present study ranged from 0.16 (nitrofurantoin) to 0.97 (sulphamethoxazole-trimethoprim). A perfect agreement would give a kappa value of 1, and a kappa value of 0 would indicate no agreement at all, or agreement which could only be explained by sheer chance. It is a useful parameter when comparing a new test with a standard test if no information on the sensitivity and specificity of the standard test is available (Capita et al., 2001). According to commonly accepted scales (Landis & Koch, 1977), the conventional agar disc diffusion method and the commercially available Sensi Test method showed an almost perfect agreement ($\text{kappa} > 0.80$) for sulphamethoxazole-trimethoprim resistance detection (kappa index of 0.97). Their agreement was substantial (kappa from 0.61 to 0.80) for gentamicin (kappa 0.73), fosfomicin (kappa 0.66), cefotaxime (kappa 0.66) and nalidixic acid (kappa 0.78). For the rest of antimicrobials a moderate (kappa from 0.41 to 0.60; amoxicillin-clavulanic acid, ciprofloxacin), fair (kappa from 0.21 to 0.40; piperacillin-tazobactam) or slight (kappa from 0.01 to 0.20; nitrofurantoin) agreement was found. According to this scale a substantial average agreement was observed between the agar disc diffusion method and the Sensi test method (kappa 0.74).

Most discrepancies between the two methods were due to isolates resistant according to the disc diffusion method but susceptible according to the miniaturized test (false negatives). This happened for gentamicin (4 strains), amoxicillin-clavulanic acid (11), piperacillin-tazobactam (3), fosfomicin (1), nitrofurantoin (7), cefotaxime (1), nalidixic acid (3), ciprofloxacin (16) and sulphamethoxazole-trimethoprim (1). On the other hand, false positive strains (resistance detected using the miniaturized but not the conventional method) were detected only for gentamicin (one strain), nalidixic acid (7 strains) and nitrofurantoin (one strain). Thus, the commercial method may underestimate the resistance to several antimicrobials because of its relatively low sensitivity (Table 3). Taking into account the fact that for a test evaluating the antimicrobial susceptibilities of bacteria it is most important to identify resistance to a compound (Luber, Bartelt, Genschow, Wagner, & Hahn, 2003), the results in the present study suggest that the "Sensi Test Gram-negative" method may be unreliable for predicting resistance to several antimicrobials in *E. coli* isolates from poultry.

To sum up, the high levels of antimicrobial resistance in *E. coli* strains, including resistance to clinically valuable antimicrobials, suggest that *E. coli* from poultry in Spain may play a considerable

role as a reservoir for resistance genes and be a key source for the transfer of resistance to other major human pathogens. Results in this study emphasize the need for more rigorous surveillance and improved farming practices (including the strict regulation of antibiotic usage in food-producing animals), which can reduce the carriage of antibiotic-resistant bacteria on foods and thereby minimize the likelihood of horizontal gene transfer of mobile antibiotic resistance genes to other bacteria through the food chain. Because faecal contamination of poultry products cannot be prevented entirely, efforts to educate consumers in proper food handling and preparation methods in order to reduce or eliminate the risk from antibiotic resistance and pathogenic bacteria originating from raw foods are also highlighted.

This study revealed higher antimicrobial-resistance rates in conventional than in organically farmed poultry, supporting the idea that organic farming may limit the development and spread of antimicrobial resistance among food-borne bacteria. However, high rates of resistance to some antimicrobials were observed in strains from organically raised poultry, where no antimicrobials are used, suggesting that antimicrobial-resistant *E. coli* strains are stable and able to transmit and persist in poultry even in the absence of selection pressure.

In comparison with the conventional agar diffusion method, the “Sensi Test Gram-negative” system is technically simple and can yield results out more rapidly. However, this test shows limitations with regard to the range of antimicrobial agents with which *E. coli* could be tested. Results in the present study revealed a substantial average agreement between the conventional agar disc diffusion method and the miniaturized system in testing the antibiotic resistance of *E. coli*. However, its limited ability to detect resistance to various antibiotics could restrict its use for routine susceptibility testing of *E. coli* strains.

Acknowledgements

The authors wish to thank the *Junta de Castilla y León* (Project LE013A10-2) and the *Ministerio de Economía y Competitividad* (Project AGL2011-29645) for their financial support.

References

- Álvarez-Astorga, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & García-Fernández, C. (2002). Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Science*, 62, 45–50.
- Apajalahti, J., Kettunen, A., & Graham, H. (2004). Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to chicken. *World's Poultry Science Journal*, 60, 223–232.
- Bülte, M., & Reuter, G. (1989). Results of a collaborative study using the fluorogenic MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide) assay for detection of *Escherichia coli* in meat and meat products. *Archiv Für Lebensmittelhygiene*, 40, 121–144.
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. in press.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., García-Arias, M. T., Moreno, B., & García-Fernández, M. C. (2002). Methods to detect the occurrence of various indicator bacteria on the surface of retail poultry in Spain. *Journal of Food Science*, 67(2), 765–771.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & García-Fernández, M. C. (2001). Occurrence of *Listeria* species in retail poultry meat and evaluation of a cultural immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1/2), 75–82.
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., & Prieto, M. (2007). Prevalence of *Salmonella enterica* serovars and genovars from chicken carcasses from slaughterhouses in Spain. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1366–1375.
- Cardinale, E., Perrier Gros-Claude, J. D., Tall, F., Cissé, M., Guèye, E. F., & Salvat, G. (2005). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken carcasses in Senegal. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*, 56, 13–16.
- 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.
- Colmegna, S., Invernizzi, A., Mascher, A. L., Corsale, E., Ferrazzi, V., & Grilli, G. (2009). Microbiological characteristics of poultry meats—results of inspections carried out in the province of Milano, Italy. *Italian Journal of Animal Science*, 8, 765–770.
- Cui, S., Ge, B., Zheng, J., & Jianghong, M. (2005). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens in Maryland retail stores. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 4108–4111.
- El-Dengawy, R. A., & Nassar, A. M. (2001). Investigation on the nutritive value and microbiological quality of wild carcasses. *Food/Nahrung*, 45(1), 50–54.
- FAO. (2011). *Faostat: Food balance sheets*. Internet site. <http://faostat.fao.org/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor> Accessed 20.12.11.
- Fliss, I., Simard, R. E., & Ettriki, A. (1991). Microbiological quality of different fresh meat species in tunisian slaughterhouses and markets. *Journal of Food Protection*, 54, 773–777.
- Guevara-Franco, J. A., Alonso-Calleja, C., & Capita, R. (2010). Aminopeptidase activity by spoilage bacteria and its relationship to microbial load and sensory attributes of poultry legs during aerobic cold storage. *Journal of Food Protection*, 73(2), 322–326.
- Izat, A. L., Colberg, M., Driggers, C. D., & Thomas, R. A. (1989). Effects of sampling method and feed withdrawal period on recovery of microorganisms from poultry carcasses. *Journal of Food Protection*, 52, 480–483.
- Jasson, V., Sampers, I., Botteldoorn, N., López-Gálvez, F., Baert, L., Denayer, S., et al. (2009). Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology*, 135, 248–253.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159–174.
- Lei, T., Tian, W., He, L., Huang, X.-H., Sun, Y.-X., Deng, Y.-T., et al. (2010). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary Microbiology*, 146, 85–89.
- Luangtongkum, T., Morishita, T. Y., Ison, A. J., Huang, S., McDermott, P. F., & Zhang, Q. (2006). Effect of conventional and organic production practices on the prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. in poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 3600–3607.
- Luber, P., Bartelt, E., Genschow, E., Wagner, J., & Hahn, H. (2003). Comparison of broth microdilution, E test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(3), 1062–1108.
- Martins da Costa, P., Oliveira, M., Ramos, B., & Bernardo, F. (2011). The impact of antimicrobial use in broiler chickens on growth performance and on the occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Livestock Science*, 136, 262–269.
- Mead, G. C., Hudson, W. R., & Hinton, M. H. (1993). Microbiological survey of five poultry processing plants in the UK. *British Poultry Science*, 34, 497–503.
- Miranda, J. M., Guarddon, M., Vázquez, B. I., Gente, C. A., Barros-velázquez, J., Cepeda, A., et al. (2008). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: a comparative study. *Food Control*, 19, 412–416.
- Nie, C., & Zepeda, L. (2011). Lifestyle segmentation of US food shoppers to examine organic and local food consumption. *Appetite*, 57(1), 28–37.
- Oteo, J., Campos, J., Baquero, F., & Spanish members of the European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). (2002). Antibiotic resistance in 1962 invasive isolates of *Escherichia coli* in 27 Spanish hospitals participating in the European antimicrobial resistance surveillance system (2001). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50, 945–952.
- Oteo, J., Lázaro, E., de Abajo, F. J., Baquero, F., Campos, J., & Spanish members of EARSS. (2005). Antimicrobial-resistant invasive *Escherichia coli*, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, 11(4), 546–553.
- Pascual-Anderson, M. R. (1992). *Aves y caza Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Madrid: Díaz de Santos, 163–170.
- Sáenz, Y., Zaragoza, M., Briñas, L., lantero, M., Ruiz-Larrea, F., & Torres, C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 353–358.
- SCENIHR. (2009). *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*. Scientific Committee On Emerging and Newly Identified Health Risks, 19 January 2009. Available at http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihr/docs/scenihr_o_021.pdf Accessed 24.05.12.
- Schroeder, C. M., White, D. G., Ge, B., Zhang, Y., McDermott, P. F., Ayers, S., et al. (2003). Isolation of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from retail meats purchased in Greater Washington, DC, USA. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 197–202.
- Schroeder, C. M., White, D. G., & Meng, J. (2004). Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 21, 249–255.
- Sjölund, M., Bengtsson, S., Bonnedahl, J., Hernandez, J., Olsen, B., & Kahlmeter, G. (2009). Antimicrobial susceptibility in *Escherichia coli* of human and avian origin—a comparison of wild-type distributions. *Clinical Microbiology and Infection*, 15, 461–465.
- Smith, J. L., Drum, D. J. V., Dai, Y., Kim, J. M., Sánchez, S., Maurer, J. J., et al. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1404–1414.
- Song, L., Ning, Y.-B., Zhang, X.-Y., Sheng, Q.-C., Zhang, G.-C., Lin, S.-M., et al. (2008). Comparative research on serogroups distribution and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from poultry in different areas of China. *Agricultural Sciences in China*, 7(3), 381–386.

- Soonthornchaikul, N., Garelick, H., Jones, H., Jacobs, J., Ball, D., & Choudhury, M. (2006). Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated for organically- and intensively-reared chickens purchased from retail outlets. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *27*, 125–130.
- Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbasi, M. S., Ruiz, E., Zaragaza, M., et al. (2011). *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *International Journal of Food Microbiology*, *144*, 497–502.
- Van, T. T. H., Chin, J., Chapman, T., Tran, L. T., & Coloe, P. J. (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, *124*, 217–223.
- Vorster, S. M., Greebe, R. P., & Nortjé, G. L. (1994). Incidence of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in ground beef, broilers and processed meats in Pretoria, South Africa. *Journal of Food Protection*, *57*, 305.